



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INORGÂNICA

PABLYANA LEILA RODRIGUES DA CUNHA

**DESENVOLVIMENTO DE POLISSACARÍDEOS COM
AÇÃO TERAPÊUTICA EM OSTEOARTRITE**

FORTALEZA
2006

PABLYANA LEILA RODRIGUES DA CUNHA

**DESENVOLVIMENTO DE POLISSACARÍDEOS COM AÇÃO
TERAPÊUTICA EM OSTEOARTRITE**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química Inorgânica.

Orientadora: Prof.^a Judith P. de A. Feitosa

FORTALEZA
2006

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

C98d Cunha, Pablyana Leila Rodrigues da

Desenvolvimento de polissacarídeos com ação terapêutica em
osteoartrite / Pablyana Leila Rodrigues da Cunha

169 f. il., color. enc.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
Orientadora: Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Área de concentração: Polímeros

1. Goma guar 2. Quitina 3. Polissacarídeos – Modificação 4.
Viscossuplementação I. Feitosa, Judith Pessoa de Andrade II.
Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Química Inorgânica
III. Título

CDD 546

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Inorgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

Pablyana Leila R. da Cunha

Pablyana Leila Rodrigues da Cunha

Tese aprovada em: **03/08/2006**

Judith P. de A. Feitosa
Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
(Orientadora-UFC)

Paulo A. S. Mourão

Dr. Paulo Antonio de Souza Mourão
(UFRJ)

Cristina Tristão de Andrade

Dra. Cristina Tristão de Andrade
(UFRJ)

Francisco Ailton Castro da Rocha
Dr. Francisco Ailton Castro da Rocha
(UFC)

Regina Célia M. Paula

Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
(UFC)

Orientadora: Profa. Judith Pessoa de Andrade Feitosa

*Aos meus queridos pais, Luis e Alice,
por todos esses anos de incentivo,
desde os meus primeiros anos de vida escolar.*

*Ào meu querido noivo Pitágoras,
pelo amor, apoio e paciência.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Senhor de todas as coisas, a quem agradeço por tudo.

Aos meus queridos pais, Maria Alice e Luis, por todo esforço, dedicação, amor, incentivo, sempre tão presentes em todos os momentos.

Aos meus queridos irmãos, Polyana e Pablyto, pela amizade, companheirismo, afeição e força que fizeram e fazem a diferença em minha vida e ao meu cunhado Rodrigo que está sempre torcendo por mim.

Ao querido Pitágoras, pelo amor, paciência, dedicação, amizade e um companheirismo inigualável em todos os momentos, dos mais simples aos mais especiais.

À professora Judith Feitosa, por todos esses sete anos de orientação e amizade constantes, demonstrando sua competência e dedicação, mostrando-se um exemplo no aspecto pessoal e profissional.

Ao professor Francisco Airton Rocha, idealizador deste trabalho e ao doutorando Rondinelle Castro, do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias, por todos os testes farmacológicos e pelo produtivo trabalho em cooperação.

À professora Regina de Paula, pela amizade e pelas ajudas com RMN que foram essenciais para esse trabalho.

À professora Nágila Ricardo, por todos esses anos de amizade e prestatividade, e também pelas orientações com a reologia.

À professora Sandra Soares, pelas sugestões acerca do trabalho e pela amizade.

À professora Maria Rita Sierakowski do Laboratório de Biopolímeros da UFPR, pela orientação no desenvolvimento de parte deste trabalho e pela amizade durante os três meses que estive em Curitiba.

Às minhas amigas, Leônia, Cristina e Janaína, que, cada uma a seu modo, estão sempre presentes em minha vida.

À minhas queridas amigas, Lene e Marília, por toda a amizade, pelos passeios, conversas e discussões sempre tão edificantes.

À Jeanny, pela boa amizade, conversas familiares e discussões científicas/filosóficas e também pela obtenção dos espectros de RMN.

À Aliny, pela grande amizade e contribuição na etapa da carboximetilação da quitina e no preparo de amostra de guar enviadas para o Paraná.

Ao Manoel Neto, pela amizade e companheirismo que me acompanharam durante estes oito anos de UFC (graduação e pós-graduação) e ao Hélder, pela amizade que aprendemos a cultivar.

Aos meninos do Laboratório de Polímeros: Célio e Sávio, pela prestatividade e pela boa companhia, e ao Júnior, pelas boas risadas.

Aos colegas veteranos do Laboratório de Polímeros, Ellen, Elenir, Dráulio, Roberto e Guilherme, e aos novatos, Igor, Hanna, Clara, Rafael e J. Júnior, pela agradável convivência dia-a-dia no laboratório.

À minha querida amiga Francine da UFPR, pelo acolhimento e pela grande amizade com a qual me presenteou e à Lucy, pela tão grande prestatividade e ajuda quando estive em Curitiba.

Ao pessoal do BIOPOL da UFPR, pela receptividade e amizade, em especial ao Charles, à Gizelle e ao Gustavo, pelo acolhimento e amizade que me foram tão valiosos durante minha estadia em Curitiba.

Ao professor Luizinho, coordenador do Programa de Pós-graduação em Química Inorgânica da UFC, pela competência e prestatividade com a qual desempenha esse cargo.

Aos colegas da Bioinorgânica, em especial ao Daniel Pontes e ao Jean Jerley pela amizade e pelas análises de UV-VIS.

À funcionária Tereza, pelas análises termogravimétricas e ao secretário da coordenação da pós-graduação em Química Inorgânica, Orlando, pelas orientações burocráticas, ambos sempre dispostos a ajudar.

Ao CENAUREM pelas análises de ressonância magnética nuclear.

Ao professor Ricardo Cunha Michel do Instituto de Macromoléculas Eloísa Mano da UFRJ pelas análises de espalhamento de luz.

Ao CNPq e ao projeto PADCT/MCT/CNPq.

À CAPES, pela bolsa de Doutorado e ao programa PROCAD/CAPES, que possibilitou minha ida para a UFPR.

*“As palhas flutuam na superfície,
quem procura pérolas, vai ao fundo”*

John Dryden

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE POLISSACARÍDEOS COM AÇÃO TERAPÊUTICA EM OSTEOARTRITE.

A viscosuplementação é uma técnica terapêutica utilizada no tratamento de osteoartrite, a qual busca substituir o líquido sinovial (lubrificante das articulações) por soluções viscoelásticas de derivados do ácido hialurônico com propriedades reológicas melhores que a deste líquido. Este tratamento é caro e comercialmente só se utiliza o ácido hialurônico. O estudo de outros polissacarídeos, tais como a goma guar e a quitina, para aplicação em viscosuplementação, aumenta a possibilidade de substituir o ácido hialurônico por outros de fontes mais abundantes e viáveis. A goma guar (GGNP) foi purificada por vários métodos com a finalidade de reduzir contaminantes, como polissacarídeos (que não galactomanana) e principalmente proteínas. O método de maior eficiência na redução destes contaminantes foi o método físico+Fehling, resultando em uma guar (GGFISFEH) com 96% de galactomanana e 0% de proteínas. A goma comercial (GGNP) e a purificada (GGFISFEH) foram reticuladas com glutaraldeído para originar hidrogéis fluidos de alta viscosidade. O aumento da viscosidade do polissacarídeo com o tempo de reação de reticulação é gradativo e pode ser interrompido no momento em que se obtém um hidrogel fluido, por diálise contra água. Os hidrogéis obtidos tem viscosidade quarenta vezes (GelGGNP) e oitocentas vezes (GelGGFISFEH) a viscosidade das soluções iniciais das gomas. A goma guar purificada (GGFISFEH) foi modificada por reação de oxidação com reagente TEMPO e por reação de sulfatação, com a finalidade de introduzir grupos carboxilato e sulfato, assemelhando a estrutura desta ao ácido hialurônico e ao condroitim sulfato. As reações foram eficientes na modificação, resultando em grau de substituição (GS) de 0,36 para a goma oxidada (GGOXID) e 0,60 para a sulfatada (GGSULF). Análises de RMN de ^{13}C e ^1H indicam que a sulfatação ocorreu no C6 da galactose e a oxidação no C6 da manose. A quitina foi carboximetilada para originar um polieletrólito solúvel em água e com grupo acetil glicosamina semelhante ao do ácido hialurônico. Esta reação foi testada em várias condições reacionais, resultando em GS diferentes. O melhor rendimento foi de 92% com um GS de 0,53. Os testes farmacológicos foram realizados em ratos Wistar. Avaliou-se o efeito *per si* na cavidade articular de GGNP e GGFISFEH, ambas em solução e gel. A GGNP causou incapacitação e influxo celular dose-dependente, efeito não demonstrado por GGFISFEH. A incapacitação articular foi maior com a administração do GelGGNP. Avaliou-se também, o efeito terapêutico da GGFISFEH em solução e gel, e Hilano G-F20 em osteoartrite induzida pelo modelo de transecção do ligamento cruzado anterior. A inibição da incapacitação articular obtida pelo gel ou pela solução de guar foram absolutamente semelhantes ao resultado obtido com o Hilano G-F 20. A goma guar apresenta potencial como agente viscosuplementador.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLYSACCHARIDES WITH THERAPEUTIC ACTION IN OSTEOARTHRITIS.

The viscosupplementation is a therapeutic technique used in the osteoarthritis treatment, in which the sinovial fluid (lubricant of the ligaments) is replaced by viscoelastic solutions derived from hyaluronic acid with rheological properties better than the starting material. This treatment is expensive and commercially, only hyaluronic acid is used. The research of other polysaccharides such as the guar gum and chitin, for the application on viscosupplementation, increases the possibility of substituting the hyaluronic acid with other from more abundant sources and more viable. The guar gum (GGNP) was purified through various methods with the aim to reduce contaminants, such as polysaccharides (but not galactomannan) and most importantly, proteins. The method with best efficiency in the reduction of these contaminants was the physico-Fehling method, resulting in a guar (GGFISFEH) with 96% of galactomannan and 0% of proteins. The commercial gum (GGNP) and the purified (GGFISFEH) were crosslinked with glutaraldehyde to originate fluids hydrogel of high viscosity. The increase in viscosity of the polysaccharides with the increase of the crosslinking reaction time is gradual and can be interrupted at the moment a hydrogel fluid is obtained through dialysis against water. The hydrogels obtained have viscosity forty times (GelGGNP) and eight hundred times (GelGGFISFEH) than the initial viscosities of the gums. The purified guar gum (GGFISFEH) was modified through oxidative reaction with a TEMPO reagent and through a sulfatation reaction, with the aim of introducing carboxylated and sulphate groups, making their structure similar to the one from the hyaluronic acid and the chondroitin sulfate. The reactions were efficient in the modification, resulting in degree of substitution (DS) of 0.36 for the oxidated gum (GGOXID) and 0.60 for the sulfated gum (GGSULF). ^{13}C and ^1H NMR analyses indicated that the sulfatation occurred in C6 of galactose and the oxidation on C6 of mannose. The chitin was carboxylated to form a water soluble polyelectrolyte and with a group of acetyl glucosamine similar to the hyaluronic acid. This reaction was tested in various conditions, resulting in different DS. The best yield was of 92% with a DS of 0.53. The pharmacological tests were conducted on rats Wistar. The effect, *per se*, in the articulate cavity of GGNP and GGFISFEH, both in solution and gel was also studied. The GGNP caused incapacitation and dosage-dependant cell influx, an effect not demonstrated by GGFISFEH. The articular incapacitation was greater with the administration of GelGGNP. It was also evaluated the therapeutic effect of GGFISFEH in solution and gel, and Hilano G-F20 in osteoarthritis induced by the transection of the anterior cruciate ligament. The inhibition of the articular incapacitation obtained through gel or through the guar solution were entirely similar to the results obtained with the Hilano G-F20. The guar gum presents potential as a viscosupplemented agent.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Proporções de polissacarídeo e glutaraldeído para reação de reticulação.....	45
TABELA 2 – Condições reacionais para a reação de carboximetilação da quitina.....	50
TABELA 3 – Configurações do equipamento de ICP-OES utilizadas para análise da guar.....	54
TABELA 4 - Teor de proteína e % de redução da proteína para os diferentes métodos de purificações da goma guar	65
TABELA 5 - Composição monossacarídica para as amostras de goma guar.....	66
TABELA 6 - Teor de cobre das amostras de goma guar em ppm.....	68
TABELA 7 - Massas molares viscosimétricas para as amostras de goma guar purificadas e não purificadas.....	70
TABELA 8 - Massas molares de pico para as amostras de goma guar purificadas e não purificadas.....	73
TABELA 9 - Turbidez das soluções aquosas 0,1% de guar purificada e não purificada.....	75
Tabela 10. Atribuições dos picos de Ressonância Nuclear de ¹³ C (RMN) da goma guar (GGNP e GGFISFEH) deste trabalho e da referência [Gransdalen e Painter, 1980].....	79
TABELA 11 - Parâmetros de estabilidade térmica das amostras de guar.....	80
TABELA 12 - Resultado da reticulação de vários polissacarídeos com glutaraldeído.....	82
TABELA 13 – Resumo da características estruturais do polissacarídeos testados na reticulação com glutaraldeído.....	83
TABELA 14 – Viscosidades das gomas GGFISFEH, GGNP, dos géis de GGNP e de GGFISFEH e do Hilano G-F20, taxa de cisalhamento de 0,02 s ⁻¹ a 36°C.....	87
TABELA 15 – Análise termogravimétrica am ar sintético da GGNP, GGFSIFEH e dos seus géis.....	100
TABELA 16 – Atribuições dos deslocamentos químicos de RMN- ¹³ C da goma GGFISFEH.....	105
TABELA 17 – Atribuições das correlações ¹ H- ¹³ C observadas no espectro de HMQC da guar sem modificação (GGFISFEH).....	107

TABELA 18 - Parâmetros de termogravimetria em ar sintético para GGFISFEH, GGOXID e GGSULF.....	119
TABELA 19 – Avaliação das condições reações sobre o grau de substituição e rendimento da carboximetilação da quitina.....	122
TABELA 20 - Análise termogravimétrica em ar sintético da quitina e QCMT.....	131

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema da articulação do joelho.....	01
FIGURA 2 - Estrutura do ácido hialurônico.....	03
FIGURA 3 - Estrutura do ácido hialurônico ressaltando os átomos de hidrogênio axial.....	06
FIGURA 4 - Esquema da estrutura tridimensional de hélice aleatória do ácido hialurônico em condições fisiológicas	06
FIGURA 5 – Modelo mostrando as propriedades viscosas e elásticas das soluções de ácido hialurônico	07
FIGURA 6 – Esquema da hidratação do ácido hialurônico	08
FIGURA 7 - Componentes da cartilagem normal	10
FIGURA 8 – Estrutura do proteoglicano da cartilagem, o agrecano	11
FIGURA 9 – Microscopia eletrônica do agregado de proteoglicanos agrecan e a ilustração de como ele se forma [Seol e col., 2002].....	12
FIGURA 10 - Estruturas do sulfato de condroitina 4 e 6.....	13
FIGURA 11 - Estrutura da Goma Guar.....	19
FIGURA 12 – Foto da planta guar (<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>).....	20
FIGURA 13 – (a) Estrutura da goma guar. (b) Representação esquemática da estrutura cristalina da guar [Cheng e col., 2002].....	21
FIGURA 14 – Esquema representando a complexação da goma guar com íons borato [Tayal, Pai e Khan, 1999].....	22
FIGURA 15 - Estrutura da Quitina	24
FIGURA 16 – Estrutura do reagente TEMPO (<i>N</i> -oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina)	26
FIGURA 17 – Reação de oxiredução do reagente TEMPO.	26
FIGURA 18 – Mecanismo proposto para a oxidação de álcoois em presença de TEMPO, NaClO e NaClO ₂ [Zhao e col. 1999]	28

FIGURA 19 - Esquema da oxidação de polissacarídeo [de Nooy, 1994].....	29
FIGURA 20 - Esquema da sulfatação de polissacarídeo com ácido clorosulfônico e piridina [Mahner, Lechmer, Nordmeier, 2002]	30
FIGURA 21 - Esquema da sulfatação da manose no carbono 6.....	31
FIGURA 22 - Mecanismo de reação da carboximetilação.	32
FIGURA 23 - Estruturas da quitina carboximetilada e do ácido hialurônico	35
FIGURA 24 – Reticulação de polímeros contendo os grupamentos álcool, amina ou hidrazina (R representa a cadeia polimérica).....	36
FIGURA 25 – Esquema de reticulação de polissacarídeo com o glutaraldeído.....	38
FIGURA 26 - Animais deambulando no sistema de registro da incapacitação articular.....	61
FIGURA 27 - Ilustração do joelho mostrando o ligamento cruzado anterior do joelho.....	62
FIGURA 28 – Amostra de goma guar não purificada (GGNP) e guar purificada (GGFISFEH).....	64
FIGURA 29 - Gráficos de viscosidade reduzida <i>versus</i> concentração para as amostras de goma guar em água, T=25°C.....	70
FIGURA 30 - Cromatograma para as várias amostras de goma guar purificadas e não purificada.....	72
FIGURA 31 - Variação da viscosidade com a variação de taxa de cisalhamento das amostras de GGNP e das gomas purificadas, solução aquosa 1%, T=25°C.....	74
FIGURA 32 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C (RMN) da goma guar GGNP em D ₂ O.....	77
FIGURA 33 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C (RMN) da goma guar GGFISFEH em D ₂ O.....	78
FIGURA 34 - Curvas termogravimétricas e DTG das amostras de guar a 10°C/min em ar.....	80
FIGURA 35 - Cinética de reação da reticulação da GGNP em três proporções diferentes de goma/glutaraldeído. Taxa de cisalhamento de 3 s ⁻¹ a 36°C.....	84

FIGURA 36 - Cinética da reação de reticulação de GGNP com glutaraldeído da VETEC e da SERVA na proporção 40:1 v/v (Solução de Goma/ Glutaraldeído).....	85
FIGURA 37 – Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento a 36° para a solução de GGFISFEH 0,8% em salina (NaCl 0,9%).....	86
FIGURA 38 – Aspecto macroscópico do gel de goma guar purificada GelGGFISFEH.....	88
FIGURA 39 – Varredura de tensão para determinação de comportamento viscoelástico linear para GelGGFISFEH (■ 0,1 rad/s, ◆ 1 rad/s, ● 10 rad/s e ▲ 20 rad/s) e Hilano G-F 20 (■ 0,1 rad/s, ◆ 0,63 rad/s, ● 6,3 rad/s e ▲ 18,8 rad/s) a 36°C.....	90
FIGURA 40 – Análise do comportamento viscoelástico para GelGGFISFEH (▲ G', △ G'') e Hilano G-F 20 (■ G', □ G'') a 36°C.....	91
FIGURA 41 – Análise do comportamento viscoelástico para GelGGFISFEH (▲ G', △ G'') e Hilano G-F 20 (■ G', □ G'') a 36°C na faixa de frequência de movimentação do joelho.....	92
FIGURA 42 – Análise do comportamento viscoelástico para GelGGFISFEH e Hilano G-F 20 (■ G', □ G'') a 36°C, e frequência de 2 rad/s.....	93
FIGURA 43 - Espectro de UV para as várias soluções padrão de glutaraldeído em tampão fosfato (pH = 7,3) e ampliação na região de comprimento de onda de 280nm.....	95
FIGURA 44 - Espectro de infravermelho da GGNP e seu gel e GGFISFEH e seu gel.....	96
FIGURA 45 – MEV da GGNP, GELGGNP, GGFISFEH e GelGGFISFEH (aumento de 500X).....	97
FIGURA 46 – MEV do Hilano G-F 20 dialisado e liofilizado (aumento de 500X e 1000X).....	98
FIGURA 47 – Termograma das amostras de GGNP, GGFISFEH e dos seus géis obtida em atmosfera de ar sintético.....	99
FIGURA 48 - Espectro de infravermelho de GGFISFEH, GGOXID e GGSULF.....	102
FIGURA 49 - Espectro de RMN- ¹³ C da goma GGFISFEH não modificada em D ₂ O.....	104
FIGURA 50 - Espectro de HMQC da goma não modificada GGFISFEH em D ₂ O.....	106
FIGURA 51 - Espectro de ¹³ C da goma não modificada GGFISFEH e da goma modificada por oxidação GGOXID em D ₂ O.....	108

FIGURA 52 – Estrutura da guar mostrando as hidroxilas que podem ser oxidadas pelo reagente TEMPO. M= manose e G= galactose. [Sierakowski e col., 2000].....	109
FIGURA 53 - Espectro de HMQC da goma modificada GGOXID em D ₂ O.....	110
FIGURA 54 - Espectro de HMQC da GGFISFEH e da goma modificada por oxidação GGOXID em D ₂ O.....	111
FIGURA 55 - Espectro de ¹³ C da goma não modificada GGFISFEH e da goma modificada por sulfatação GGSULF em D ₂ O.....	113
FIGURA 56 - Espectro de DEPT da goma modificada por sulfatação GGSULF em D ₂ O.....	114
FIGURA 57 - GPC de GGFISFEH, GGOXID e GGSULF em solução salina de NaNO ₃	115
FIGURA 58 - Gráfico de η_{esp}/c <i>versus</i> concentração para GGFISFEH, GGOXID e GGSULF em solução de NaCl 0,1M.....	117
FIGURA 59 - Gráfico de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento para GGFISFEH, GGOXID e GGSULF em solução aquosa 1% a 25°C.....	118
FIGURA 60 - Curvas termogravimétricas e DTG das amostras de GGFISFEH, GGOXID e GGSULF em ar sintético.....	119
FIGURA 61 - Espectro de absorção no infravermelho da quitina e do derivado QCMT.....	126
FIGURA 62 - Espectro de RMN de ¹³ C/MAS da quitina [Paulino e col., 2001].....	127
FIGURA 63 - Espectro de RMN de ¹³ C da quitina carboximetilada QCMT em D ₂ O.....	128
FIGURA 64 - Espectro de DEPT 135 da quitina carboximetilada QCMT em D ₂ O.....	129
FIGURA 65 – Gráfico de Zimm da quitina carboximetilada em solução salina de NaNO ₃ 0,1M.....	130
FIGURA 66 - Curvas termogravimétricas e DTG das amostras de Quitina e QMTL em ar sintético.....	131
FIGURA 67 - Efeito da administração intra-articular de soluções de GG sobre a incapacitação articular em joelhos de ratos.....	133
FIGURA 68 - Efeito da administração intra-articular de soluções de GG sobre a celularidade em joelhos de ratos.....	134

FIGURA 69 - Efeito da administração intra-articular de preparações (solução e gel) de GG sobre a incapacitação articular em joelhos de ratos.	135
FIGURA 70 - Efeito da administração intra-articular de preparações de GG sobre a celularidade em joelhos de ratos.	136
FIGURA 71 - Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução (a) ou reticulada (gel) (b) e Hilano G-F 20 (c) em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA) - curso temporal.	138
FIGURA 72 - Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução ou reticulada (gel) e Hilano G-F 20 sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção fazem Ligamento Cruzado Anterior (LCA).	139
FIGURA 73 - Efeito terapêutico local de preparações quimicamente modificadas de goma guar sobre a dor articular, na fase inicial da OA por TLCA em ratos.	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

η_{red} : viscosidade reduzida

η_{esp} : viscosidade específica

$[\eta]$: viscosidade intrínseca

ABS: absorvância

ACMA: ácido monocloroacético

AH: ácido hialurônico

ANOVA: análise de variância

AUC: área sob a curva (*area under curve*)

D₂O: água deuterada

dL/g: decilitro por grama

DTG: derivada da análise termogravimétrica

e. p. m.: erro padrão da média

EDTA: etilenodiamino-tetra-acetado sódico

G': módulo de cisalhamento elástico

G'': módulo de cisalhamento viscoso

GG: goma guar

GA: glutaraldeído

GAGs: glicosaminoglicanos

GELGGFISFEH: gel de goma guar GGFISFEH

GelGGNP: gel de goma guar GGNP

GELSERVA: gel de goma guar GGNP obtida pela reticulação com glutaraldeído da SERVA

GELVETEC: gel de goma guar GGNP obtida pela reticulação com glutaraldeído da VETEC

GGENZ: goma guar purificada pelo método enzimático

GGFEH: goma guar purificada pelo método Fehling

GGFIS: goma guar pelo método físico

GGFISFEH: goma guar purificada pelo método físico+Fehling

GGNP: goma guar não purificada

GGOXID: goma guar GGFISFEH oxidada com TEMPO

GGSULF: goma guar GGFISFEH sulfatada

GPC: cromatografia de permeação em gel

GS: grau de substituição

I: intensidade do sinal no ICP-OES

ICP-OES: espectrometria de emissão atômica por plasma induzido

LCA: ligamento cruzado anterior

MEV: microscopia eletrônica de varredura

\bar{M}_v : massa molar viscosimétrica média

\bar{M}_w : massa molar ponderal média

NAIVE: animal saudável

NT: animal não tratado

OA: osteoartrite

p: nível de significância estatística

PBS: salina tamponada em fosfato (*phosphate-buffered saline*)

ppm: parte por milhão

QCMT: quitina carboximetilada

RMN: ressonância magnética nuclear

rpm: rotações por minuto

SHAM: falso operado

TEMPO: *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina

TFA: ácido trifluoroacético

T_i : temperatura inicial de decomposição

TLCA: transecção do ligamento cruzado anterior

T_{max} : temperatura máxima de decomposição

TSP: tempo de suspensão da pata

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. O AMBIENTE INTRA-ARTICULAR.....	01
1.2. O LÍQUIDO SINOVIAL.....	02
1.3. O ÁCIDO HIALURÔNICO	03
1.4. A CARTILAGEM ARTICULAR	09
1.5. A LUBRIFICAÇÃO ARTICULAR.....	14
1.6. OSTEOARTRITE.....	15
1.7. VISCOSSUPLEMENTAÇÃO.....	16
1.8. GOMA GUAR.....	19
1.9. QUITINA.....	23
1.10. MODIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	25
1.10.1. Oxidação.....	25
1.10.2. Sulfatação.....	29
1.10.3. Carboximetilação.....	31
1.10.4. Reticulação.....	35
2. OBJETIVOS	39
2.1. OBJETIVO GERAL.....	39
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	41
3.1. MATERIAS	41
3.2. PURIFICAÇÃO DA GOMA GUAR	41

3.2.1. Métodos de purificação.....	41
3.2.1.1. Método Enzimático.....	41
3.2.1.2. Método Físico.....	42
3.2.1.3. Método Fehling.....	43
3.2.1.4. Método Físico+Fehling.....	43
3.3. REAÇÃO DE RETICULAÇÃO.....	44
3.3.1. Teste de reticulação de diversos polissacarídeos.....	44
3.3.2. Reticulação da goma guar.....	45
3.3.2.1. Efeito das condições reacionais na reticulação da goma guar.....	46
3.3.2.1a - Proporção de glutaraldeído/goma guar.....	46
3.3.2.1b - Tipo de glutaraldeído.....	46
3.3.2.2. Procedimento de obtenção dos géis fluidos das gomas GGNP e GGFISFEH.....	46
3.4. MODIFICAÇÃO DA GOMA GUAR – INTRODUÇÃO DE GRUPOS CARREGADOS	47
3.4.1. Oxidação da goma guar GGFISFEH.....	47
3.4.2. Sulfatação da goma guar GGFISFEH.....	48
3.5. CARBOXIMETILAÇÃO DA QUITINA.....	49
3.5.1. Procedimento básico de carboximetilação.....	49
3.5.2. Avaliação dos fatores que podem influenciar a carboximetilação da quitina.....	49
3.6. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	51
3.6.1. Análise Elementar – Teor de proteínas.....	51
3.6.2. Determinação do teor de cobre por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES).....	51
3.6.3. Determinação da composição monossacarídica.....	52
3.6.4. Determinação do teor de ácido urônico.....	53
3.6.5. Determinação do grau de substituição por titulação potenciométrica.....	54
3.6.6. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	54
3.6.7. Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	55
3.6.8. Determinação da viscosidade intrínseca.....	55
3.6.9. Estimativa da distribuição de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	56

3.6.10. Espalhamento de luz estático.....	56
3.6.11. Análises Reológicas.....	57
3.6.11.1. Reologia de fluxo.....	57
3.6.11.2. Reologia oscilatória.....	57
3.6.12. Turbidez	57
3.6.13. Análise termogravimétrica.....	57
3.6.14. Conteúdo de água e teor de glutaraldeído nos géis de GGNP e GGFISFEH.....	58
3.6.15. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das gomas e dos géis.....	59
3.7. TESTES FARMACOLÓGICOS.....	59
3.7.1. Efeito de preparações de goma guar em cavidades articulares de ratos (influência da pureza e da viscosidade da goma guar na ação per si)	59
3.7.1.1. Manipulação Farmacológica.....	60
3.7.1.2. Medida da Incapacitação Articular – Hiperalgisia (Dor).....	60
3.7.1.3. Análise de Influxo Celular (Inflamação).....	61
3.7.2. Ação da GGFISFEH e GelfISFEH na osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior.....	62
3.7.2.1. Modelo de Osteoartrose por Transecção do ligamento cruzado anterior.....	62
3.7.2.2. Manipulação farmacológica.....	63
3.7.3. Análise estatística.....	63
4.1. PURIFICAÇÃO DA GOMA GUAR.....	64
4.1.1. Rendimento dos métodos de purificação.....	64
4.1.2. Caracterização das amostras.....	65
4.1.2.1. Análise Elementar – Teor de proteínas.....	65
4.1.2.2. Teor de ácido urônico e composição monossacarídica.....	66
4.1.2.3. Determinação do teor de cobre na amostra de GGFISFEH por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES).....	68
4.1.2.4. Determinação da viscosidade intrínseca e da massa molar viscosimétrica média.....	69
4.1.2.5. Estimativa da distribuição de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	71

4.1.2.6. Estudo reológico das amostras de goma.....	73
4.1.2.7. Turbidez.....	75
4.1.2.8. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³ C.....	76
4.1.2.9. Análise Termogravimétrica.....	79
4.2. RETICULAÇÃO DE DIVERSOS POLISSACARÍDEOS.....	82
4.3. RETICULAÇÃO DA GOMA GUAR	84
4.3.1. Fatores que influenciam a reação de reticulação.....	84
4.3.1.1. Proporção de goma guar/glutaraldeído.....	84
4.3.1.2. Tipo de glutaraldeído.....	85
4.3.2. Reticulação da GGNP e GGFISFEH.....	86
4.3.2.1. Reologia comparativa da goma GGNP e GGFISFEH, dos seus géis GelGGNP, GelGGFISFEH e do Hilano G-F 20.....	86
4.3.2.2. Reologia Oscilatória dos GelGGFISFEH e do Hilano G-F 20.....	88
4.3.3. Caracterização comparativa da goma GGNP e GGFISFEH com seus géis.....	94
4.3.3.1. Conteúdo de água e teor de glutaraldeído	94
4.3.3.2. Infravermelho da GGNP e GGFISFEH e dos seus respectivos géis.....	96
4.3.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da GGNP, GGFISFEH e dos seus géis.....	97
4.3.3.4. Análise termogravimétrica da GGNP, da GGFISFEH e dos seus géis.....	99
4.4. MODIFICAÇÃO DA GOMA GUAR - INTRODUÇÃO DE GRUPOS CARREGADOS.....	102
4.4.1. Rendimento das reações de modificação da GGFISFEH.....	102
4.4.2. Caracterização da goma não modificada GGFISFEH e das modificadas GGOXID e GGSULF.....	102
4.4.2.1. Infravermelho.....	102

4.4.2.2. Determinação do teor de ácido urônico e grau de substituição.....	103
4.4.2.3. Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C e ¹ H.....	104
4.4.2.4. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	115
4.4.2.5. Espalhamento de Luz para cálculo de massa molar ponderal média.....	116
4.4.2.6. Viscosidade Intrínseca.....	116
4.4.2.7. Reologia Rotacional das soluções aquosas.....	117
4.4.2.8. Análise Termogravimétrica.....	118
4.5. CARBOXIMETILAÇÃO DA QUITINA.....	121
4.5.1. Fatores reacionais que podem influenciar no grau de substituição.....	121
4.5.2. Caracterização da Quitina e do derivado carboximetilado (QCMT).....	125
4.5.2.1. Espectro de infravermelho.....	125
4.5.2.2. Espectro de RMN de ¹³ C da quitina carboximetilada QCMT.....	126
4.5.2.3. Determinação da massa molar da quitina carboximetilada (QCMT).....	130
4.5.2.4. Análise Termogravimétrica.....	130
4.6. TESTES FARMACOLÓGICOS.....	133
4.6.1. Efeito de preparações de goma guar em cavidades articulares de ratos.....	133
4.6.2. Efeito da administração intra-articular terapêutica de goma guar (gel e solução) e do Hilano G-F 20 sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior.....	137
4.6.3. Efeito da administração intra-articular terapêutica de goma guar sem modificação (GGFISFEH) e modificadas (GGOXID e GGSULF) sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior.....	141

5. CONCLUSÕES.....	144
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
7. TRABALHOS FUTUROS.....	164
8. ANEXOS.....	165



1. Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1. O AMBIENTE INTRA-ARTICULAR

Uma articulação é o local onde dois ossos fazem contato, independente do grau de movimento permitido por esta junção [Stanley, Francone e Lossow, 1990]. As articulações têm, como papel primário, prover a estabilidade e a mobilidade do esqueleto. Elas são estruturas complexas e seus componentes apropriados para as diferentes condições mecânicas e biológicas sobre as quais elas funcionam no organismo [Gerwin, Hops e Lucke, 2006].

As articulações sinoviais são articulações de movimentos livres, com uma cavidade articular contida em uma cápsula articular de tecido conjuntivo fibroso denso, revestida por um tecido conjuntivo vascular, conhecido como membrana sinovial, responsável pela produção de líquido sinovial. As superfícies ósseas expostas estão cobertas com cartilagem, e essa cartilagem articular, lubrificada pelo líquido sinovial, mantém a superfície lisa [Stanley, Francone e Lossow, 1990]. A articulação do joelho é classificada como uma articulação sinovial [Stanley, Francone e Lossow, 1990]. A maioria das variedades de artrite envolve algumas ou todas as estruturas que compreendem articulações sinoviais.

Na Figura 1 é apresentado um esquema da articulação do joelho [LPCH, 2006].

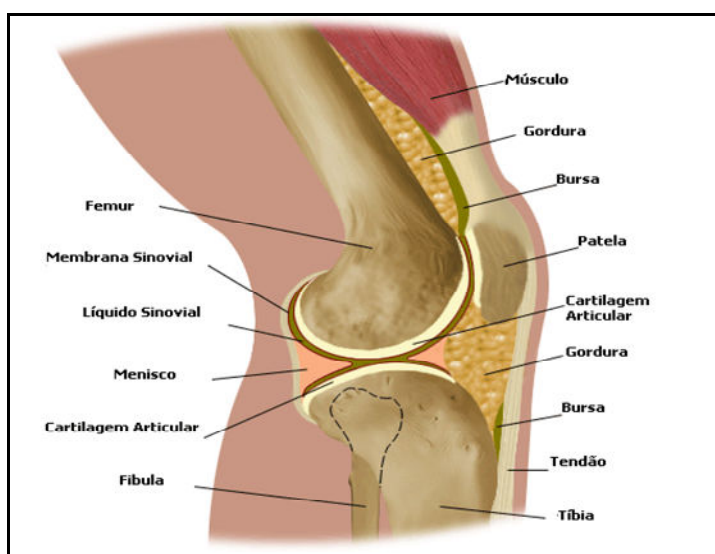


FIGURA 1 – Esquema da articulação do joelho

De uma forma geral, formam a articulação do joelho, os seguintes componentes [Golding, 1996]:

1. Cavidade articular (Espaço articular): Normalmente, é um espaço que contém apenas uma película de líquido sinovial, sendo revestido pela membrana sinovial.

2. Cartilagem articular: Recobre a superfície articular. A cartilagem é formada por: a) fibras colágenas do tipo II; b) substância fundamental composta principalmente por proteoglicanos e c) células da cartilagem (condrócitos). Ela tem consistência esponjosa e nela não há nervos nem vasos sanguíneos. Nutre-se a partir do líquido sinovial.

3. Ligamentos e cápsulas articulares: Unem as extremidades articulares do osso. Consistem de feixes de fibras de colágeno. Contém terminações nervosas e receptores de dor.

4. Membrana sinovial: Reveste a cápsula e recobre todas as estruturas intra-articulares, exceto a cartilagem articular, que está, desta forma, em contato direto com o líquido sinovial.

1.2. O LÍQUIDO SINOVIAL

O espaço articular encontra-se preenchido pelo líquido sinovial, obtido por ultrafiltração do plasma sanguíneo através de capilares sinoviais e posterior adição de ácido hialurônico [Edwards, 2003].

O líquido sinovial é um fluído altamente viscoelástico [Pelletier e col., 2001], no qual se encontra o ácido hialurônico, um glicosaminoglicano de alta massa molar, e também células da membrana sinovial [McCarty, 1993]. É um líquido amarelo claro, transparente, com alta viscosidade, pH na faixa de 7,3 a 7,4 que se encontra num volume, em média, de 2 mL por joelho. Em processos inflamatórios este muda suas características se tornando branco e opaco, com viscosidade muito baixa e com um volume maior que 4 mL (por joelho) [McCarty, 1993].

O líquido sinovial tem 95% de água, apresentando viscosidade semelhante à da clara de ovo (Grego *syn*, igual, *ovum*, ovo) justificando a origem do termo [Stanley, Francone e Lossow, 1990]. Apresenta uma concentração de proteínas totais de 1-3 g/100 mL, ácido hialurônico na concentração de 0,35 g/100 mL e também glicose na concentração de 66 mg/100mL [Gerwin, Hops e Lucke, 2006].

Dentre as funções do líquido sinovial em articulações, pode-se destacar a lubrificação da cartilagem articular durante o movimento e a sua nutrição. Uma vez que a cartilagem articular é avascular, não podendo, portanto, conferir aporte nutricional aos condrócitos, postula-se que nutrientes presentes no líquido sinovial possam fluir livremente pela matriz tipicamente hidratada da cartilagem, alcançando os condrócitos [Edwards, 2003].

1.3. O ÁCIDO HIALURÔNICO

Em 1934, Karl Meyer e seu assistente, John Palmer, descreveram um procedimento para o isolamento de um novo glicosaminoglicano retirado do humor vítreo de boi. Eles mostraram que esta substância continha ácido urônico e aminoaçúcar, mas não apresentava sulfoésteres [Meyer e Palmer, 1934]. Denominaram-na de ácido hialurônico.

O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano formado por unidades repetitivas de um dissacarídeo composto de uma unidade de N-acetilglucosamina ligada a uma unidade de ácido glucurônico por ligação β (1 \rightarrow 3). Tais unidades dissacarídicas são unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) (Figura 2).

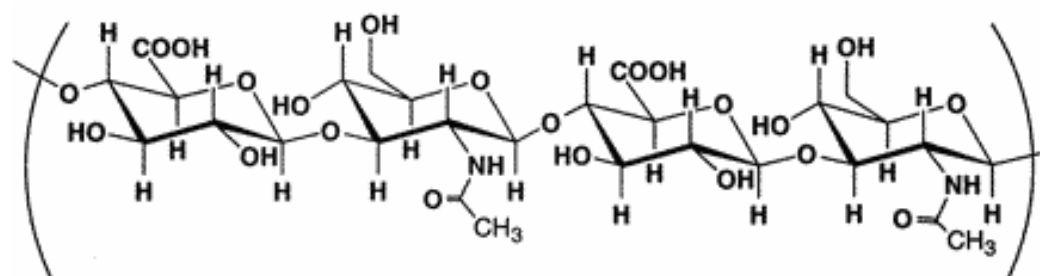


FIGURA 2 - Estrutura do ácido hialurônico

Este ácido está presente na matriz extracelular dos animais superiores, e apesar de estar contido em toda parte do corpo, apresenta-se mais concentrado em determinados tecidos específicos, tais como: cordas vocais, líquido sinovial, cordão umbilical, pele, tecido subcutâneo e cartilagem. Nesses tecidos, o AH influencia na viscosidade, nos processos de osmose, no fluxo de materiais e na absorção de choques [Ward, Thibeault e Gray, 2002]. Ele contribui para as propriedades biomecânicas dos tecidos, ajudando a controlar a hidratação do tecido e o transporte de água, participando ainda em vários processos fisiologicamente importantes via interação com proteínas da superfície das células e proteínas extracelulares [Cowman, Feder-Davis e Hittner, 2001].

O ácido hialurônico participa de uma rede hidratada com fibras de colágeno (por exemplo, no humor vítreo), onde age como um organizador na matrix intercelular distribuindo os glicoconjugados para formar agregados intracelulares [Takehi, Kinoshita e Yasueda, 2003].

A massa molar do AH varia de acordo com o tecido em que é encontrado. Por exemplo, ela é 7×10^6 g/mol no líquido sinovial; 2×10^6 g/mol na cartilagem e 2×10^5 g/mol no pulmão [Bray, 2001]. Com a idade, a massa molar do ácido hialurônico na cartilagem diminui. Em artropatias severas, o líquido sinovial apresenta ácido hialurônico com massa molar reduzida.

As propriedades do AH, que possibilitam a formação de géis hidrofílicos tais como, o humor vítreo e o líquido sinovial, são: capacidade de hidratação, viscosidade, capacidade de auto-agregação e de formação de ligação a sítios específicos em muitas proteínas [Bray, 2001].

Quanto à sua capacidade de hidratação, o ácido hialurônico existe em solução com uma configuração de espiral flexível que é altamente hidratada, contendo aproximadamente 1000 vezes mais água do que o polímero estendido. A sua capacidade de hidratação é determinada por sua massa molar, com contribuição das cargas negativas da estrutura deste ácido, devido aos grupos carboxílicos que fazem a expansão da espiral e do volume de água envolvido na estrutura desta molécula [Bray, 2001].

O modelo de Heatley e Scott [1988] sugere que as moléculas de água são ligadas à cadeia de ácido hialurônico por ligações de hidrogênio com alguma regularidade. Quando estruturas abertas são requeridas nos tecidos para permitir, por exemplo, migração celular, a quantidade desse polissacarídeo é aumentada. A hidratação deste ácido para um volume molecular maior também explica o efeito de atenuação da perda de fluidez nas articulações [Scott e col., 2000]. Tal efeito não pôde ser reproduzido pela dextrana de mesma massa molar.

Quanto à viscosidade, as soluções de AH são viscosas, sendo essa propriedade dependente da massa molar do ácido e da sua concentração em solução.

A sua terceira propriedade - capacidade de auto-agregação, foi demonstrada por microscopia de força atômica. Tal propriedade não está limitada apenas a moléculas deste ácido com altas massas molares, mas também às de baixa massa molar [Bray, 2001].

A quarta propriedade do ácido hialurônico é a habilidade de se ligar a sítios específicos em muitas proteínas. Este ácido organiza a matriz pericelular de muitas células através desta habilidade de se ligar a proteínas da matriz e a receptores na superfície celular. As propriedades físicas da cartilagem são influenciadas tanto pela massa molar do ácido hialurônico quanto por sua concentração, apesar da baixa concentração deste ácido no proteoglicano da cartilagem (1 parte de ácido para 75 partes do proteoglicano) [Bray, 2001].

O ácido hialurônico pode ser obtido comercialmente, do humor vítreo bovino, da crista de galináceos, do cordão umbilical e também pode ser produzido por algumas bactérias como *Streptococcus zooepidemicus* [Kakehi, Kinoshita e Yasueda, 2003].

Alterações no metabolismo, na distribuição e função do AH têm sido documentadas em muitas doenças, tais como: osteoartrite, doenças pulmonares e vasculares e também em câncer [Kakehi, Kinoshita e Yasueda, 2003].

As aplicações biomédicas de maior sucesso do hialuronato de sódio são na cirurgia estética e no tratamento de osteoartrite. A aplicação em oftalmologia é outra opção também importante [Kakehi, Kinoshita e Yasueda, 2003].

Estrutura em solução e viscoelasticidade

Em solução fisiológica, a cadeia central da molécula do ácido hialurônico está estendida devido à combinação da estrutura do dissacarídeo, ligações de hidrogênio internas e às interações com o solvente. Os átomos de hidrogênio axiais formam uma face não polar relativamente hidrofóbica (Figura 3), enquanto que o lado equatorial da cadeia forma uma face mais polar e hidrofílica, resultando desse modo em uma torção da estrutura de fita [Weissman, B. e Meyer, 1954]. Consequentemente, a molécula do AH assume uma estrutura de espiral aleatória em condições fisiológicas (Figura 4) [Hascal e Laurent, 2006].

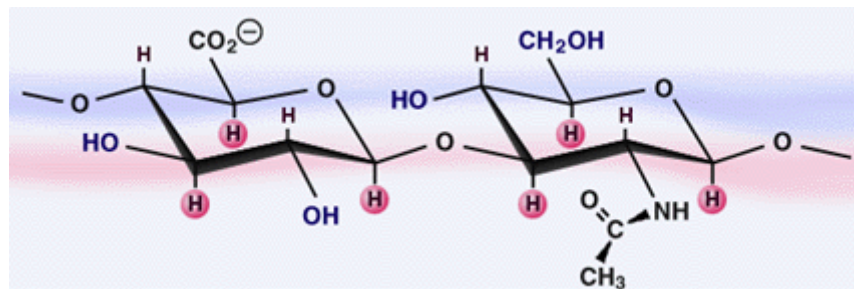


FIGURA 3 - Estrutura do ácido hialurônico ressaltando os átomos de hidrogênio axial

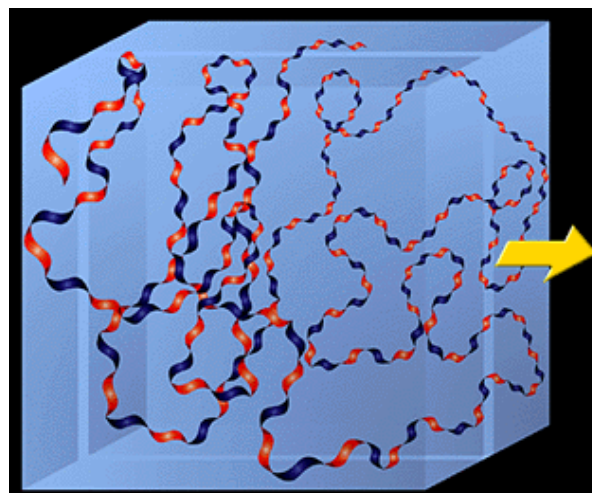


FIGURA 4 – Esquema da estrutura tridimensional de espiral aleatória do ácido hialurônico em condições fisiológicas. O lado onde a fita apresenta cor azul representa a face hidrofílica e o lado onde a fita apresenta cor vermelha representa a face hidrofóbica da estrutura de fita do ácido hialurônico.

A alta massa molar e a concentração de ácido hialurônico nos tecidos possibilitam que, em solução, as moléculas possam interagir formando redes entrelaçadas entre partes da mesma molécula ou entre moléculas diferentes. Estas interações podem ocorrer reversivelmente. Estas redes apresentam propriedades diferentes das moléculas do AH sozinhas. Quando estas moléculas são submetidas a um fluxo rápido, a carga e a força de cisalhamento são então distribuídas sobre estas redes, caracterizando assim um comportamento elástico desta solução [Hascal e Laurent, 2006].

Por outro lado, um fluxo lento de longa duração pode separar parcialmente estas moléculas, alinhando-as, permitindo assim o movimento. Este segundo comportamento está associado à viscosidade da solução deste polissacarídeo (Figura 5).

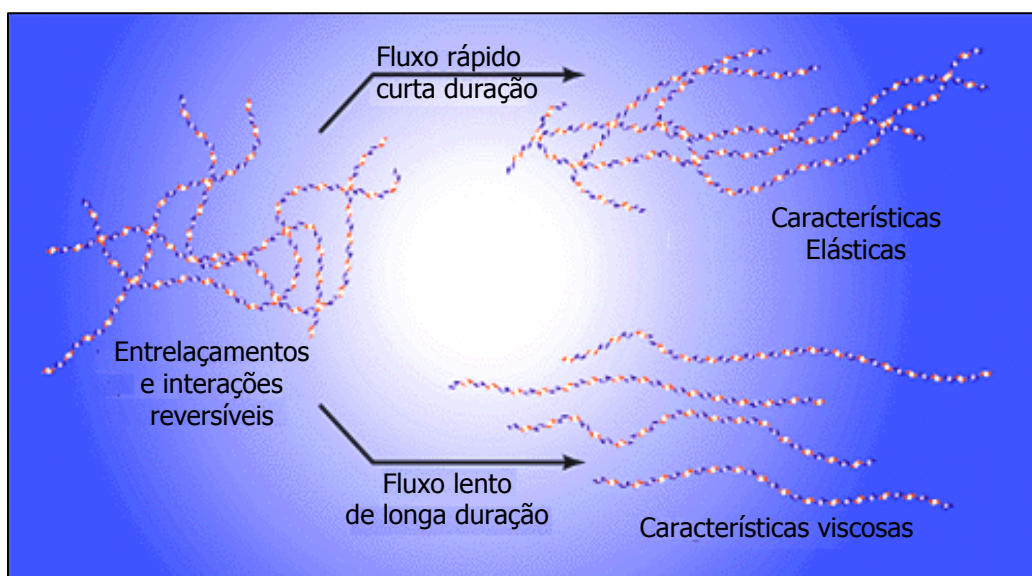


FIGURA 5 – Modelo mostrando as propriedades viscosas e elásticas das soluções de ácido hialurônico.

Procedimentos têm sido desenvolvidos para a modificação do ácido hialurônico através de reações de reticulação, objetivando a formação de ligações cruzadas, criando assim redes estáveis e materiais semi-sólidos que exibem propriedades viscoelásticas pronunciadas [Hascal e Laurent, 2006].

O ácido hialurônico e a lubrificação articular

O interesse pelo papel do ácido hialurônico começou quando foi encontrado que este é o maior constituinte de uma camada de 1-2 μm na superfície da cartilagem tal como o maior constituinte de líquido sinovial [Kirwan, 2001].

O comportamento do AH varia com a intensidade de cisalhamento ao qual é exposto. Em baixas velocidades de cisalhamento, a solução é viscosa e relativamente inelástica, já em altas velocidades de cisalhamento, a solução é extremamente elástica. Portanto, as soluções de ácido hialurônico podem agir como lubrificante em movimentos lentos e como absorvedor de choques quando os movimentos são rápidos [Kirwan, 2001].

Devido ao seu grande número de cargas negativas, as cadeias do AH tendem a se estender em solução e repelir umas às outras, sendo circundadas por moléculas de água (Figura 6). Quando reunidas, elas deslizam umas sobre as outras. Isto produz a consistência escorregadia das secreções mucosas e do líquido sinovial. Quando uma solução de ácido hialurônico é comprimida, a água é forçada para fora e as moléculas são forçadas a ocupar um volume menor. Quando a compressão é liberada, as moléculas voltam novamente a seu volume original, hidratado, devido à repulsão de suas cargas negativas [Champe, Harvey, 1997].

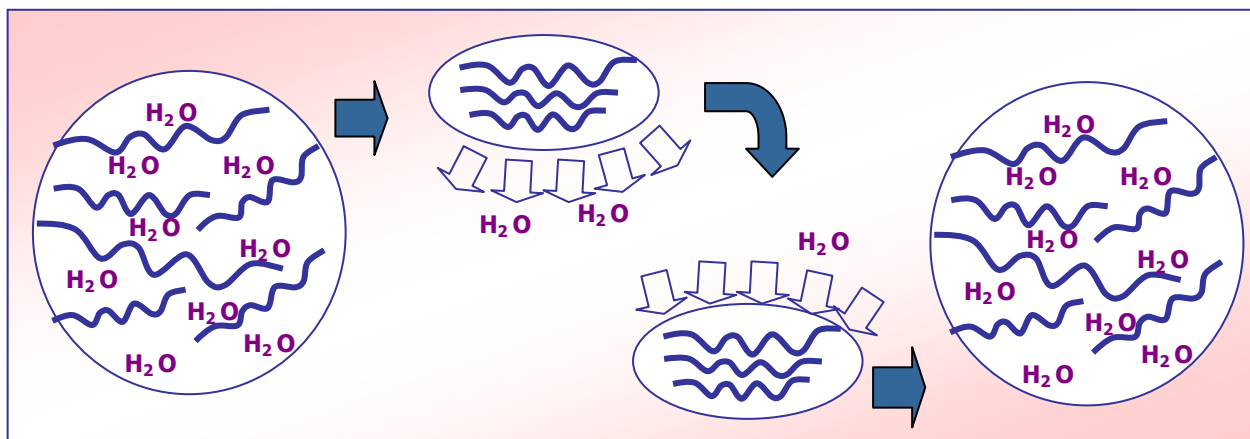


FIGURA 6 – Esquema da hidratação do ácido hialurônico [Champe, Harvey, 1997].

Dentro da junta, o AH permeia a superfície da cartilagem articular e a matriz intercelular do tecido sinovial e da cápsula. Com o movimento, há mudança contínua da quantidade desse ácido no compartimento da junta [Kirwan, 2001].

Balazs [1993] demonstrou que as propriedades reológicas do AH são àquelas que governam sua performance biológica. Entretanto, embora tenha sido atribuída uma função apenas lubrificante e amortecedora das soluções de ácido hialurônico para a viscosuplementação, estudos têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios e condroprotetores da viscosuplementação como responsáveis por parte do seu efeito terapêutico [Kirwan, 2001].

1.4. A CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem é um tecido conjuntivo encontrado entre as superfícies das juntas articulares, cuja principal função é suportar o estresse durante o movimento da articulação. Ela é um biocompósito complexo que possui alta dureza e resistência e capacidade de absorver choques [Seog e col., 2002]. A cartilagem articular é composta principalmente de uma rede altamente hidratada de colágeno, na qual cadeias de hialuronato estão associadas aos proteoglicanos [Pelletier e col., 2001]. Na cartilagem, apenas 5% do volume é ocupado pelos condrócitos (células da cartilagem) [Kuetmer, Thonar, Aydelotte, 1990].

A principal função das fibras de colágeno é dar suporte estrutural para a matriz da cartilagem. As fibras de colágeno resistem de forma efetiva às forças de tração aplicadas sobre a cartilagem. Como são altamente hidrofílicos, os proteoglicanos absorvem água e aumentam em muitas vezes o seu tamanho original, formando um gel livre, se não tiverem nenhuma restrição. Quando restringidos pelas fibrilas de colágeno, a interação entre a água e os proteoglicanos cria uma pressão osmótica de inchamento, que confere à cartilagem a sua turgidez articular normal [Kuetmer, Thonar, Aydelotte, 1990].

De modo geral, os condrócitos e o colágeno são orientados dentro da matriz da cartilagem de maneira a permitir uma maior resistência diante das forças a que a articulação pode estar submetida. Morfologicamente, há um padrão

baseado na organização dos condrócitos, orientação das fibrilas de colágeno e a distribuição de proteoglicanos (Figura 7). Esta orientação das fibras de colágeno e proteoglicanos forma um material composto, reforçado pelas fibras, que resiste às forças de compressão e tração sem sofrer danos, e impede ou dificulta a transmissão destas forças ao osso subcondral subjacente [Kuetmer, Thonar, Aydelotte, 1990]. A ruptura desta organização é o marco da osteoartrite.

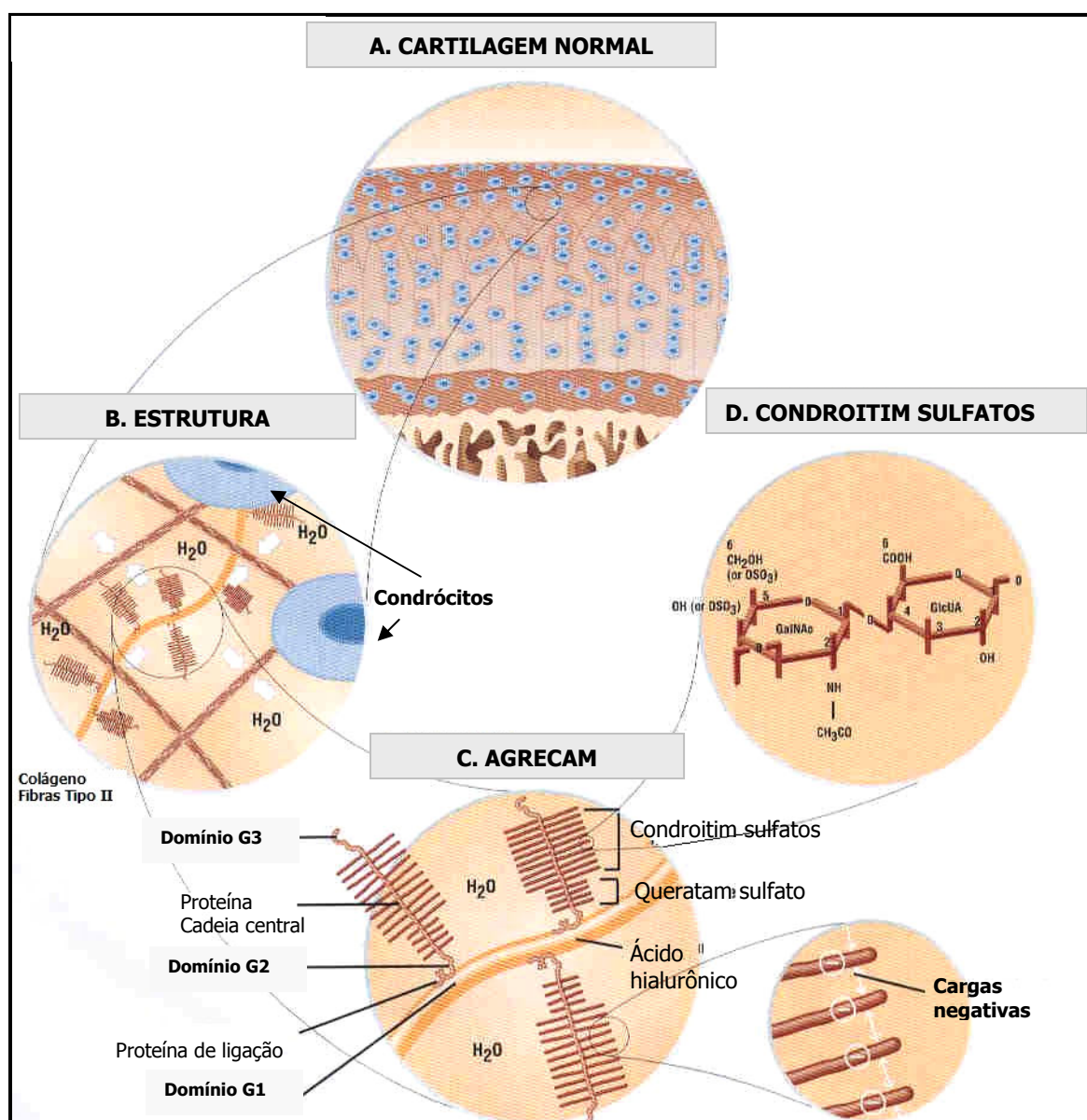


FIGURA 7 - Componentes da cartilagem normal. (A) Diagrama da cartilagem normal; (B) Na cartilagem normal, a interação entre fibrilas de colágeno, proteoglicanos e água confere estabilidade à cartilagem articular normal; (C) Componentes de um agregado de agreganos; (D) Subunidade de dissacarídeo que se repete nos glicosaminoglicanos condroitim-4,6-sulfato.

Os proteoglicanos são formados pela associação de muitas moléculas de glicosaminoglicano, tais com condroitim-4,6-sulfatos e queratam sulfato, ligadas a uma proteína central. Estes proteoglicanos formam agregados compostos por uma fita muito comprida de hialuronato, à qual estão ligados de forma não-covalente e em intervalos de 40 nm, numerosas moléculas da proteína central (Figura 8). As ligações covalentes entre os glicosaminoglicanos e as proteínas são ligações glicosídicas entre os resíduos de açúcar e os grupos hidroxila de resíduo de serina da proteína. A associação entre a proteína central do proteoglicano e o ácido hialurônico são interações de natureza iônica, sendo que esta associação é estabilizada por pequenas proteínas adicionais chamadas de proteína de ligação.

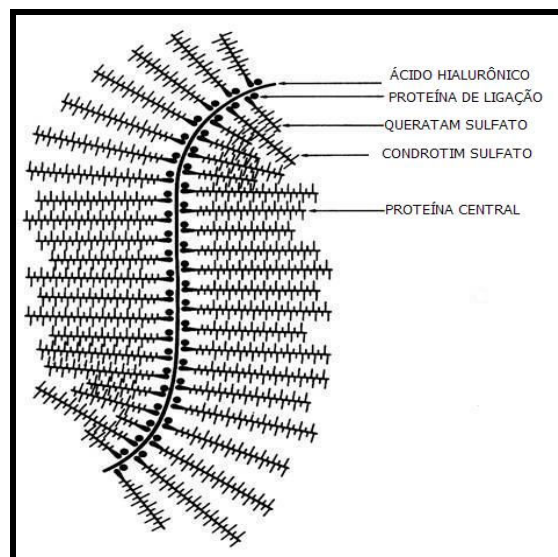


FIGURA 8 – Estrutura característica de um agregado de proteoglicano.

A proteína central do proteoglicano tem massa molar de 230.000 g/mol, consistindo de três domínios globulares, G1, G2 e G3, nos quais o queratam sulfato e os condroitim sulfatos ligam-se aos domínios localizados entre os domínios G2 e G3. Uma pequena quantidade está localizada entre os domínios G1 e G2 (Figura 9). A região do domínio globular G1 é aquela região que interage com o ácido hialurônico e a proteína de ligação [Knudson e Knudson, 2001]

Um proteoglicano típico da cartilagem humana, o agregam (Figura 9), contém perto de 150 cadeias de polissacarídeo ligadas covalentemente com cadeias laterais, a cada molécula de proteína central. Quando uma centena de moléculas, ou mais, destas proteínas liga-se a uma única molécula de hialuronato, o agregado de proteoglicanos resultante e a sua água de hidratação ocupam um volume aproximadamente igual à de uma célula bacteriana inteira [Lehninger, Nelson e Cox, 2000].

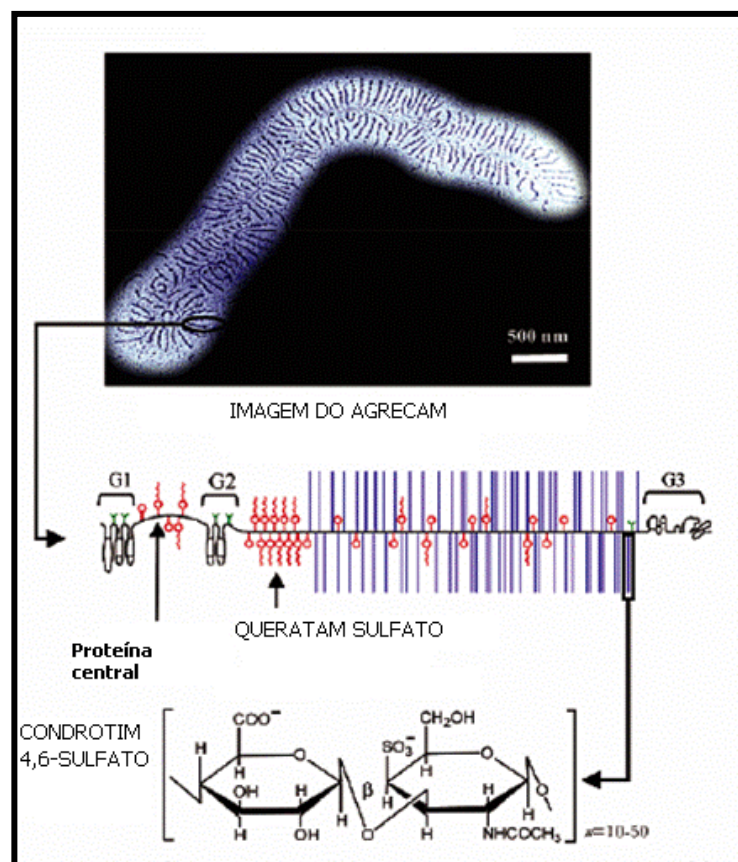


FIGURA 9 – Microscopia eletrônica do agregado de agregam e a ilustração de como ele se forma [Seol e col., 2002].

O agregam é um proteoglicano que tem como papel primário fornecer resistência osmótica necessária para a cartilagem resistir à compressão, quando esta é submetida a cargas [Knudson e Knudson, 2001]. Os glicosaminoglicanos são cadeias de unidades de dissacarídeos que se repetem e têm carga negativa. Esta carga negativa faz com que haja uma repelência entre eles, resultando em

resistência à compressão. O comprimento dos agregados de agregam depende da localização e da condição da cartilagem articular. Os proteoglicanos conferem rigidez compressiva à cartilagem [Seog e col., 2002].

O queratam sulfato é um glicosaminoglicano composto por um dissacarídeo de N-acetilglucosamina e galactose, não apresentando ácido urônico. Seu conteúdo de sulfato é variável, e pode estar presente no C6 de qualquer um dos açúcares. A ligação glicosídica entre a N-acetilglucosamina e a galactose é β 1-4 e entre as unidades dissacarídicas é β 1-3 [Champe e Harvey, 1997].

Os polissacarídeos condroitim-4,6-sulfato são carregados negativamente, sendo polieletrólitos composto pela repetição de 10 a 50 unidades do dissacarídeo N-acetil galactosamina e ácido glucurônico Figura 10 [Suh, Matthew,2000].. São extremamente substituídos com ésteres de sulfato nos C4 e C6 dos resíduos de hexosamina. Entre as unidades dissacarídicas, a ligação glicosídica é β 1-4 e entre o ácido glucurônico e N-acetil galactosamina é β 1-3. Como parte da molécula de agregam, as moléculas individuais destes polissacarídeos têm tendência a assumir uma conformação de bastão estendido (Figura 7c) preferencialmente à de espiral aleatória que elas assumem em condições fisiológicas (salina 0,15M). Isso ocorre devido à repulsão eletrostática intramolecular entre os grupos carboxilato e sulfato vizinhos [Seog e col., 2002]. Estes polissacarídeos são os maiores determinantes da capacidade que tem a cartilagem para resistir à compressão [Seog e col., 2002].

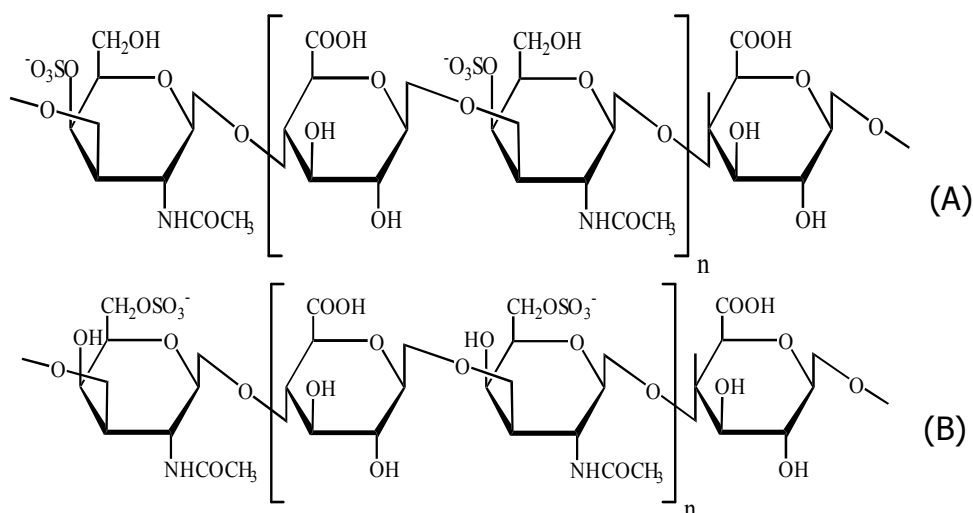


FIGURA 10 - Estruturas do (A) condroitim-4-sulfato e (B) condroitim-6-sulfato.

A alta densidade de carga torna os glicosaminoglicanos sulfatados altamente solúveis. Muitos estudos clínicos demonstram a sua atividade anti-inflamatória da administração oral em pacientes com osteoartrite, melhorando as funções da articulação e reduzindo a dor [Wang, Wang e Chaing, 2002].

O efeito condroprotetor dos glicosaminoglicanos polissulfatados já foi demonstrado experimentalmente [Hannan e col., 1987]. O condroitim-4,6-sulfato tem sido investigado em estudos bioquímicos graças ao seu papel na fisiologia da cartilagem articular [Pipitone, 1991].

1.5. A LUBRIFICAÇÃO ARTICULAR

A lubrificação articular é muito eficiente, possuindo um baixo coeficiente de fricção. Ela depende das propriedades da cartilagem articular e do líquido sinovial. O líquido sinovial, em condições normais, é não-Newtoniano, isto é, quanto mais rápida a articulação se move, menos viscoso ele se torna (comportamento pseudoplástico). O líquido se torna Newtoniano, em condições inflamatórias [Golding, 1996].

Os mecanismos de lubrificação sinovial funcionam para minimizar a fricção sobre a cartilagem articular em uma extensão tal que, normalmente, durante o movimento, menos fricção é criada do que no caso de gelo deslizando sobre gelo [Stanley, Francone e Lossow, 1990].

Várias teorias já foram propostas para explicar como ocorre a lubrificação das articulações sinoviais. Uma delas sugere um tipo de lubrificação hidrodinâmica, onde um líquido incompressível circula através da articulação durante o movimento. Nenhuma superfície da articulação se encaixa na outra perfeitamente; contudo um efeito almofada deve ser fornecido. O líquido sinovial agiria mantendo a pressão em pontos necessários dentro da articulação. Este efeito de acolchoamento é complementado por uma espécie de lubrificação exsudada à medida que o líquido sinovial goteja da cartilagem articular, porosa e cheia de líquido, sob pressão [Stanley, Francone e Lossow, 1990].

Uma outra teoria sugere que quando a compressão retém o líquido em sulcos irregulares, somente frações móveis de pequenas moléculas passam para a cartilagem e o ácido hialurônico fica mais concentrado, tornando o sistema mais viscoso e, por conseguinte, o revestimento mais eficaz para proteger e lubrificar as superfícies [Stanley, Francone e Lossow, 1990].

1.6. OSTEOARTRITE

A artrite (G. *arthron*, articulação; G. *itis*, inflamação) é uma das mais comuns e dolorosas anormalidades do sistema articular [Stanley, Francone e Lossow, 1990]. Existem vários tipos de artrites, sendo a osteoartrite, a mais comum delas. Ela prevalece em 60% dos homens e 70% das mulheres depois dos 65 anos de idade [Gerwin, Hops e Lucke, 2006]. Segundo dados do Ministério da Saúde, ela atinge cerca de 80% das pessoas acima dos 70 anos. Em números absolutos, estima-se que existam, hoje, aproximadamente 15 milhões de pessoas com osteoartrite no Brasil. É mais comum nas mulheres do que nos homens, e é a principal causa de invalidez no mundo [Neto, 2006].

A osteoartrite (OA) é caracterizada pela deterioração da cartilagem articular e formação de osteófitos nas superfícies da articulação, causando instabilidade desta e dor [Buckwalter e Martin, 2006]. Acomete as articulações, principalmente às do joelho e quadril, produzindo mudanças na cartilagem, no osso subcondral e na membrana sinovial.

Embora a osteoartrite não seja classicamente considerada uma doença inflamatória, evidências recentes sugerem que a ocorrência de inflamação da membrana sinovial é importante na progressão das lesões da cartilagem na OA. A liberação de fragmentos da matriz por ação de enzimas proteolíticas promoveria inflamação sinovial, o que pode refletir em posterior degradação da cartilagem, à maneira de um ciclo vicioso [Pelletier, 2003].

A hiper-hidratação da cartilagem é um evento inicial na osteoartrite e proporcional ao dano sobre a rede de colágeno [Bank e col., 2000]. Em cartilagens osteoartríticas, as fibras colágenas apresentam tanto o comprimento quanto a constante elástica reduzidos, limitando a capacidade da cartilagem em

absorver energia elástica durante a locomoção. É consistente a associação entre essas alterações e os danos no tecido cartilaginoso (perda da camada superficial, formação de fissuras e degradação de proteoglicanos) [Silver e col., 2001].

A perda de proteoglicanos da cartilagem articular é um importante fator na osteoartrite. Em pacientes acometidos por esta doença, as concentrações de condroitim sulfatos e de queratam sulfato encontram-se aumentadas no líquido sinovial [Poole e col., 1994], como produtos de degradação das moléculas de agrecano liberados de seus locais originais na matriz da cartilagem articular.

Na osteoartrite, ocorre uma variação na quantidade e nas características do líquido sinovial, o lubrificante das articulações. Em um líquido sinovial de um joelho acometido com osteoartrite, a massa molar do ácido hialurônico pode reduzir de 10×10^6 g/mol para um valor na ordem de 2×10^5 g/mol. Em adição a isto, o ácido hialurônico é diluído e, portanto, em um estado artrítico, a elasticidade e a viscosidade do líquido sinovial são reduzidas conduzindo a uma queda nas propriedades de lubrificação e de absorção de choques. A cartilagem torna-se, portanto, mais vulnerável [Kirwan, 2001].

Uma alta elastoviscosidade é essencial para a lubrificação e proteção das células da articulação. Nesta doença, a elastoviscosidade do líquido sinovial é diminuída contribuindo possivelmente para o aparecimento de dores nas articulações e o subsequente descréscimo na mobilidade desta, que se deve à diminuição no efeito protetor nos receptores de dor do tecido sinovial [Pozo, Balazs e Belmonte, 1997].

As causas da osteoartrite não são totalmente conhecidas. As chances da ocorrência de osteoartrite aumentam com a idade, fatores hereditários, excesso de peso, esforço repetitivo e a presença de outro tipo de artrite [THE ARTHRITIS SOCIETY, 2006].

1.7. VISCOSSUPLEMENTAÇÃO

Dentre os muitos tratamentos empregados na osteoartrite, encontra-se a chamada viscosuplementação. Ela é uma técnica terapêutica através da qual se substitui o líquido sinovial, que apresenta características elastoviscosas

indesejáveis, por soluções de mais alta elastoviscosidade de hialuronatos e seus derivados [Balazs e Denlinger, 1993]. Este tratamento começou a ser testado em animais inicialmente na década de 70.

Originalmente introduzido por Balazs e Denlinger [1993], o termo viscosuplementação significa o restabelecimento das propriedades viscoelásticas do líquido sinovial mediante administração intra-articular de soluções de ácido hialurônico de elevada massa molar. Segundo esses pesquisadores, o restabelecimento ou a suplementação da viscosidade do líquido sinovial na osteoartrite poderia melhorar a funcionalidade articular e conseqüentemente reduzir os sintomas desta doença.

A hipótese de Balazs foi comprovada por estudos clínicos, nos quais sintomas de osteoartrite – dor e disfunção articular - em joelhos humanos foram atenuados pela administração de ácido hialurônico de elevada massa molar (da ordem de 10^6 g/mol) [Wobig e col., 1999; Hochberg, 2000; Evanich e col., 2001]. Entretanto, foi observado que o alívio desses sintomas da osteoartrite pode ser obtido pela administração de ácido hialurônico com menor massa molar (entre 5,0 a $7,5 \times 10^5$ g/mol) [Pasquali Ronchetti e col., 2001]. Mais ainda, a eficácia clínica da viscosuplementação pôde ser observada por um período de várias semanas, ou até meses, após a administração intra-articular do ácido hialurônico [Kinwar, 2001], fato inconsistente com a velocidade de eliminação do ácido hialurônico em juntas sinoviais.

Por esses resultados, torna-se evidente que os efeitos benéficos obtidos em longo prazo pela administração intra-articular de ácido hialurônico não podem ser explicados completamente pelo conceito de viscosuplementação definido por Balazs. De fato, uma pesquisa exaustiva tem sido realizada a fim de elucidar o mecanismo de ação das preparações de ácido hialurônico na osteoartrite [Ghosh e Guidolin, 2002].

Alguns produtos comerciais estão disponíveis para a aplicação na terapia de viscosuplementação, sendo alguns destes, preparações de hialuronato de alta massa molar (Hyalgan e ARTZ), massa molar intermediária (como por exemplo, ORTHOVISC) e preparações de hialuronato reticulado (Hylan, SYNVISIC).

O Hilano G-F 20 (Synvisc) é um derivado de alta massa molar (6.000.000 g/mol) obtido pela reticulação de hialuronato obtidos da crista de galináceos. Este é uma associação do Hilano fluido e Hilano gel nas concentrações de 8,0 mg/mL e 2,0 mg/mL respectivamente. O Hilano preparado pela reticulação do hialuronato com formaldeído é solúvel em água. A sua outra forma é obtida pela reticulação com vinil sulfonato, o qual forma um gel altamente hidrofílico, que se dispersa, mas não se solubiliza em água [Takigami, Takigami e Phillips, 1995]. A reticulação tem como objetivo aumentar as propriedades viscoelásticas das soluções de hialuronato. O termo Hilano gel se refere ao material reticulado com vinil sulfonato e o termo Hilano fluido se refere ao material reticulado com formaldeído. O termo Hilano se refere à família de derivados reticulados do hialuronato, tendo estes derivados uma faixa de massa molar de 2 a 26×10^6 g/mol e um teor de proteínas de 0,4 a 0,8% em relação à massa total do polissacarídeo [Prieto e col., 2005].

O regime de tratamento recomendado para SYNVISIC é de três injeções de 2,0 mL na articulação do joelho humano, com intervalo de uma semana. Para atingir o efeito máximo, é necessário administrar as três injeções. Considerando que cada injeção de SYNVISIC de 2 mL custa em média R\$280,00, o custo total do tratamento sairia por R\$840,00. A duração do efeito do SYNVISIC nos pacientes que responderam ao tratamento é geralmente de 3 a 6,5 meses. Esses valores indicam que a viscosuplementação é um tratamento caro, tornando proibitiva a sua utilização por pessoas de baixa renda.

Outros materiais têm sido propostos para uso em viscosuplementação, tais como misturas de hialuronato com alginato [Pelletier e col., 2001] e hidrogel de dextrana com glicidil metacrilato [Burdick, Laberge e Lickfield, 2004]. O uso de dextrana para viscosuplementação é uma das únicas propostas de utilização de um outro polissacarídeo diferente de ácido hialurônico ou seus derivados para o tratamento de osteoartrite.

A modificação química de polissacarídeos de características diferentes permite o desenvolvimento de substâncias que tenham propriedades reológicas e até propriedades químicas similares aos produtos em uso corrente na

viscossuplementação. O monitoramento destas modificações químicas, e a respectiva ação destes polissacarídeos modificados no espaço intra-articular, contribuirá para o estabelecimento da possível relação que existe entre a estrutura química e a ação destes materiais.

1.8. GOMA GUAR

Galactomananas são polissacarídeos de reserva, oriundos de sementes pertencentes à família *Leguminosae* que possuem endosperma. São classificadas como gomas originárias de sementes. São solúveis em água e formam dispersões viscosas e estáveis [Meer, Meer e Tinker, 1975]. São constituídas por manose (M), que forma uma cadeia principal de manana com ligações β 1-4, ramificada com resíduos de galactose (G) ligados à cadeia principal com ligações α 1-6.

As galactomananas estão presentes em sementes de diversas espécies em todo mundo, mas suas principais fontes comerciais são a goma guar, goma caroba ou locusta e goma tara [Neukom, 1989]. Estas gomas são compostas por galactomanana com razão M:G variável. A goma guar possui uma razão M:G que pode variar de 1,6 a 1,8 [Cheng e col., 2002]. Essa razão pode interferir em algumas de suas propriedades físicas [Neukom, 1989]. A relação M:G pode variar, numa mesma goma, de acordo com o tipo de extração e análise do polímero. A Figura 11 mostra a estrutura da goma guar com a relação M:G de 2:1.

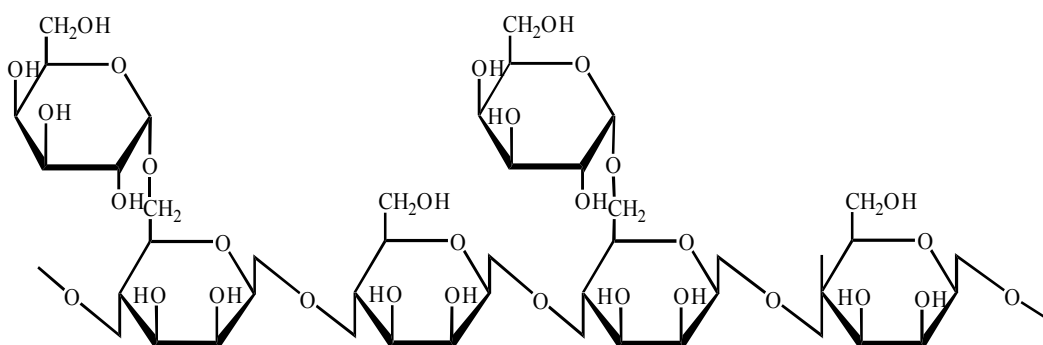


FIGURA 11 - Estrutura da Goma Guar

A goma guar é obtida a partir de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* (Figura 12), cuja casca representa 14-17%, o endosperma 35-42%, e o embrião 43-47% do peso seco da semente. O endosperma, separado das outras partes das sementes através de processos mecânicos, é a goma comercializada [Whistler e Hymowitz, 1979].



FIGURA 12 – Foto da planta guar (*Cyamopsis tetragonolobus*).

A planta guar é nativa da Índia e do Paquistão, onde ela tem uma grande importância econômica. Foi introduzida nos Estados Unidos no começo do século passado (1903), tornando-se um produto comercial em 1940 [Dea e Morrison, 1975].

Durante o processamento, a casca da sua semente é removida por aquecimento e moagem. O endosperma é então separado do gérmen por vários processos de moagem. O produto resultante tem tipicamente 2,5% de fibra, umidade de 10 a 15%, proteína de 5-6% e cinzas de 0,5-0,8% [Mark e col., 1980]. A função da galactomanana na semente é ser um polissacarídeo de reserva utilizado durante a germinação [Dea e Morrison, 1975].

A goma guar hidrata tanto em água fria quanto em água quente, formando soluções viscosas. Entretanto, esta viscosidade depende do tamanho da partícula, do pH e da temperatura. Um solução de guar na concentração de 1% é

completamente hidratada no tempo de 24 horas à temperatura ambiente e em 10 minutos na temperatura de 80°C, originando soluções com viscosidade entre 3 e 6 Pa.s. As soluções de guar são estáveis numa faixa de pH entre 4,0 e 10,5, tendo sua hidratação mais rápida em pH 8,0. As soluções de goma guar são geralmente turvas, devido à quantidade de fibras insolúveis e material celulósico presente [Mark e col., 1980].

A goma guar apresenta ligações de hidrogênio inter-molecular e intra-molecular. Sua estrutura cristalina foi determinada e demonstra que a cadeia central de manose e os resíduos laterais formam placas antiparalelas, como está esquematicamente mostrado na Figura 13 [Cheng e col., 2002]. A estrutura é estabilizada através de ligações de hidrogênio, dentro da estrutura de placas e entre estas placas. A distância entre as cadeias de manose é de 4,5 Å e a distância entre as placas é de aproximadamente 16 Å [Cheng e col., 2002].

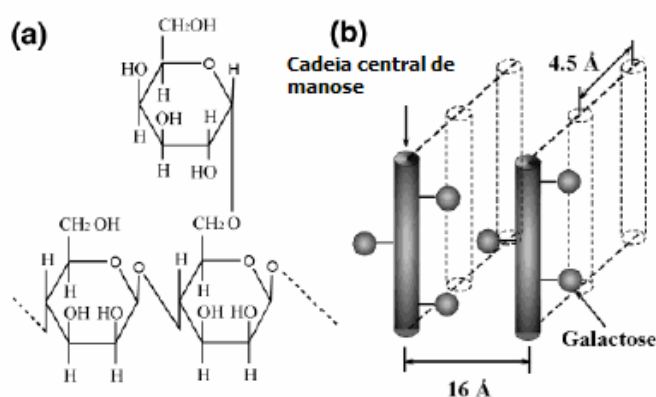


FIGURA 13 – (a) Estrutura da goma guar. (b) Representação esquemática da estrutura cristalina da guar [Cheng e col., 2002].

Em soluções aquosas diluídas, a goma guar existe como espiral aleatória. As propriedades de solução de galactomananas têm sido extensamente estudadas, mas o papel da ligação de hidrogênio e a estrutura em solução, ainda não são muito conhecidas [Cheng e col., 2002]. A goma guar forma soluções viscosas e a adição de uma pequena quantidade deste polissacarídeo aumenta drasticamente a viscosidade de uma solução. Suas propriedades viscoelásticas são consequência da estrutura da goma e dependem da concentração [Gittings e col.,

2000]. A alta viscosidade das soluções de guar é devido à alta massa molar da guar (na faixa de 2 milhões) e à presença de extensa associação intermolecular através de ligações de hidrogênio [Cheng, Brown e Prud'homme, 2002].

A distribuição de resíduos de galactose em relação à cadeia central de manose (normalmente 1,6 de manose para cada 1 de galactose) ocorre de forma aleatória. Por causa desta distribuição aleatória, existem na molécula de guar regiões mais ricas de galactose e regiões mais pobre. As regiões mais pobres de galactose são de mais baixa solubilidade em água. Esta mais baixa solubilidade pode estar associada à formação de complexos parcialmente cristalinos nestas regiões [Gittings e col., 2000]. Esta relação entre a galactose na estrutura da galactomanana e a solubilidade explica o fato de a goma locusta (relação M:G entre 3,5 e 4,0) ser menos solúvel em água do que a goma guar.

A estrutura de anel cíclico de açúcar possibilita numerosos grupos hidroxila (uma média de três por unidade de anel) disponíveis para modificação. As várias reações da goma guar com outras substâncias são explicadas pelo número e posição desses grupos OH. Por exemplo, é conhecido que a goma guar reage com bórax, devido à presença de dois grupos hidroxila em posição *cis*, que interagem com os íons boratos, possibilitando a formação de um gel pela formação de ligação cruzada de duas moléculas diferentes de goma guar, como mostrado na Figura 14 [Tayal, Pai e Khan, 1999].

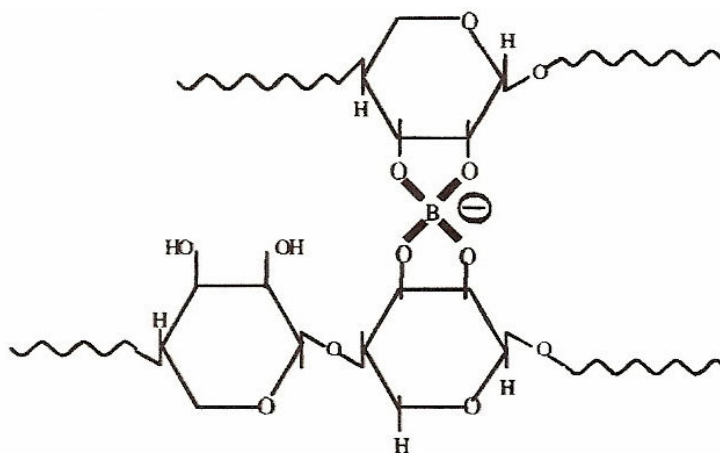


FIGURA 14 – Esquema representando a complexação da goma guar com íons borato [Tayal, Pai e Khan, 1999].

A hidroxila localizada no carbono 6 desta goma é a mais reativa para a modificação estrutural deste polissacarídeo, mas as hidroxilas nos carbonos secundários também são sítios para substituição [Seaman, 1980]. Alguns derivados de goma guar têm sido extensamente utilizados, sendo esses de natureza aniônica (carboximetil), neutra (hidroxialquil) e catiônica (amina quaternária). As modificações podem resultar em melhoria nas características reológicas. É conhecido que derivados de guar mostram uma diferença dramática na solubilidade e uma redução na turbidez destas soluções, quando comparados com a goma nativa [Seaman, 1980].

No caso das modificações, como carboximetilação e quaternização com amina quaternária, a inclusão de sítios carregados é a maior responsável pelas mudanças de propriedades. Estas modificações resultam em uma interação da goma guar com sais inorgânicos, superfícies celulósicas e tintas orgânicas [Seaman, 1980]. No caso da hidroxialquilação da goma guar, o produto formado tem sua solubilidade aumentada em sistemas água/álcool [Seaman, 1980].

Devido o seu baixo custo, excelentes propriedades reológicas e biocompatibilidade, a goma guar e seus derivados são extensivamente utilizados na indústria alimentícia e indústria de cosméticos [Holmes, Bayaliss, Muir, 1988].

Algumas propostas do uso de goma guar como um biomaterial estão relatadas na literatura, tais como: carregador de droga para liberação controlada [Clourasia, 2004], sistema de liberação de droga transdermal [Murthy, 2004] e em formulações sintéticas de muco cervical [Burruano, 2003].

1.9. QUITINA

A quitina foi descoberta em cogumelos pelo pesquisador francês Henri Braconnot, em 1811, recebendo então denominação inicial de fungina. O nome quitina foi dado por Odier, em 1823, quando foi isolada de insetos. Somente em 1843, Payen descobriu que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura [Craveiro e col., 1999].

A quitina é um polissacarídeo muito abundante, encontrado na carapaça dos crustáceos [Zhao, e col., 2001], e também em fungos, algas e insetos. Este polissacarídeo constitui 1,4% do peso de insetos e 15-20% do peso de carapaças de crustáceos. Apresenta grande variedade de usos, principalmente na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos; porém, sua maior aplicação encontra-se na produção de quitosana, polissacarídeo que tem as mais diversas aplicações [Craveiro e col., 1999].

Ela é um polissacarídeo linear que consiste de unidades de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicose ligadas por ligações glicosídicas β 1-4, podendo conter também unidades de 2-amino-2-deoxi- β -D-glicose (Figura 15).

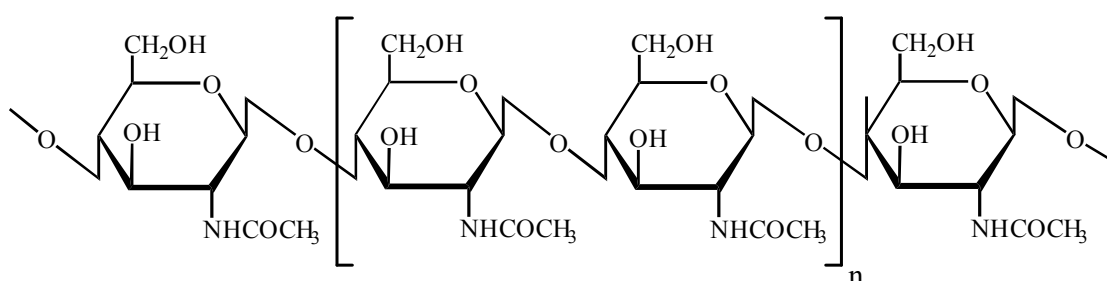


FIGURA 15 - Estrutura da Quitina

A diferença da sua estrutura para a da celulose é a hidroxila no carbono 2 desta última que é trocada pelo grupo acetamida na quitina. Como a celulose, a quitina é um polissacarídeo com função estrutural. Forma fibras estendidas similares àsquelas da celulose e, como a celulose, não é digerível por animais vertebrados. A quitina é altamente hidrofóbica, sendo insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. É solúvel em hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetona, cloroálcoois em conjunto com soluções aquosas de ácidos minerais. A hidrólise da quitina com ácidos concentrados em condições extremamente drásticas produz D-glucosamina relativamente pura [Kumar, 2000].

A quitina tem uma alta capacidade de reter água e de formar filmes devido à sua alta cristalinidade. Ela existe em três formas cristalinas, sendo elas: α , β e δ . Essas três formas diferem do arranjo da molécula nas regiões cristalinas. A α -quitina consiste de cadeias anti-paralelas, enquanto que a β -quitina contém

cadeias paralelas. A δ -quitina é a mistura das duas formas, antiparalela e paralela [Muzzarelli e Muzzareli, 1998].

A quitina, como um polímero natural, tem excelentes propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e propriedades de adsorção. Apesar deste polissacarídeo apresentar baixa solubilidade, a sua modificação química possibilita a obtenção de derivados solúveis, o que aumenta ainda mais a sua aplicabilidade [Kumar, 2000].

Algumas reações de modificação têm sido desenvolvidas na busca de aumentar a solubilidade deste polissacarídeo, tais como acilação e alquilação. Entretanto, os grupos acil e alquil favorecem a solubilidade apenas em solventes orgânicos. Quitina etileno glicol é um derivado de quitina solúvel em água. A carboximetilação é uma reação que origina um derivado de quitina altamente solúvel em água [Tokura e col., 1983].

Diversas aplicações da quitina têm sido relatadas, boa parte delas na área médica, como por exemplo, o efeito analgésico [Okamoto, Kawakami, Miyatake e col., 2002]. A quitina sulfatada tem ação anticoagulante comprovada, mostrando uma atividade duas vezes maior do que a heparina, glicosaminoglicano sulfatado responsável pela ação anti-coagulante [Kumar, 2000].

1.10. MODIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

A busca por materiais biodegradáveis, extraídos de fontes renováveis e que apresentem melhor desempenho a menor custo, é cada vez mais presente na comunidade científica. Vários derivados de polissacarídeos têm sido preparados através de modificação química, de modo a melhorar as propriedades físico-químicas, mecânicas ou químico-biológicas, ampliando as possibilidades de utilização como novos materiais.

1.10.1. Oxidação

Uma rota promissora para obter novos polímeros é a oxidação dos grupos hidroxila presentes nos carboidratos. Um método amplamente utilizado é a oxidação com hipoclorito, usando quantidades catalíticas de TEMPO (*N*-oxil-

2,2,6,6-tetrametilpiperidina) e brometo de sódio. A reação é conduzida em condições homogêneas em água e grupos primários de álcool são seletivamente oxidados gerando carboxilatos [de Nooy e col., 2000].

O TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) (Figura 16) é um reagente de oxidação muito empregado atualmente, tanto em processos industriais como acadêmicos. Ele é capaz de oxidar álcoois primários e secundários em condições brandas, seletivas e com tempo reacional reduzido, sendo utilizado em quantidades catalíticas e podendo ser empregado em presença de grupos funcionais sensíveis [de Souza, 2004]. Uma outra grande vantagem na utilização do TEMPO é a sua não reatividade em presença de ar, luz ou umidade, podendo ser estocado e utilizado sem condições especiais, o que não acontece com grande número de reagentes de oxidação [de Souza, 2004].

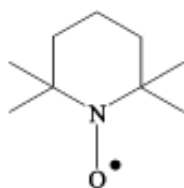


FIGURA 16 – Estrutura do reagente TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina)

Uma informação importante para a elucidação do mecanismo de oxidação com TEMPO é que radicais nitroxil podem ser reduzidos (Figura 17), formando a correspondente hidroxilamina, ou oxidados, obtendo-se o respectivo sal oxoamônio [de Souza, 2004].

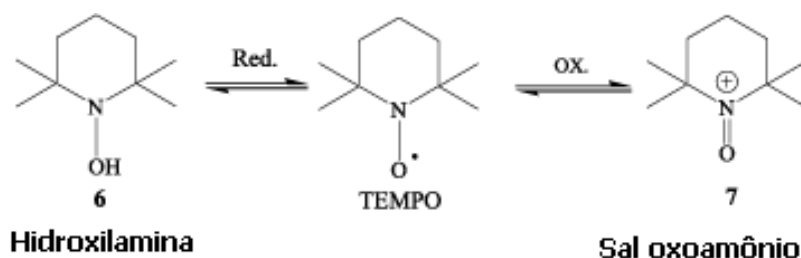


FIGURA 17 – Reação de oxiredução do reagente TEMPO.

Atualmente, a oxidação de álcoois utilizando o TEMPO é realizada pela obtenção *in situ* do íon oxamônio, o qual é responsável pela oxidação dos álcoois. Depois de oxidado, ele é regenerado pela presença de um re-oxidante, permitindo que este seja utilizado em quantidades catalíticas [de Souza, 2004].

A oxidação de álcoois em presença de TEMPO, NaClO e NaClO₂ como re-oxidante tem sido frequentemente citada na literatura. Zhao e col. [1999] obtiveram uma metodologia versátil para oxidação de álcoois primários em seus respectivos ácidos carboxílicos, baseada na utilização do hipoclorito de sódio (NaClO) e clorito de sódio (NaClO₂) como re-oxidante. O mecanismo proposto pelos autores é baseado na formação do íon oxamônio **7** por quantidades catalíticas de NaClO, o qual fornece rapidamente a oxidação do álcool em aldeído, resultando também na formação da hidroxilamina **6** *via* o intermediário **8**. O aldeído obtido é então oxidado em presença de NaClO₂ a ácido carboxílico, e uma molécula de NaOCl é regenerada, fazendo com que a hidroxilamina **6** seja oxidada ao íon oxamônio **7**, continuando assim, o ciclo catalítico (Figura 18).

Vários polissacarídeos já foram oxidados com o TEMPO, são eles: amido [Kato e col., 2003], inulina, pululana [de Nooy e col., 1996], quitina [Muzzarelli e col., 1999], celulose [Perez e col., 2003], galactoxiloglucana [Freitas e col., 2004] e scleroglucana [de Nooy e col., 2000]. Sierakowski e col. [2000] oxidaram seletivamente a galactomanana de *Leucena leucocephala*, originando uma galactomanana carregada negativamente com grupos ácido.

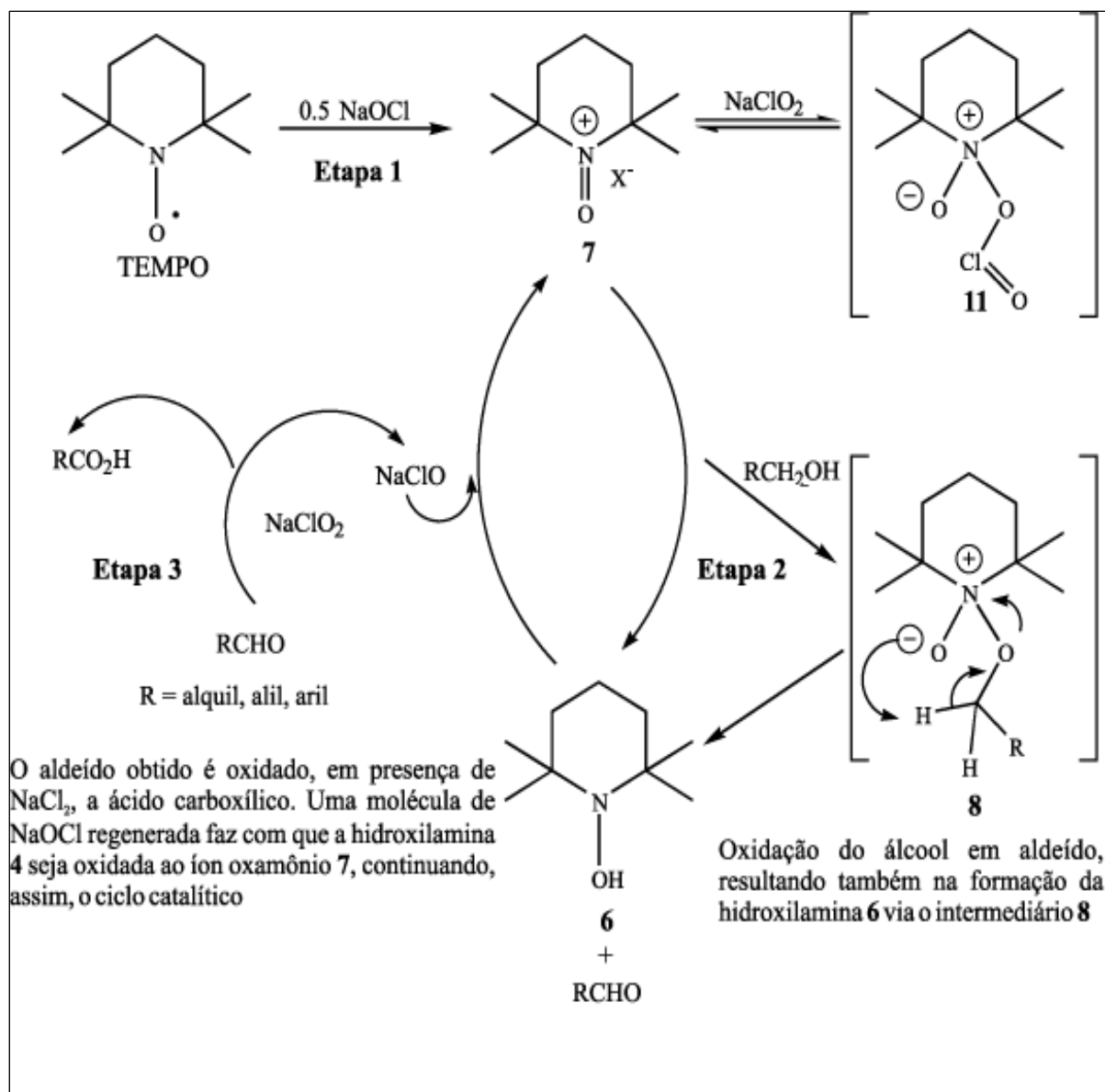


FIGURA 18 – Mecanismo proposto para a oxidação de álcoois em presença de TEMPO, NaClO e NaClO_2 [Zhao e col., 1999]

A oxidação de polissacarídeos normalmente é feita com reagente TEMPO em quantidades catalíticas em conjunto com NaClO e NaBr . Nestas condições, o reagente TEMPO, que é um radical estável (1), é oxidado pelo íon hipobromito, gerando o íon oxoamônio (2), um forte oxidante que mostra seletividade para grupamentos hidroxílicos primários (Figura 19). O hipobromito consumido é regenerado através do íon hipoclorito presente no meio reacional [de Nooy, 1994].

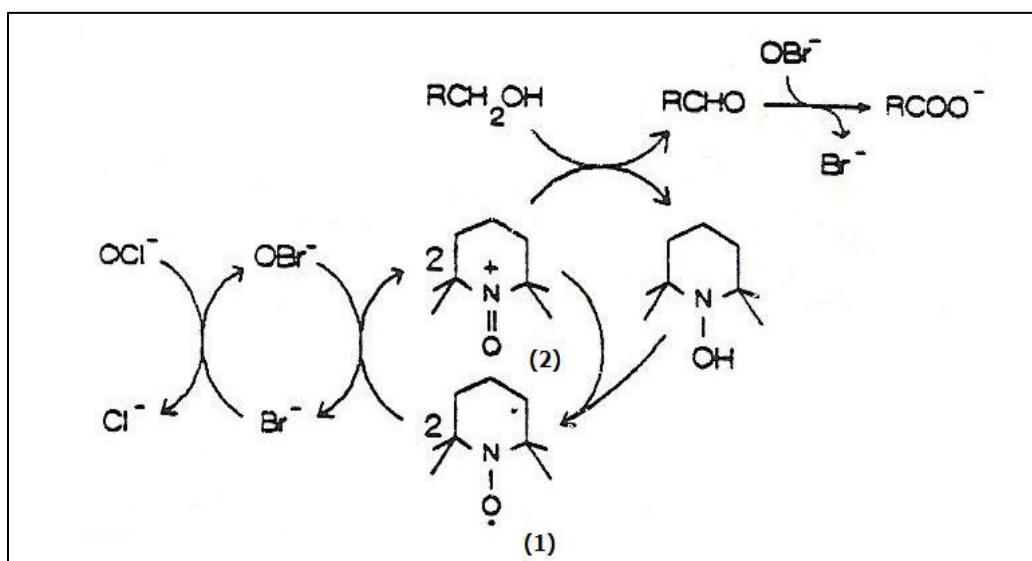


FIGURA 19 - Esquema da oxidação de polissacarídeo [de Nooy, 1994].

1.10.2. Sulfatação

Os açúcares sulfatados têm geralmente fórmula $ROSO_3H$ onde ROH é o açúcar. O interesse corrente nesses açúcares é devido principalmente ao fato desses ésteres ácidos ocorrerem extensivamente na natureza. No reino vegetal, açúcares sulfatados são encontrados combinados com muitos outros polissacarídeos de algas [Rashid e col., 1990], mas são encontrados em plantas terrestres. No reino animal, exemplos destes ésteres são: a heparina e os condroitim sulfatos.

Muita atenção tem sido focalizada no papel fisiológico de polissacarídeos sulfatados, e associado a isto, muitos métodos de sulfatação de polissacarídeos tem sido propostos para o desenvolvimento de materiais para aplicações terapêuticas comerciais. Um exame detalhado da estrutura de polissacarídeos sulfatados requer o conhecimento da posição do grupamento sulfato. Isto é importante, já que os grupos sulfatos exercem papel importante nas propriedades químicas e físicas desses polissacarídeos.

Sulfatação de polissacarídeos tem sido reportada para uma variedade de carboidratos, entre esses quitosana [Baumann e Faust, 2001], dextrana e

pululana [Mahner, Lechmer e Nordmeier, 2001] e laminarina, polissacarídeo extraído da alga *Laminaria digitata* [O'Neill, 1955]. Os reagentes utilizados são principalmente ácido monoclorsulfônico (ClSO_3H) em piridina ou complexo de trióxido sulfúrico com piridina, trietilamina ou DMF. Os solventes utilizados são geralmente formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido e piridina. No entanto, devido à complexidade de polissacarídeos, um mesmo método de sulfatação pode resultar em produtos previsíveis para um determinado polissacarídeo, mas para outros não [Yang e col., 2003].

A Figura 20 mostra o esquema de reação de sulfatação de um açúcar no carbono 3, utilizando o sistema ácido monoclorsulfônico-piridina [Mahner, Lechmer e Nordmeier, 2001].

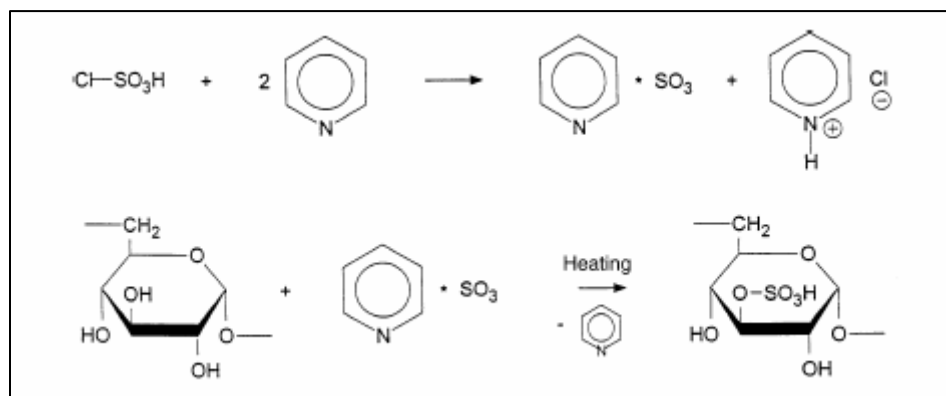


FIGURA 20 - Esquema da sulfatação de polissacarídeo no carbono 3 com ácido clorosulfônico e piridina [Mahner, Lechmer, Nordmeier, 2002]

As propriedades de polissacarídeos sulfatados, tais como: atividade anticoagulante [Alban e col., 2000], antiviral [Ono e col., 2003], antiinflamatória [Winkelhake, 1991] podem depender fortemente de sua estrutura, como por exemplo, do grau de sulfatação (DS) [Alban e col., 2002], massa molar [Barbucci, Lamponi, Magnani e Renier 1998] e ligação glicosídica [Mulloy, Mourão e Gray, 2000]. Assim, é importante estabelecer um método apropriado de sulfatação para certos polissacarídeos. O solvente deve ser escolhido adequadamente para cada polissacarídeo, desde que estes podem ter solubilidade e conformação diferente

em diferentes solventes, o que pode afetar a sulfatação devido a distintas forças intermoleculares.

Ono e col. [2003] sulfataram diferentes amostras de galactomananas de acordo com o procedimento de O'Neill [1955] através do qual amostras de laminarina foram sulfatadas utilizando como solvente o sistema piridina:formamida e ácido monoclorossulfônico.

A Figura 21 mostra a mudança na estrutura da manose com a sulfatação preferencial no carbono 6.

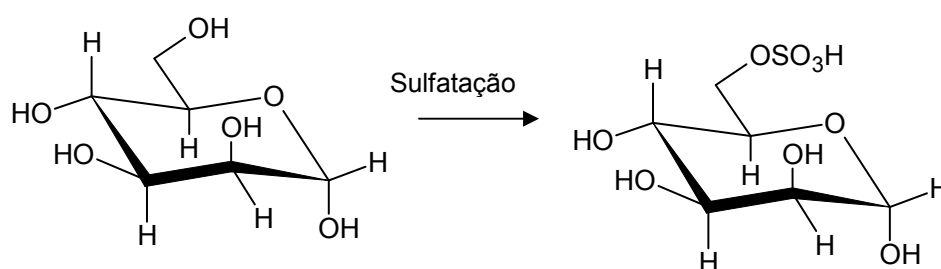


FIGURA 21 - Esquema da sulfatação da manose preferencialmente no carbono 6.

Quando uma hexose livre é tratada para fins de sulfatação, o primeiro éster formado é o 6-sulfato, o que está de acordo com mais alta reatividade das hidroxilas primárias em reações com agentes esterificantes. Entretanto, sabe-se que o 6-sulfato não é o único produto, pois pequena quantidade de dissulfatos são também formados [Turvey, 1965].

1.10.3. Carboximetilação

A carboximetilação é um método industrial bastante utilizado para a preparação de derivados polissacarídicos, apresentando vantagens como baixo custo e não toxicidade dos produtos formados [Verraest e col., 1995]. O produto resultante da reação de carboximetilação é um polieletrólito que pode ter uma variedade de aplicações [Verraest e col., 1995]. Derivados iônicos de

polissacarídeos são produzidos, tanto pelo seu valor como polieletrólito, como por sua função como precursor para outras modificações químicas [Verraest e col., 1995].

Nos produtos da reação de carboximetilação, grupos de álcool primário e/ou secundário são eterificados pela reação com ácido monocloroacético em meio básico. A reação de carboximetilação para o amido foi discutida em vários trabalhos científicos [Tijssen e col., 2001; Bhattacharyya, Singhal e Kulkarni, 1995; Singhal e Kulkarni, 1995]. A reação ocorre em duas etapas consecutivas (Figura 22).

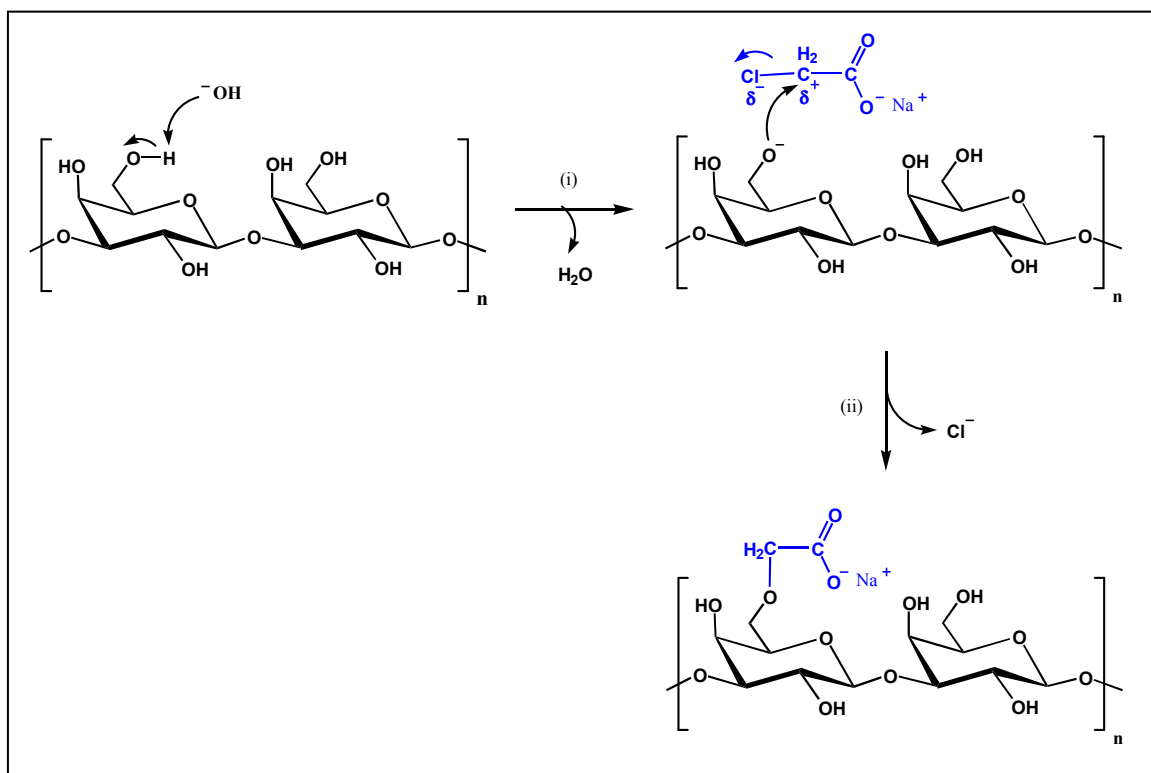
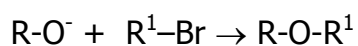


FIGURA 22 - Mecanismo de reação da carboximetilação.

O método usado é baseado na síntese de Williamson [Ege, 1989] para éteres, onde se tem a reação de um alcóxido com um halogeneto via reação $\text{S}_{\text{N}}2$.



Os grupos hidroxila dos monossacarídeos são mais ácidos que os dos álcoois comuns, pois os monossacarídeos contêm muitos átomos de oxigênio que

exercem efeito indutivo nos grupos vizinhos e bases forte como NaOH podem ser usadas para transformar álcoois em alcóxidos.

Na primeira etapa da reação existe um equilíbrio entre o hidróxido de sódio e os grupos hidroxila do polissacarídeo com a formação de íons alcoóxido que por sua vez reagem com o ácido monocloroacético numa reação S_N2 e a formam um éter.

Pode ocorrer também uma reação lateral, onde o ácido monocloroacético reage com o NaOH formando glicolato de sódio. O glicolato de sódio formado pode ainda reagir com outra molécula de glicolato ou com uma molécula de ácido monocloroacético formando diglicolato de sódio.

A eficiência da reação de carboximetilação é fortemente influenciada pelos reagentes utilizados. Muitos trabalhos discutem a influência das condições reacionais tais como: a concentração de reagentes, tempo de reação, temperatura e solvente utilizado na reação de carboximetilação no grau de substituição (GS) dos produtos obtidos [Verraest e col., 1995; Bhattacharyya, Singhal e Kulkarni, 1995; Tijssen e col., 2001]. O grau de substituição, massa molar e distribuição de substituintes determinam as propriedades do derivado carboximetilado. O polissacarídeo geralmente é dissolvido em NaOH em presença de um solvente orgânico miscível (etanol, isopropanol, butanol ou acetona). O papel do solvente na reação de carboximetilação é garantir acessibilidade do agente eterificante ao centro da estrutura do polímero [Bhattacharyya, Singhal e Kulkarni, 1995].

A quantidade de grupos carboximetila formados é indicada pelo grau de substituição e a eficiência do processo definida como a percentagem de reagente (ácido monocloroacético) que efetivamente reagiu com o polissacarídeo. O reagente remanescente é consumido nas reações laterais [Bhattacharyya, Singhal e Kulkarni, 1995].

O grau de substituição para derivados carboximetilados pode ser determinado por um número de técnicas analíticas, as mais comuns utilizam potenciometria e condutometria, mas o resultado não fornece informações sobre a

distribuição de substituintes $-\text{CH}_2\text{COONa}$ entre os grupos hidroxílicos dos polissacarídeos.

A diferença observada na eficiência da reação de carboximetilação da celulose, utilizando-se diferentes solventes, foi justificada em função das características de polaridade e estereoquímica apresentada pelos mesmos. Foi observado que com a diminuição da polaridade a eficiência da reação aumenta [Tijssen e col., 1999]. O efeito da temperatura também foi verificado e um pequeno e gradual aumento no grau de substituição ocorre com o aumento da temperatura (30 a 75°C).

A reação de carboximetilação para o amido já foi discutida em vários trabalhos científicos. Carboximetilamido (CM-amido) foi sintetizado a partir do amido extraído de diferentes fontes tais como: o extraído da batata, do milho e do arroz. As propriedades físico-químicas do CM-amido derivado de amido com diferentes percentuais de amilose foram estudadas por Bhattacharyya, Singhal e Kulkarni [1995]. Carboximetilamido é bastante utilizado como agente espessante na indústria alimentícia.

A goma do cajueiro foi carboximetilada em solução alcalina usando ácido monocloroacético (AMC) como agente eterificante [Silva e col., 2005]. O efeito dos parâmetros reacionais como concentração de base, razão AMC/goma e temperatura foram investigados em relação ao grau de substituição e rendimento. Os produtos obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear, permeação em gel e viscosimetria. Amostras de goma carboximetilada com grau de substituição entre 0,1 e 2,21 foram preparadas. A melhor condição de carboximetilação foi obtida utilizando concentração de base de 5,5 M, razão AMCA/goma de 1:1 e tempo de reação de 3 h [Silva e col. 2005].

A carboximetilação de quitina têm sido proposta na produção de novos materiais. A quitina, quando submetida à reação de carboximetilação, origina um polieletrólito aniônico solúvel em água, que está sendo aplicada com sucesso em vários campos biomédicos, devido a sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade [Tokura e Tokura, 2001]. Na carboximetilação da quitina, a modificação com

grupo carboximetil pode ocorrer não apenas no carbono 6, mas também no carbono 3 [Muzzarelli e Muzzarelli, 1998].

A Figura 23 mostra a estrutura da quitina carboximetilada e do ácido hialurônico, onde ambos apresentam o grupo ácido e também o grupo acetilglicosamina.

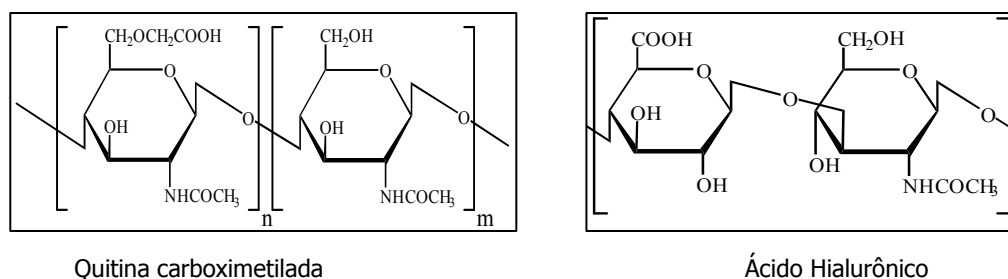


FIGURA 23 - Estruturas da Quitina Carboximetilada e do Ácido Hialurônico

1.10.4. Reticulação

A reação de reticulação consiste em formar ligações cruzadas entre as cadeias de um polímero. Esta reação possibilita a obtenção de hidrogéis com boa estabilidade mecânica. As propriedades físicas exibidas pelos hidrogéis como a capacidade de reter água, resistência mecânica e sensibilidade a condições ambientais tais como: pH, temperatura e solvente são fatores que favorecem a sua utilização em aplicações biomédicas [Hoffman, 2002] e biotecnológicas [Rosiak e Yashel, 1995].

Os polissacarídeos em geral são solúveis em água ou formam géis físicos que na presença de excesso de água formam soluções viscosas. Hidrogéis foram definidos por Peppas e col. [2000] como sistemas macromoleculares que intumescem em água ou fluídos biológicos. Este tipo de sistema polimérico tem sido amplamente investigado e explorado nos campos biomédicos e industriais.

Os géis químicos são formados por ligações covalentes irreversíveis formando regiões de reticulação. Os agentes reticulantes, tais como glutaraldeído e formaldeído, são tóxicos e requerem uma excessiva purificação durante a

preparação dos hidrogéis, de forma a eliminar os resíduos que não foram utilizados na formação das ligações cruzadas [Berger e col., 2004 a].

Os géis físicos são formados por ligações reversíveis, que ocorrem por interação com cátions, tais como íons cálcio e alumínio, ou pela formação de complexos polieletrólíticos [Berger e col., 2004 b]. O interesse no estudo de géis reticulados fisicamente está associado ao fato de não ser necessária a utilização de agentes reticulantes tóxicos e que precisam ser removidos para a utilização do gel.

A estabilidade mecânica ou resistência em diferentes pH nem sempre são conseguidas para géis físicos. Algumas vezes é necessária a introdução de ligações covalentes para fortalecer o gel formado, inicialmente mantido apenas por interações eletrostáticas.

A presença de grupos funcionais $-OH$, $-COOH$ e $-NH_2$ na estrutura do polissacarídeo pode ser utilizada para a formação de ligações cruzadas através de reações com aldeídos, com moléculas bifuncionais ou íons, os quais permitem a formação de pontes entre duas cadeias do polissacarídeo [Hennink e van Nostrum, 2002] (Figura 24).

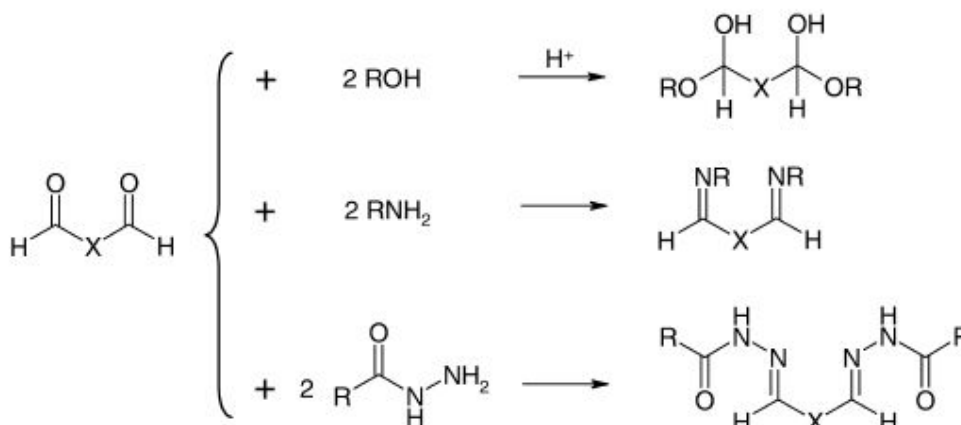


FIGURA 24 – Reticulação de polímeros contendo os grupamentos álcool, amina ou hidrazina (R representa a cadeia polimérica).

Polímeros solúveis em água que possuem grupos hidroxila podem ser reticulados utilizando glutaraldeído, epícloridrina ou formaldeído como agente reticulante. Polímeros que contêm grupos amino também podem ser reticulados

via este processo. Essa rota de preparação de materiais reticulados têm sido utilizada para a reticulação de proteínas [Hennink e van Nostrum, 2002].

Polissacarídeos podem ser reticulados utilizando como agentes reticulantes moléculas bifuncionais os quais reagem via reação de adição [Hennink e van Nostrum, 2002]. 1,6-hexametilenodiisocianato, divinilsulfóxido e 1,6 dibromohexano [Hennink e van Nostrum, 2002] são exemplos de reticulantes bifuncionais. A reação ocorre preferencialmente em solventes orgânicos, pois a água pode reagir com o agente reticulante.

A epícloridrina é um agente reticulante bifuncional amplamente utilizado para modificação de polissacarídeos, pois reage facilmente com grupos hidroxila presentes em sua estrutura. Entretanto, a reação é acompanhada de várias reações laterais. A reação de reticulação do amido tem sido estudada e segundo Hamdi e Ponchel [1999] é bastante complexa devido às várias possibilidades de reação da epícloridrina. A goma guar [Appukuttan, Surolia e Bachhawat, 1977; Ahuja e Raí, 1997] foi reticulada com epícloridrina e utilizada como coluna cromatográfica de afinidade para o isolamento de lectinas galactose específica.

A reticulação da goma guar possibilita o desenvolvimento de hidrogéis. Seus hidrogéis foram desenvolvidos com glutaraldeído e com fosfato [Gliko-Kabir e col., 1998; Gliko-Kabir e col., 2000]. Burruano, Schnaare e Malamud [2002] propuseram uma formulação de goma guar reticulada com borato para formulação de muco cervical sintético.

O glutaraldeído é um importante reagente no campo biomédico. Este tem sido usado para reticular hidrogéis de dextrana [Kim e col., 2003] e também é usado para reticulação de sistemas para liberação controlada de drogas: blendas de quitosana [Rujiravanit e col., 2003] e hidrogel de gelatina incorporada com cisplatina [Konishi e col., 2003].

Este reticulante tem sido utilizado em preparação de biopróteses, tais como: válvulas cardíacas e cartilagens elásticas [Jayakrishnan e Jameela, 1996]. O sucesso de centenas de implantes de biopróteses indica que o emprego de

glutaraldeído como agente reticulante em biomateriais, pode ser clinicamente aceito [Bigi e col., 2001].

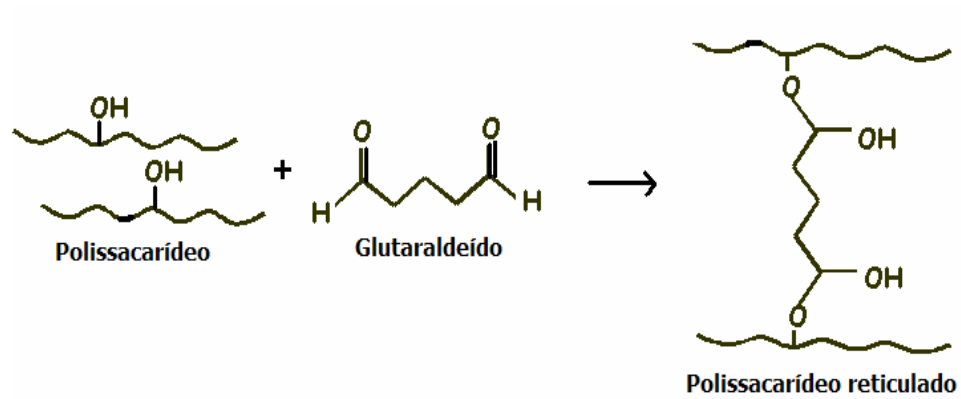


FIGURA 25 – Esquema de reticulação de polissacarídeo com o glutaraldeído.



2. Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é estudar as propriedades químicas de alguns polissacarídeos de alta viscosidade e de seus derivados, relacionando a ação no ambiente intra-articular com a sua estrutura, com um objetivo futuro de utilizá-los na viscosuplementação das articulações do joelho humano em substituição às soluções de ácido hialurônico comerciais ou ao próprio líquido sinovial.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a modificação de diversas gomas através de reticulação, para a obtenção de hidrogéis fluídos.

- Testar procedimentos de purificação da goma guar, a fim de estabelecer uma metodologia que permita a retirada completa de proteína presente e outros polissacarídeos contaminantes que não devem estar presentes em materiais que serão testados no espaço intra-articular.

- Desenvolver uma metodologia e estudar as condições que influenciam na obtenção de um gel de goma guar com fluidez suficiente para ser aplicado e testado no espaço intra-articular e que possa ser comparado reologicamente aos produtos comerciais utilizados em viscosuplementação.

- Modificar a estrutura química da goma guar, adicionando grupos carregados, como sulfato e carboxilato, à estrutura química desta goma, caracterizando estes materiais, química e reologicamente.

- Modificar a estrutura da quitina, através da reação de carboximetilação, com a finalidade de carregá-la negativamente, de forma a

assemelhá-la mais ao ácido hialurônico e estudar os fatores que podem influenciar nesta reação.

- Verificar a ação *per se* da goma guar purificada ou não, tanto em solução quanto em gel, na articulação de ratos Wistar, avaliando que conseqüências a presença de contaminantes pode resultar à articulação.

- Verificar o efeito da goma guar purificada e de seu gel fluído na hiperalgesia da articulação de ratos Wistar com osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior.

- Verificar o efeito da goma guar purificada modificada por oxidação ou por sulfatação na hiperalgesia da articulação de ratos Wistar com osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior.

- Verificar o efeito da quitina carboximetilada obtida nas melhores condições de reação na hiperalgesia da articulação de ratos Wistar com osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior.



3. Procedimento Experimental



3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAS

A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) e a goma do chichá (*Sterculia striata*) foram isoladas seguindo o método descrito por Rodrigues, Paula e Costa [1993]. A dextrana, a goma xantana, a goma caraia (*Sterculia urens*) e a goma guar foram provenientes da Sigma Corporation. O agar foi extraído pelo método de Freile-Pelegrin e Robledo [1997]. O Hilano G-F 20 (SYNVISC®), medicamento desenvolvido para o tratamento de osteoartrite, foi proveniente da BIOMATRIX. A quitina foi cedida pela Polymar, obtida por extração de cascas de camarão.

3.2. PURIFICAÇÃO DA GOMA GUAR

A purificação da goma guar da SIGMA objetiva a retirada de contaminantes como proteína e outros polissacarídeos que possam estar presente neste material. A presença de contaminantes, principalmente proteínas, pode resultar em inflamação quando testadas em cobaias.

Esta etapa do trabalho consiste em descrever alguns métodos de purificação e a caracterização das amostras obtidas após estas purificações.

3.2.1. Métodos de purificação

3.2.1.1. Método Enzimático

Este método de purificação é uma adaptação da metodologia de purificação da goma guar descrita por Rayment, Ross-Murphy e Ellis [1995].

Uma massa de 2 g de goma guar foi misturada a 8 mL de etanol 70%, deixando por 1 hora em fervura. Então filtrou-se em funil G-3 e lavou-se com etanol 95%. Com a goma seca preparou-se uma solução aquosa a 80°C na concentração de 1%. A mistura foi deixada em agitação por 5 minutos a 900 rpm

e 80°C. A seguir, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente. Após o resfriamento, a solução teve seu pH ajustado para 7,5 com solução 1M de NaOH e adicionou-se azida sódica (0,1 g). Logo após, o pH foi mais uma vez ajustado para 7,5, agora com HCl 0,1M. O estágio de digestão foi conduzido pela adição de pancreatina (Pancreatina de porco P1750 da SIGMA corporation) na concentração de 20 mg de enzima para 100 mL do extrato a pH 7,5 e temperatura controlada em 34°C em banho de glicerina. A mistura em digestão foi deixada por 24 horas sob agitação magnética, o sistema foi retirado da agitação e a mistura centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi precipitado com etanol 95% (800 mL). O precipitado foi filtrado em funil de placa sinterizada G2, e lavado com etanol comercial (95%) e acetona. O material (GGENZ) foi secado com jato de ar com o auxílio de almofariz e pistilo, logo após pesado e calculado o rendimento da purificação.

3.2.1.2. Método Físico

Este método de purificação é uma adaptação da metodologia de purificação da goma guar descrita por Wientjes e col. [2000].

A massa de 1 g de goma guar foi misturada com 20 mL de solução etanol/água 80:20 v/v e mantida em fervura por 10 minutos. Após esfriar, a dispersão foi filtrada em funil de placa sinterizada G3, lavando-se a goma com etanol e acetona para fins de secagem. A goma seca foi hidratada em 100 mL de água destilada por 1 hora e submetida à agitação magnética por 15 minutos. A solução obtida foi centrifugada a 1500 rpm por 1 hora. O sobrenadante foi precipitado em 200 mL de acetona fria e posteriormente filtrado em funil G4, sendo lavado com acetona e seco em almofariz com jato de ar quente. Mais uma vez, a goma seca obtida anteriormente foi dissolvida em 80 mL de água destilada a 80°C, sob agitação magnética por 1 hora. A solução obtida foi centrifugada à temperatura ambiente em 6000 rpm por 1 hora e meia. Separou-se o sobrenadante e precipitou-se a goma guar em 240 mL de etanol. A goma guar precipitada foi filtrada em funil G4 e lavada com etanol e acetona. Posteriormente

foi seca em almofariz com jato de ar quente. A goma obtida (GGFIS) foi pesada e calculou-se o rendimento.

3.2.1.3. Método Fehling

Este método de purificação é uma adaptação da metodologia de purificação de polissacarídeos descrita por Jones e Stoodley [1965].

Primeiramente foram preparadas as soluções (solução 1 e solução 2) que, quando misturadas na proporção de 1:1 v/v, dão origem à solução de Fehling. A solução 1 foi preparada pela solubilização de 34,64 g de sulfato de cobre p.a. em água destilada contendo algumas gotas de ácido sulfúrico 0,1M e posteriormente o volume da solução foi aferido para 500 mL com água destilada. A solução 2 foi preparada pela solubilização de 60 g de hidróxido de sódio p.a. e 173 g de tartarato de sódio e potássio em água para um volume de 500 mL.

Posteriormente, uma massa de 1 grama de goma guar foi misturada a 100 mL de água destilada e a mistura deixada por 24 horas sob agitação magnética à temperatura ambiente. À solução formada adicionou-se 5 mL de solução de Fehling recém-preparada e agitou-se bastante com bastão de vidro para a formação de um precipitado azulado. A mistura foi deixada sob refrigeração (10°C) por 17 horas. O precipitado formado foi separado da solução sobrenadante e posteriormente dissolvido em 80 mL de ácido clorídrico 0,1M sob agitação magnética por 1 hora. Após a dissolução, precipitou-se a solução em 240 mL de etanol e o precipitado foi filtrado em funil G3 e lavado com etanol e acetona sucessivas vezes. A goma obtida (GGFEH) foi pesada e o rendimento calculado.

3.2.1.4. Método Físico+Fehling

Uma massa de 1 g de goma guar foi primeiramente submetida à purificação pelo método físico e a goma obtida foi purificada mais uma vez utilizando-se o método de Fehling. A amostra obtida (GGFISFEH) foi pesada e o rendimento da purificação calculado.

3.3. REAÇÃO DE RETICULAÇÃO

3.3.1. Teste de reticulação de diversos polissacarídeos

A reação de reticulação foi testada para alguns polissacarídeos com a finalidade de se observar quais destes reticulavam tendo o glutaraldeído como agente reticulante.

O procedimento de reticulação utilizado neste trabalho foi baseado no procedimento de Gliko-Kabir e col. [1999], onde uma solução de 0,5% de goma em meio ácido (pH 2, ajustado com H_2SO_4) é misturada a certo volume de glutaraldeído em solução aquosa (25%) e posteriormente o sistema reacional é deixado em agitação magnética.

Foram realizados testes de reticulação de vários polissacarídeos com glutaraldeído. Os polissacarídeos testados foram sempre dissolvidos em solução de H_2SO_4 (pH 2) com concentrações percentuais variáveis, mostradas na Tabela 1, exceto a dextrana, que foi dissolvida em HCl 0,1M. Foram usadas proporções variadas de volume de solução de goma para volume de glutaraldeído. Os testes foram realizados à temperatura ambiente e os sistemas reacionais foram deixados em reação por 16 dias. Um resumo dos testes realizados está mostrado na Tabela 1.

TABELA 1 - Proporções de polissacarídeo e glutaraldeído para reação de reticulação

Polissacarídeo	Concentração (%)	Volume de Goma (mL)	Volume de GA (mL)	Proporção Goma / GA (v/v)
Goma Caraia	1	10	0,5	20/1
Goma do Cajueiro	1	10	0,5	20/1
Goma do Chichá	0,5	10	0,25	40/1
	0,5	10	0,5	20/1
	1	10	1	10/1
	1	10	0,5	20/1
	2	5	1	5/1
	2	5	2	2,5/1
Goma Guar	0,8	20	20	40/1
	0,8	20	0,8	25/1
Goma Xantana	0,5	10	0,25	40/1
	0,5	10	0,5	20/1
Dextrana	2	10	2	5/1
	5	10	2,5	4/1
Agar	0,8	10	0,25	40/1

3.3.2. Reticulação da goma guar

Com a finalidade de se verificar a influência da viscosidade no espaço intra-articular, foi realizada a reticulação da goma guar. Estão descritos a seguir o procedimento de reticulação da goma guar e o efeito das condições reacionais na reticulação da goma guar.

3.3.2.1. Efeito das condições reacionais na reticulação da goma guar

3.3.2.1a - Proporção de glutaraldeído/goma guar

O procedimento de reticulação foi realizado segundo o método de Glico-Kabir e col. [1999]. Três soluções de goma guar não purificada (GGNP) 0,8% foram preparadas pela solubilização de 0,16 g da goma em 20 mL de água destilada e após 24 horas de agitação magnética o pH desta foi ajustado para 2 com solução de ácido sulfúrico (0,1 M). Foram testadas três proporções diferentes de agente reticulante (glutaraldeído). A cada uma das soluções de guar foram adicionados 0,75 mL de glutaraldeído da VETEC 25% (GA) sob agitação magnética dando uma proporção de 320 mg de GGNP/3,75 mmol de GA; 0,5 mL de glutaraldeído dando uma proporção de 320mg de GGNP/2,5 mmol de GA (mistura que deu origem ao GelGGNP) e 0,25 mL de glutaraldeído dando uma proporção de 320mg de GGNP/1,25 mmol de GA. Estas misturas foram submetidas à agitação magnética e suas viscosidades acompanhadas diariamente através do reômetro rotacional da BROOKFIELD modelo DV III.

3.3.2.1b - Tipo de glutaraldeído

Foram feitas reações de reticulações com glutaraldeído de duas procedências, VETEC e SERVA. 20 mL de soluções de GGNP em pH 2 foram preparadas, como descrito anteriormente. A estas então foram adicionados 0,5 mL de glutaraldeído da VETEC 25% sob agitação magnética para a mistura chamada de GELVETEC; 0,5 mL de glutaraldeído da SERVA 25% sob agitação magnética para a mistura chamada de GELSERVA. Estas misturas foram submetidas à agitação magnética e suas viscosidades acompanhadas diariamente.

3.3.2.2. Procedimento de obtenção dos géis fluidos das gomas GGNP e GGFISFEH

O procedimento de reticulação foi realizado segundo o método de Glico-Kabir e col. [1999]. Uma massa de 0,16 g da goma GGNP foi posta para

dissolver em 20 mL de água destilada e após 24 horas de agitação magnética o pH desta foi ajustado para 2 com solução de ácido sulfúrico. A esta foi adicionado 0,5 mL de glutaraldeído VETEC 25% sob agitação magnética. Esta mistura foi submetida à agitação magnética. A reação foi interrompida após a formação do gel (procedimento acompanhado diariamente por reologia), e então posto em diálise contra água destilada durante 24 horas na proporção de 100:1 de volume de água para volume de gel. Depois, o gel foi submetido mais uma vez à diálise contra uma solução de tampão fosfato 0,1M (pH = 7,3) e NaCl 0,15M, durante 24 horas na proporção de 100:1 de volume de tampão para volume de gel. O gel de GGFISFEH foi obtido pelo mesmo procedimento descrito.

3.4. MODIFICAÇÃO DA GOMA GUAR - INTRODUÇÃO DE GRUPOS CARREGADOS

Com a finalidade de se verificar a influência de grupos carregados na ação da goma guar no espaço intra-articular, foram realizadas a sulfatação e a carboxilação da goma guar purificada GGFISFEH (goma purificada pelo método físico+Fehling).

A seguir estão mostradas as metodologias de modificação da guar utilizadas. Tais modificações foram desenvolvidas no Laboratório de Biopolímeros da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.4.1. Oxidação da goma guar GGFISFEH

O procedimento seguido para a oxidação da hidroxila do C6 da estrutura da goma guar foi o método descrito por Sierakowski e col. [2000]. Uma solução de GGFISFEH foi preparada pela solubilização de 2 g desta em 1000 mL de água destilada e deixada sob agitação magnética durante a noite. A solução foi posta em um sistema montado com banho de gelo a 5°C, termômetro e potenciômetro para acompanhamento do pH. A esta solução foram primeiramente adicionados 9 mL de hipoclorito de sódio (15% em cloro ativo). Logo em seguida, ajustou-se o pH para 9,2 com HCl 0,1 M, com o sistema sempre mantido em

banho de gelo a 5°C. Posteriormente, foi adicionado 0,0184 g do reagente TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina da SIGMA) e 0,16 g de NaBr. Acompanhou-se a cinética de oxidação com titulação do meio reacional com NaOH 0,05 M, sempre mantendo o pH em 9,2. Depois de atingido o valor de volume de NaOH calculado para o grau de oxidação desejado teoricamente, a reação foi interrompida com boroidreto de sódio (100 mg), sendo agitada por 1 h, a temperatura ambiente. Depois deste tempo, adicionou-se NaCl (0,17 M) e o pH foi ajustado para 7. O polissacarídeo foi então precipitado em etanol 95%, deixado 12 horas em geladeira, filtrado e lavado com etanol. Depois várias lavagens, o material foi posto para secar em temperatura ambiente. A goma modificada obtida (GGOXID) foi pesada e o rendimento da reação calculado.

3.4.2. Sulfatação da goma guar GGFISFEH

O procedimento seguido foi baseado no método descrito por O'Neill [1955]. Uma massa de 3 g de GGFISFEH foi posta para dissolver em formamida da MERCK (225 mL) e o sistema deixado sob agitação magnética durante a noite. Posteriormente, adicionou-se 60 mL de piridina da MERCK e deixou-se em agitação por mais 3 horas. O sistema foi levado para um banho de gelo e, em frasco fechado, adicionou-se 18 mL de ácido monoclorossulfônico da MERCK, lentamente, num intervalo de 3 horas. Depois da adição completa do ácido, o sistema ficou mantido em agitação sob refrigeração (aproximadamente 13°C) por 12 horas. O material foi retirado da refrigeração e neutralizado com bicarbonato de sódio até pH 7. Toda a solução obtida foi posta para dialisar em membrana de diálise contra água corrente. Depois de dialisado, adicionou-se NaCl (0,17 M) e o polissacarídeo foi precipitado em etanol comercial 95%. O material foi deixado na geladeira e depois filtrado e lavado sucessivas vezes com etanol comercial 95% e depois com etanol P.A. O material foi então posto para secar a temperatura ambiente, pesado e o rendimento da reação calculado.

3.5. CARBOXIMETILAÇÃO DA QUITINA

A fim de estabelecer a melhor condição de carboximetilação da quitina avaliou-se os fatores que podem influenciar esta reação.

3.5.1. Procedimento básico de carboximetilação

A carboximetilação foi baseada no procedimento descrito por Tokura e col. [1983]. Uma massa de 1 grama de quitina de camarão foi dispersa em 10 mL de solução aquosa de NaOH 50%, contendo lauril sulfato de sódio 0,2% sob agitação por 1 hora com a temperatura sendo mantida a 4°C. Posteriormente, a mistura foi posta em freezer a aproximadamente -18°C por 16 horas (tempo de intumescimento). A seguir, a suspensão foi posta em contato com 20 mL de isopropanol (solvente) por 2 horas (tempo de permanência no solvente). Ao sistema foi adicionado ácido monocloroacético, sendo tal reação deixada por 2 horas para fins de carboximetilação, sob agitação magnética. Após este procedimento, filtrou-se a suspensão obtida em funil de placa sinterizada porosidade média e o material obtido (quitina carboximetilada) foi posto para dissolver em água destilada. A solução obtida foi dialisada contra água e depois liofilizada.

3.5.2. Avaliação dos fatores que podem influenciar a carboximetilação da quitina

Várias condições de reação (Tabela 2) foram testadas a fim de determinar qual a melhor condição reacional para a modificação da quitina por carboximetilação. Os fatores avaliados foram:

- Série A: Tempo de permanência no solvente
- Série B: Proporção quitina/ ácido monocloroacético (AMCA)
- Série C: Temperatura de reação
- Série D: Tempo de intumescimento no NaOH
- Série E: Solvente

TABELA 2 – Condições reacionais para a reação de carboximetilação da quitina.

Série	Amostra	Tempo de permanência no solvente	Razão molar Quitina /AMCA	Temperatura de neutralização	Tempo de intumescimento no NaOH	Solvente
Série A	1	0 h	1/ 23	30°C	16 h	Isopropanol
	2	2 h	1/ 23	30°C	16 h	Isopropanol
	3	3 h	1/ 23	30°C	16 h	Isopropanol
	4	4 h	1/ 23	30°C	16 h	Isopropanol
Série B	1	2 h	1/ 4,6	30°C	16 h	Isopropanol
	2	2 h	1/ 9,2	30°C	16 h	Isopropanol
	3	2 h	1/ 23	30°C	16 h	Isopropanol
Série C	1	2 h	1/ 9,2	15°C	16 h	Isopropanol
	2	2 h	1/ 9,2	30°C	16 h	Isopropanol
	3	2 h	1/ 9,2	50°C	16 h	Isopropanol
Série D	1	2 h	1/ 9,2	30°C	6 h	Isopropanol
	2	2 h	1/ 9,2	30°C	16 h	Isopropanol
	3	2 h	1/ 9,2	30°C	24 h	Isopropanol
Série E	1	2 h	1/ 9,2	30°C	16 h	Isopropanol
	2	2 h	1/ 9,2	30°C	16 h	Água
	3	2 h	1/ 9,2	30°C	16 h	Isopropanol: Água (50:50)

3.6. Métodos de caracterização

3.6.1. Análise Elementar – Teor de proteínas

Todas as amostras de goma guar purificadas e não purificada (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH e GGFISFEH) foram analisadas por análise elementar em um microanalisador CARLO ERBA EA1108. O teor de proteínas foi estimado pelo teor de nitrogênio, utilizando-se um fator de conversão de 5,85 [Azero e Andrade, 2002].

A goma guar purificada (GGFISFEH) e modificada por sulfatação (GGSULF) foi também analisada em um microanalisador CARLO ERBA EA1108 para determinação do teor de enxofre. Através do teor de enxofre pode ser calculado o teor de sulfato e assim o grau de substituição da amostra sulfatada.

3.6.2. Determinação do teor de cobre por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES)

A determinação de cobre foi realizada nas amostras de goma guar não purificada e nas amostras de goma purificada. O teor de cobre foi quantificado por espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP).

A abertura das amostras (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH e GGFISFEH) foi realizada utilizando-se 0,1 g de cada amostra de goma, sendo estas pesadas diretamente em tubo de teflon (em duplicata), sendo adicionado em seguida 3 mL de solução constituída de HNO₃ e H₂O₂ na proporção 3:1 v/v, respectivamente. Depois de selados, os tubos foram colocados em um bloco digestor, dando início ao aquecimento a aproximadamente 110°C por três horas e meia. Decorrida essa etapa, os tubos foram resfriados em banho de água corrente à temperatura ambiente. A solução resultante da digestão do polissacarídeo foi então transferida para tubos de Falcon e diluída para um volume final de 20 mL. Estas foram armazenadas em frascos plásticos à temperatura ambiente para posterior análise em ICP-OES.

As soluções padrão multielementar foram preparadas a partir de soluções padrão de cada elemento. Foram preparadas quatro soluções

multielementares em tubos de Falcon, sendo acrescentados 25, 125, 250 e 300 μL de soluções padrão de cada elemento (micro constituintes): titânio, bismuto, vanádio, cádmio, cobre, zinco, ferro, chumbo e fósforo. Para a adição dos macro constituintes os volumes foram de 25, 300, 600 e 900 μL de soluções padrão de cálcio, magnésio, potássio, sódio, silício e alumínio. A solução padrão 1 foi constituída de 1 ppm de macro constituintes e 1 ppm de micro constituintes, a solução 2 foi constituída de 12 ppm de macro e 5 ppm de micro, a solução 3 de 24 ppm de macro e 10 ppm de micro e a solução 4 de 48 ppm de macro e 12 ppm de micro elementos. O volume final de cada uma das quatro soluções foi completado para 25 mL.

O espectrômetro utilizado foi o equipamento da PERKIN-ELMER modelo OPTIMA 4300 DV. As configurações do equipamento utilizadas para a construção da curva padrão e para análise de cobre do polissacarídeo estão mostradas na Tabela 3.

TABELA 3 – Configurações do equipamento de ICP-OES utilizadas para análise da guar.

Potência fornecida do gerador	1350 W
Fluxo do gás do plasma (argônio)	1,8 L/min
Fluxo do gás auxiliar	18 L/min
Fluxo de nebulizador	0,8 mL/ min
Fluxo do gás de amostra	0,8 L/min
Comprimento de onda p/ cobre	327,393 nm
Leitura	Axial

3.6.3. Determinação da composição monossacarídica

O preparo das amostras (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH e GGFISFEH) para determinação da composição monossacarídica, consistiu de três etapas: hidrólise, redução e acetilação.

Hidrólise: 10 mg de cada goma purificada foram solubilizados em água. A hidrólise foi conduzida com ácido trifluoroacético (TFA) 1M a 100°C por 5 horas em banho-maria. Após a hidrólise os materiais foram secos até a eliminação completa do ácido.

Redução: Depois de adicionado água aos tubos que continham o material hidrolisado, estes foram transferidos para um béquer. Acrescentou-se boroidreto de sódio até o pH ficar alcalino, deixando-se o sistema sob agitação durante a noite. As soluções com boroidreto foram deionizadas com resina de troca iônica e filtradas. Evaporou-se até a secura, lavando-se com metanol por duas vezes, para formar borato de metila. Transferiu-se para um tubo de hidrólise e secou-se o metanol completamente.

Acetilação: Sobre o resíduo seco acrescentou-se 0,5 mL de piridina e 0,5 mL de anidrido acético, deixando-se em repouso durante a noite, para que ocorra a acetilação. Depois acrescentou-se gelo moído e picado agitando-se vigorosamente. Posteriormente, acrescentou-se clorofórmio e solução de sulfato de cobre (0,5%). Separou-se a fase aquosa superior com trompa de vácuo, e fez-se esta extração até que a fase aquosa voltasse à cor inicial da solução de sulfato de cobre (5 vezes).

As amostras secas foram analisadas utilizando-se um cromatógrafo líquido-gás Hewlett Packard, modelo 5890A serie II, coluna DB-225 da BAScientific (0.25mm i.d.×30 m), usando nitrogênio como gás de fluxo e acetona como eluente.

3.6.4. Determinação do teor de ácido urônico

A determinação de ácido urônico foi realizada segundo o procedimento descrito na literatura [Blumenkrantz e Asboe-Hanen, 1973], para as amostras de goma guar (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH e GGFISFEH) e para a guar modificada (GGOXID). Como padrão para a quantificação de ácido urônico, utilizou-se o ácido galacturônico da MERCK.

Para a curva padrão, foram preparadas soluções de ácido galacturônico nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL em água. As amostras de

goma foram preparadas na concentração de 100 μg de goma/mL de solução, após 24 horas de solubilização.

Um volume de 0,4 mL de cada solução foi transferido para tubos de hidrólise que foram postos em banho de gelo. Foram adicionados 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio/ H_2SO_4 (0,0125 M) e o sistema agitado em Vortex, e posteriormente, aquecendo-se em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Depois deste tempo, os tubos foram retirados do aquecimento e foram postos novamente em banho de gelo. A estes foram adicionados 40 mg de solução de meta-hidroxibifenila/ NaOH (0,15% do reagente em NaOH 0,5%). Mais uma vez foi realizada agitação em Vortex e após 10 minutos fez-se a leitura em um espectrofotômetro modelo 700 PLUS da marca FEMTO, selecionado para o comprimento de onda de 520 nm. Através da curva padrão (Absorbância *versus* concentração) fez-se a determinação do teor de ácido urônico nas amostras de goma.

3.6.5. Determinação do grau de substituição por titulação potenciométrica

Uma determinada massa de guar oxidada (GGOXID) e de todos os derivados de carboximetilação da quitina foi pesada, dissolvida em água e depois eluída em coluna de troca iônica de resina trocadora de íons (H^+). Após a passagem pela coluna, a solução foi liofilizada. A massa de polissacarídeo obtida foi pesada e dissolvida em água (20 mL) e então titulada potenciometricamente com NaOH 0,1 M, utilizando-se um potenciômetro modelo pH330i da WTW. O volume de NaOH gasto para neutralizar os grupos carboxilato foi utilizado para o cálculo do grau de substituição.

3.6.6. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro FT-IR da Shimadzu modelo IR Prestige – 21 com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} . Para obtenção dos espectros, as amostras (GGNP, GGFISFEH,

GelGGNP, GelGGFISFEH, GGOXID, GGSULF, quitina e a quitina carboximetilada (QCMT) foram misturadas a brometo de potássio para obtenção de pastilhas.

3.6.7. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros foram obtidos em espectrômetro BRUKER modelo AVANCE-DMX-500 (CENAUREMN – DQOI- UFC), acoplado a um transformador de Fourier. As amostras (GGNP, GGFISFEH, GGSULF, GGOXID e QCMT) foram dissolvidas em água deuterada durante 12 horas. As frequências de observação dos núcleos foram de 125 MHz (^{13}C) e de 500 MHz (^1H).

As análises de RMN foram realizadas nas técnicas monodimensional (RMN ^1H , RMN ^{13}C desacoplado e DEPT 135) e bidimensional (^1H - ^{13}C HMQC).

3.6.8. Determinação da viscosidade intrínseca

Para as amostras de goma guar (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH e GGFISFEH), foram preparadas soluções 0,1% de goma em água, sendo estas soluções filtradas em funil de placa sinterizada porosidade média. Para as amostra de gomas modificadas (GGOXID e GGSULF) e não modificada (GGFISFEH), as soluções foram preparadas na concentração 0,3% de goma em solução de NaCl 0,1 M, sendo posteriormente filtradas em funil de placa sinterizada porosidade média.

A viscosidade intrínseca foi determinada em um viscosímetro capilar de Ubbelohde da CANNON INSTRUMENTS modelo 1 I-71 à temperatura de 25°C em um banho de água com temperatura controlada. Os solventes utilizados foram solução salina NaCl 0,1M para as gomas modificadas e água para as gomas purificadas. O tempo de solvente foi de 98,9 segundos para a água e 97,9 segundos para a solução salina. Para a determinação da viscosidade intrínseca foram feitas cinco diluições. Para cada amostra de goma as medidas do tempo de escoamento foram realizadas no mínimo três vezes. A viscosidade intrínseca foi calculada pela medida da viscosidade reduzida a várias concentrações

extrapolando-se para concentração zero. As concentrações reais das soluções de goma foram determinadas pela evaporação total dos solventes por mais de 24 horas em estufa a 110°C.

3.6.9. Estimativa da distribuição de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Foram preparadas soluções das gomas em água na concentração de 0,1%. Para as amostras de goma guar, tanto purificadas e não purificada (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH e GGFISFEH), como modificadas (GGOXID e GGSULF) as soluções foram filtradas em funil de placa sinterizada, porosidade média.

A distribuição da massa molar foi determinada através de Cromatografia de Permeação em Gel, utilizando um equipamento SHIMADZU acoplado a um detector de índice de refração (RID-6A). Foi utilizada uma coluna Ultrahydrogel Linear de 7,8 x 300 mm, com fase móvel NaNO_3 0,1 M, à temperatura ambiente e fluxo de 0,5 mL/min. O volume injetado das amostras foi de 50 μL .

A curva padrão para a determinação da massa molar foi construída utilizando-se padrões de pululana com massas molares no intervalo de 10^3 a 10^5 g/mol.

3.6.10. Espalhamento de luz estático

Os experimentos de espalhamento foram realizados no Laboratório de Físico-Química de Polímeros e Instrumentação do Instituto de Macromoléculas (UFRJ) para a determinação da massa molar ponderal média e do raio de giração.

Os experimentos de espalhamento de luz estático foram realizados em um fotômetro a laser multiângulo MALLS DAWN Wyatt Technology Corporation, trabalhando com uma fonte de laser He-Ne de comprimento de onda de 632,8 nm. Soluções de GGFISFEH, GGOXID, GGSULF e QCMT nas concentrações de 3 x

10^{-4} a $1,15 \times 10^{-3}$ g/mL em NaNO_3 0,1M foram preparadas e filtradas em membrana MILLIPORE de 0,2 e 0,45 μm .

3.6.11. Análises Reológicas

3.6.11.1. Reologia de fluxo

Os estudos reológicos de fluxo das amostras de guar em solução (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH, GGFISFEH, GGSULF, GGOXID), dos géis GelGGNP e GelGGFISFEH, e do Hilano G-F 20, foram realizadas em reômetro digital da BROOKFIELD, modelo DV – III, cone-placa, utilizando-se os spindles CP 42 e CP 52, sendo a temperatura mantida através de banho termostaticado.

3.6.11.2. Reologia oscilatória

O comportamento viscoelástico das amostras (GelGGFISFEH e Hilano G-F 20) foi analisado através do sistema dinâmico ou oscilatório em sensor do tipo cone-placa de diâmetro de 40 mm em um reômetro da TA Instruments modelo AR 550.

3.6.12. Turbidez

Foram preparadas soluções das gomas (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH e GGFISFEH) em água pela solubilização de 0,1 g de amostra em 100 mL através de agitação magnética por 24 horas. As soluções foram então analisadas em um turbidímetro Orbeco-Hellige modelo 966 à temperatura ambiente ($\sim 28^\circ\text{C}$). O instrumento foi calibrado com solução coloidal padrão (40 NPU).

3.6.13. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica das amostras de guar em pó (GGNP, GGENZ, GGFIS, GGFEH, GGFISFEH, GGOXID e GGSULF), das amostras de GelGGFISFEH e GelGGNP liofilizados e das amostras de quitina e QCMT liofilizada foi realizada em equipamento da SHIMADZU TGA – 50 em atmosfera de ar

sintético com um fluxo de 50 mL/min. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10°C/min e a massa de amostra foi de 10 mg.

3.6.14. Conteúdo de água e teor de glutaraldeído nos géis de GGNP e GGFISFEH

Para a determinação do conteúdo de água, uma determinada massa do gel (em torno de 5 g) foi pesada em um pequeno frasco tarado, e posta para congelar em freezer (-18°C). O frasco contendo o gel congelado foi posto para liofilizar. Depois do material seco, o frasco foi mais uma vez pesado. O conteúdo de água foi calculado considerando a massa do gel úmido e a massa do gel seco.

O glutaraldeído é um reagente citotóxico [Kawahara e col., 1992], e precisa ser quantificado em materiais que venham a ter aplicação em organismos vivos. A quantificação proposta está baseada na absorção deste reagente na região do ultravioleta. O glutaraldeído tem duas bandas de absorção na região do ultravioleta, uma em 235 nm e outra em 280 nm [Kawahara e col., 1992].

Foram preparadas soluções de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M nas concentrações de 0,0025; 0,005; 0,01; 0,015 e 0,020 M. As absorbâncias destas soluções a 235 nm foram medidas em espectrofotômetro HEWLETT-PACKARD, modelo 8443 Diode Array, utilizando célula de quartzo retangular de caminho ótico de 1 cm. A partir dos valores de absorbância em relação com a concentração, construiu-se a curva padrão segundo a lei de Lambert-Beer.

Para a quantificação do teor de glutaraldeído na amostra de gel (GelGGNP), um volume de 2 mL de gel foi misturado a 10 mL de água e o gel deixado sob agitação magnética vigorosa por 70 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi centrifugado a 6000 rpm por 20 min. Do sobrenadante retirou-se 1,5 mL e misturou-se com 1,5 mL de tampão fosfato 0,2 M, e obteve-se o espectro na região do ultravioleta.

3.6.15. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das gomas e dos géis

Para microscopia eletrônica de varredura comparativa do gel e da goma, as amostras foram preparadas do seguinte modo: um pequeno volume do GelGGNP e GelGGFISFEH dialisado contra água e de solução de GGNP e GGFISFEH em água (0,8%) foi congelado em freezer ($\approx -18^{\circ}\text{C}$) e depois estas foram mergulhadas três vezes em nitrogênio líquido com o auxílio de uma pinça. Logo após este procedimento os materiais foram postos a liofilizar.

Para a análise morfológica do Hilano G-F 20, dialisou-se 0,5 mL deste hidrogel contra água para a retirada de sais. Um certo volume foi congelado em freezer e posteriormente mergulhado em nitrogênio líquido e liofilizado.

Os estudos morfológicos foram realizados em um equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura da Phillips XL30 acoplado ao Sistema de ligação 3.34 Séries 300 com detector de Si(Li). As amostras foram montadas com fitas de carbono em pó. As análises foram realizadas no Departamento de Engenharia Mecânica da UFC.

3.7. TESTES FARMACOLÓGICOS

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida pelo Laboratório de Investigação em Ostoartropatias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sendo investigado o efeito da purificação e da viscosidade da goma guar na administração de suas soluções em cavidade articular de ratos Wistar e também o efeito de terapêutico destes materiais na articulação de ratos Wistar, com osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior.

3.7.1. Efeito de preparações de goma guar em cavidades articulares de ratos (influência da pureza e da viscosidade da goma guar na ação *per se*)

Investigou-se o efeito da administração intra-articular da goma guar não purificada (GGNP) e da goma guar purificada pelo método físico+Fehling (GGFISFEH) em ratos Wistar e a ação dos géis de goma guar GGNP e GGFISFEH.

3.7.1.1. Manipulação Farmacológica

Ratos Wistar machos (180-200 g) receberam solução salina de goma guar não purificada (GGNP) e purificada (GGFISFEH) no joelho direito (100 - 400 µg) e os géis GelGGNP e GelfISFEH foram administradas na dose de 400 µg intra-articular.

Um grupo controle (CT) de animais recebeu apenas veículo (solução salina). A hiperalgesia foi avaliada pelo teste de incapacitação articular para ratos, durante um período de observação de um minuto. O influxo celular foi avaliado no exsudato articular, coletado seis horas após a injeção intra-articular.

3.7.1.2. Medida da Incapacitação Articular – Hiperalgesia (Dor)

Utilizou-se uma modificação do modelo de avaliação da incapacitação articular proposto por Tonussi e Ferreira (1992) (Figura 26). Os animais foram postos a deambular em um cilindro metálico giratório de alumínio, com 30 cm de diâmetro e 50 cm de largura, com capacidade para três animais por vez. O cilindro gira a uma velocidade de 3 rpm. As patas traseiras do animal foram calçadas com sapatilhas metálicas especialmente desenhadas. A sapatilha direita – correspondente à articulação submetida à artrotomia – foi conectada a uma porta de entrada de dados de um microcomputador, no qual está instalado um programa de aquisição de dados. Ao tocar a superfície do cilindro, o animal fecha um circuito, que é registrado em um computador. O tempo total de registro foi de dez minutos, fornecendo em segundos o período durante o qual o animal deixa de tocar o cilindro. Essa medida é denominada por tempo de suspensão da pata (TSP), considerada proporcional à dor articular. O TSP foi avaliado diariamente por sete dias.

Para a avaliação da resposta *per se* de preparações de goma guar em cavidades articulares de ratos NAIVE (não manipulados), o tempo total de registro foi de um minuto, e a incapacitação articular foi avaliada pelo TSP registrado a cada hora até a sexta hora, tempo no qual esses animais foram sacrificados.

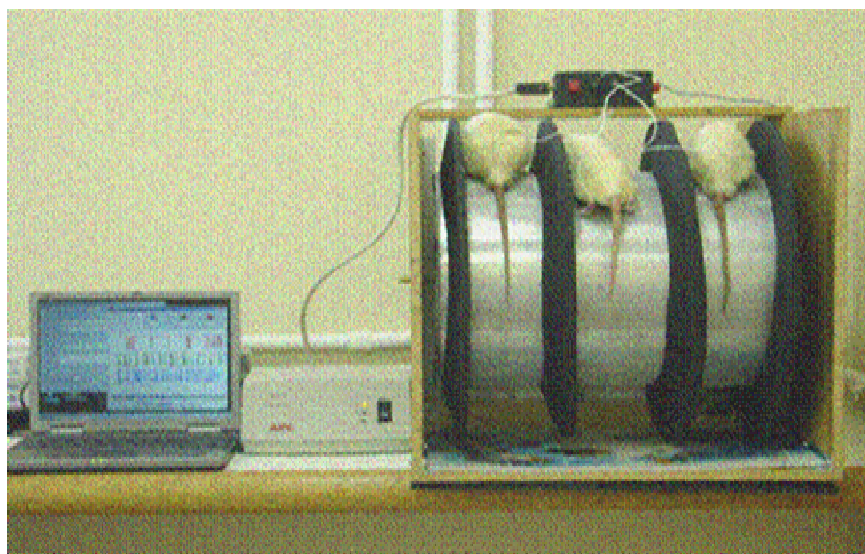


FIGURA 26 - Animais deambulando no sistema de registro da incapacitação articular.

3.7.1.3. Análise de Influxo Celular (Inflamação)

Os animais foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia terminal (hidrato de cloral – 400 mg/kg, i.p.). A seguir, realizou-se a lavagem das articulações, fazendo-se duas injeções de 0,2 mL de PBS contendo EDTA 10 mM, no espaço articular. O lavado articular foi coletado por aspiração e mantido em banho de gelo.

Alíquotas do lavado articular foram diluídas em líquido de Turk (ácido acético glacial a 2%, violeta de genciana a 1% em água destilada), para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado articular foi centrifugado (430 g/10 min/4°C). O precipitado celular foi ressuspenso em PBS, para determinação diferencial por coloração em HEMA3®.

A contagem total de leucócitos está relacionada a processo inflamatório agudo, comparando-se com os resultados dos grupos que receberam goma com a contagem para os grupos que receberam apenas solução salina.

3.7.2. Ação da GGFISFEH e GelfISFEH na osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior

3.7.2.1. Modelo de osteoartrose por transecção do ligamento cruzado anterior

Ratos Wistar machos de pesos entre 180 a 200 g (grupos de seis animais) foram sujeitos à transecção do ligamento anterior do joelho (Figura 27). A transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) provoca instabilidade articular, caracterizada por translações e rotações tíbio-femorais acentuadas, interferindo na distribuição normal de pressões sobre a cartilagem articular [Lopez e col., 2003].

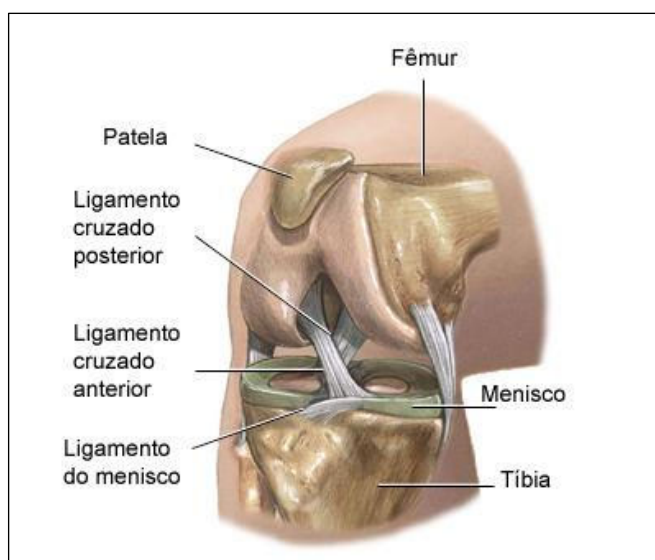


FIGURA 27 - Ilustração do joelho mostrando o ligamento cruzado anterior do joelho.

O modelo utilizado é uma modificação do modelo proposto por Stoop e col. [2001]. Os animais foram anestesiados com éter etílico por via inalatória.

Após depilação e anti-sepsia da região ventral articulação do joelho direito, e abertura longitudinal da pele, procedeu-se a uma incisão parapatelar lateral, seguida de luxação lateral da patela. Esses procedimentos proporcionam acesso ao espaço articular. O ligamento cruzado anterior foi seccionado com o auxílio de uma tesoura. A livre translação da tíbia em relação ao fêmur, no sentido pósterio-anterior ("sinal da gaveta") confirma completa secção do ligamento. Procedeu-se a redução da luxação patelar e a articulação foi suturada com fio cirúrgico reabsorvível Vycril 5/0 (polyglactin 910 - Ethicon). A pele foi suturada com fio de nylon monofilamentar 4/0 (Point Suture), e submetida à anti-sepsia. Os pontos da sutura da pele foram retirados sete dias após a cirurgia.

Um grupo falso-operado (SHAM) foi submetido ao procedimento cirúrgico descrito acima, exceto à transecção do ligamento cruzado anterior.

3.7.2.2. Manipulação farmacológica

Goma guar purificada pelo método físico+Fehling (GGFISFEH) em solução (0,8% em solução salina), gel de goma guar GelGGFISFEH e Hilano G-F 20 foram administrados no quarto dia após a transecção (intervenção terapêutica), em dose única intra-articular de 100 µg. Um grupo não-tratado (NT) recebeu veículo (salina) intra-articular.

3.7.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média±e.p.m. Para comparação múltipla entre as médias de três ou mais grupos, foi utilizada a Análise de Variância Univariada (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).



4. Resultados e discussão

4.1. Purificação da Goma Guar



4.1. PURIFICAÇÃO DA GOMA GUAR

4.1.1. Rendimento dos métodos de purificação

Os rendimentos dos métodos de purificação foram de 55% para o enzimático, 30% para o físico, 75% para o de Fehling e 22% para o físico+Fehling.

O método de Fehling é o que apresenta maior rendimento dentre todos. Isto se deve ao fato de que praticamente todo o polissacarídeo, quando precipitado com solução de Fehling, consegue ser recuperado na etapa de ressolubilização em meio ácido, realizada posteriormente. O baixo rendimento para o método físico é resultante do descarte de uma quantidade considerável de material que não solubilizou na etapa de hidratação. Para o método enzimático também ocorre o descarte de uma quantidade considerável de material na etapa de centrifugação, material que não solubilizou eficientemente.

A Figura 28 mostra a amostra de goma não purificada (GGNP) e goma guar purificada pelo método físico+Fehling (GGFISFEH). Pela fotografia mostrada observa-se o clareamento da amostra de goma guar após o tratamento de purificação.

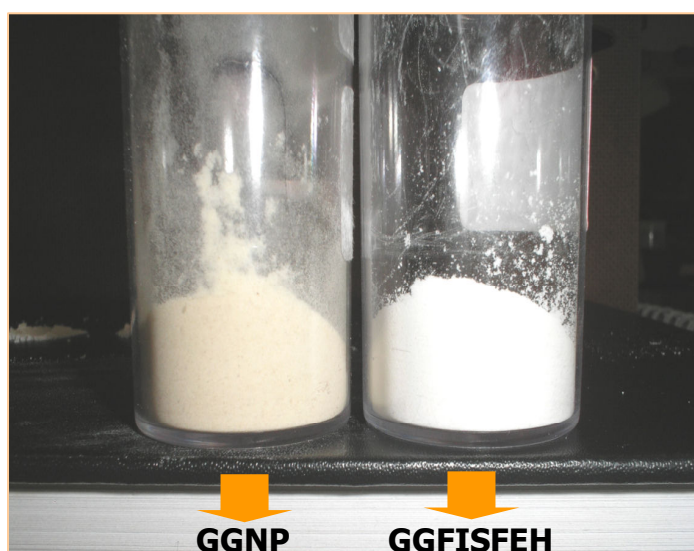


FIGURA 28 – Amostra de goma guar não purificada (GGNP) e guar purificada (GGFISFEH).

4.1.2. Caracterização das amostras

4.1.2.1. Análise Elementar – Teor de proteínas

Considerando que todo o nitrogênio presente nas amostras de goma se deve à presença de proteínas, utilizou-se um fator de conversão de 5,87 [Azero e Andrade, 2002] para calcular o teor de proteína. Os teores de proteína para a goma não purificada e purificadas estão mostrados na Tabela 4.

TABELA 4 - Teor de proteína e % de redução da proteína para os diferentes métodos de purificações da goma guar

Amostra	%N	% Proteína	% de redução
GGNP	0,62	3,64	-
GGENZ	0,18	1,06	70
GGFIS	0,0083	0,05	98
GGFEH	0,16	0,94	74
GGFISFEH	0,00	0,00	100

A goma não purificada mostra uma quantidade considerável de proteína (3,6%). Essa proteína pode ser um contaminante ou pode estar associada com a cadeia do polissacarídeo, via ligação covalente [Debon e Tester, 2001].

Aproximadamente 25% da semente de guar consiste de parte em germinação, sendo esta rica em proteínas (48% de massa seca). Uma larga porção (40%) são proteínas como globulinas, e o restante é de proteína funcional (enzimas, inibidores, etc) [Rakhmanberdyeva e col., 2005]. Estas proteínas podem então ser arrastadas durante o processo de extração da goma.

Todos os métodos de purificação empregados resultaram numa redução do teor de proteína. A redução para a GGFISFEH foi completa. Esta redução se deve ao método físico, já que para a amostra GGFIS este método propiciou uma redução de quase 100% no teor de proteína. Já que este método utiliza apenas procedimentos físicos, tem-se aqui um forte indício de que as

proteínas presentes na goma guar são proteínas livres que são arrastadas durante o procedimento de obtenção deste polissacarídeo.

Os métodos enzimático e Fehling apresentaram uma redução semelhante no teor de proteína, apesar de possuírem fundamentos completamente diferentes. O método enzimático se baseia na remoção por hidrólise enzimática, enquanto que o método Fehling se baseia na remoção de proteínas livres e outros polissacarídeos por complexação da goma guar com solução de Fehling. Como este utiliza solução de NaOH, pode ocorrer, também, retirada de proteína O-ligada, já que esta ligação é clivada em solução de NaOH acima de 0,1 M. O método enzimático, também, pode resultar na remoção de proteínas ligadas à estrutura da galactomanana [Brummer, Cui e Wang, 2003].

No trabalho de Andrade e col. [1999] uma amostra da goma "locust bean" comercial, depois de submetida à purificação por solubilização, centrifugação e precipitação em álcool etílico, teve uma redução do teor de proteína de 86%. Brummer, Cui e Wang [2003] relatam a diminuição em 57% do teor de proteína da goma "fenugreek" após tratamento com pronase.

4.1.2.2. Teor de ácido urônico e composição monossacarídica

Os valores de % dos monossacarídeos constituintes de cada amostra analisada estão mostrados na Tabela 5.

TABELA 5 - Composição monossacarídica para as amostras de goma guar

Amostra	%manose	%galactose	%arabinose	%glicose	% ácido urônico	Man/Gal
GGNP	55,86	33,47	4,10	3,29	3,28	1,67 ±0,04
GGENZ	62,58	31,53	2,12	0,46	3,31	1,99 ±0,04
GGFIS	62,31	33,34	0,92	0,39	3,04	1,87 ±0,04
GGFEH	65,42	25,91	3,41	1,09	4,17	2,53 ±0,35
GGFISFEH	58,57	36,35	0,66	0,57	3,85	1,61 ±0,17

A goma não purificada contém um teor total de açúcares que não galactose e manose, de 7,6%, demonstrando a contaminação da amostra com outros monossacarídeos, sendo estes glicose e arabinose. Debon e Tester [2001] mostraram que outros açúcares, como arabinose e glicose, podem estar presentes na amostra de goma guar como contaminantes. A presença de glicose e arabinose é provavelmente devido a contaminantes provenientes da casca da semente [Ibañez e Ferrero, 2003]. A glicose pode ser oriunda de material celulósico.

Para todos os procedimentos de purificação, verifica-se uma redução do teor destes dois açúcares na composição das amostras. A amostra de goma guar no trabalho de Rayment, Ross-Murphy e Ellis [1995], no qual o método enzimático foi baseado, apresentou um teor de arabinose e glicose de 2,68% após a purificação. No caso da GGENZ, o teor de arabinose e glicose foi de 2,58%, muito próximo ao observado por estes autores.

O método que apresentou menor teor de açúcares contaminantes, foi o físico+Fehling, mostrando que este teve a melhor eficiência na purificação da guar no que diz respeito à retirada de outros polissacarídeos. O segundo método mais eficiente na remoção de açúcares contaminantes foi o físico. O método com menor redução de açúcares contaminantes foi o método que utiliza a precipitação com solução de Fehling como base da purificação. Os dois métodos que apresentaram o melhor desempenho na purificação com a retirada de polissacarídeos foram aqueles nos quais se utilizou a centrifugação após a hidratação. A centrifugação pode ter arrastado os polissacarídeos contaminantes.

Para o ácido urônico, a variação é pequena quando se compara as amostras purificadas com GGNP, demonstrando que os métodos utilizados para purificação não interferem neste teor. O teor de ácido urônico permanece constante ao longo dos estágios de purificação para a goma do cajueiro no trabalho relatado por Costa, Rodrigues e Paula [1996].

4.1.2.3. Determinação do teor de cobre na amostra de GGFISFEH por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES):

Através dos resultados de intensidade média (média de três medidas feitas pelo equipamento) da integração da área do espectro do cobre no comprimento de onda de 327,393 nm construiu-se a curva padrão. A partir do gráfico da curva padrão pode-se relacionar a intensidade do sinal (I) com a concentração (C) do elemento através da equação:

$$I = - 6227 + 67,539 C \quad (\text{Equação 1})$$

Quantificação de cobre na amostra: As duas soluções resultantes da abertura foram analisadas no ICP e a quantificação do teor de cobre foi feita relacionando-se o valor de intensidade média do sinal com a equação da curva padrão mostrada anteriormente (Tabela 6).

TABELA 6 - Teor de cobre das amostras de goma guar

Amostras	Teor de cobre (ppm)
GGNP	0
GGENZ	0
GGFIS	0
GGFEH	792
GGFISFEH	441

Não há presença de cobre nas amostras GGNP, GGENZ e GGFIS. Já as amostras GGFEH e GGFISFEH contém cobre. As amostras que não passaram por purificação com a solução de Fehling não apresentam o metal, confirmando que ele é resultante da metodologia de purificação que utiliza compostos com cobre (CuSO₄). A quantidade do metal presente na amostra GGFISFEH é menor do que a observada em GGFEH.

Com a possibilidade de aplicação farmacológica é importante avaliar a quantidade de cobre. Para a aplicação na técnica terapêutica de

viscossuplementação em humanos, os produtos comerciais são injetados no volume de 2 mL por articulação doente. A solução de GGFISFEH empregada nos teste farmacológicos em ratos Wistar tem uma concentração de 0,8% de goma em solução salina. Considerando o volume de 2 mL (injeção) e a massa de goma contida neste volume (baseada na concentração de goma nos ensaios farmacológicos), tem-se ao final um teor de cobre de 3,2 ppm por cada injeção.

A presença de cobre no corpo humano é conhecida há muito tempo, sendo que sua concentração varia de acordo com o órgão, o cérebro humano, por exemplo, tem um teor de cobre de 3,6 ppm. Este metal desempenha papel fisiológico importante e deve ser ingerido diariamente na quantidade estimada de 2 a 5 mg por dia [Sargentelli, Mauro e Massabni, 1996].

As três injeções de 2 mL de uma solução de GGFISFEH com 3,2 ppm de cobre, em um intervalo de 6 meses, daria uma quantidade de 0,192 mg do metal nesse período. Em relação à quantidade de cobre na alimentação diária, a quantidade de cobre que se estaria adicionando ao organismo com o tratamento com GGFISFEH seria desprezível. Entretanto, como o tratamento de viscosuplementação é localizado (diretamente na articulação) deve ser investigada a ação deste metal no ambiente intra-articular.

4.1.2.4. Determinação da viscosidade intrínseca e da massa molar viscosimétrica média

A viscosidade intrínseca foi calculada para cada uma das amostras de goma guar pela extrapolação da reta até a concentração igual a zero no gráfico de viscosidade reduzida (η_{red}) a várias concentrações (Figura 29).

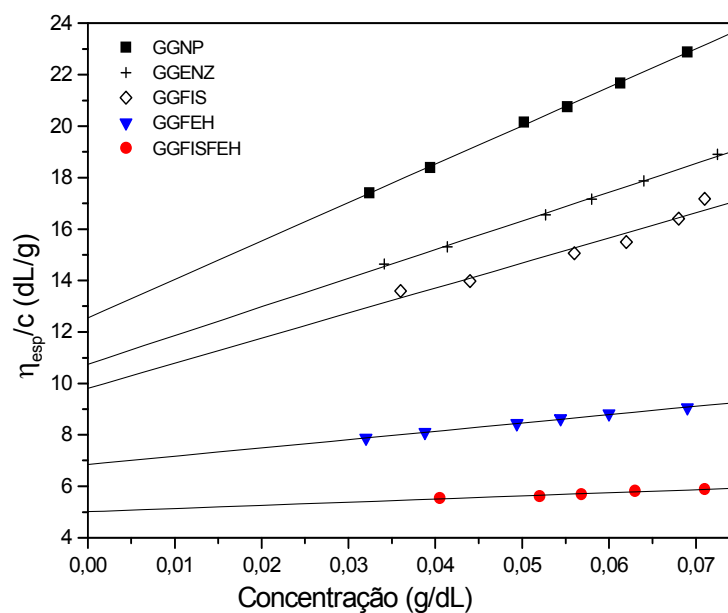


FIGURA 29 - Gráficos de viscosidade reduzida *versus* concentração para as amostras de goma guar em água, T=25°C.

A Tabela 7 mostra os valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$ e de massa molar viscosimétrica média (M_v) calculada através da relação de Mark-Houwink, para goma guar [Wang, Ellis e Ross-Murphy, 2002], como mostrado na Equação 2, com $[\eta]$ expresso em dL/g.

$$[\eta] = 3,8 \times 10^{-4} M_v^{0,72} \quad (\text{Equação 2})$$

TABELA 7 - Massas molares viscosimétricas para as amostras de goma guar purificadas e não purificadas

Amostra	$[\eta]$ (dL/g)	$M_v \times 10^{-6}$ (g/mol)
GGNP	12,55	1,88
GGENZ	10,85	1,54
GGFIS	9,87	1,35
GGFEH	7,03	0,84
GGFISFEH	4,89	0,51

A Tabela 7 mostra que os dois métodos de purificação que utilizam a solução de Fehling são aqueles que apresentam os menores valores de massa molar. Pode-se explicar esta redução pelo fato de o tratamento com Fehling submeter o polissacarídeo a um meio alcalino, podendo haver assim alguma degradação do material. Dea e Morrison [1975] relatam a eficiência da formação de complexo com cobre para a purificação de galactomananas, e a possibilidade de clivagem da cadeia polissacarídica. A degradação que resulta na redução da massa molar nos procedimentos que utilizam solução de Fehling deve ser resultante do tempo de contato das soluções de goma guar com um meio suficientemente alcalino para resultar na degradação deste polissacarídeo. Está relatado [Prabhanjan, Gharia e Shivastava, 1989] que soluções aquosas (1%) de goma guar em meio alcalino (4% NaOH) à temperatura de 34°C sofrem redução de sua viscosidade para 1/3 do valor inicial após 4 horas de contato entre o polissacarídeo e este meio.

Em GGENZ a redução de massa molar pode ser atribuída à etapa de centrifugação que é realizada durante o processo de purificação. Material não totalmente solubilizado e de maior massa molar pode estar sendo removido. A GGFIS tem uma redução ainda maior de massa molar, sendo que tal redução é atribuída às sucessivas centrifugações e descarte de porções com menor solubilidade com massas molares possivelmente mais elevadas. A redução para a GGFEH é ainda maior. Considerando que em tal método, a GGNP é diretamente precipitada com solução de Fehling, sem etapas de centrifugação, pode-se atribuir uma redução tão significativa ao contato da solução do polissacarídeo com solução bastante alcalina que pode resultar numa degradação. A GGFISFEH apresenta a maior redução, isso devido o fato deste método ser a associação de dois métodos que reduzem a massa molar.

4.1.2.5. Estimativa da distribuição de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Para verificar como se encontrava a distribuição de massa molar das diversas amostras de goma guar após as purificações, realizou-se a análise por

cromatografia de permeação em gel. A Figura 30 mostra os cromatogramas para todas as amostras de goma, tanto purificada como não purificada.

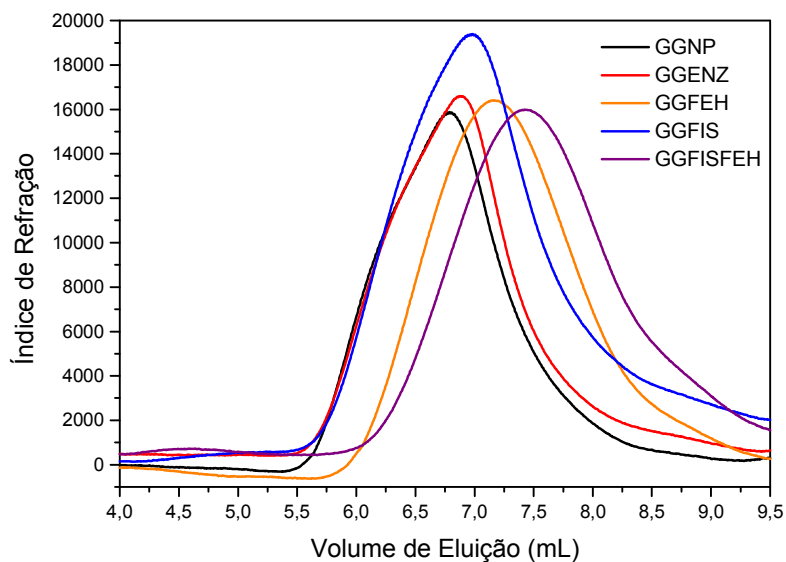


FIGURA 30 - Cromatograma para as várias amostras de goma guar purificadas e não purificada

Através de uma curva padrão de pululanas, encontrou-se uma relação para a massa molar de pico (M_{pk}) e o volume de eluição (V_e):

$$\log M_{pk} = 13,47 - 0,974V_e \quad (\text{Equação 3})$$

Através desta relação encontrou-se as massas molares de pico para todas as amostras, mostradas na Tabela 8.

TABELA 8 - Massas molares de pico para as amostras de goma guar purificadas e não purificadas.

Amostra	V_e do pico (mL)	M_{pk} do pico x 10⁻⁶ (g/mol)
GGNP	6,77	4,5
GGENZ	6,87	3,5
GGFIS	6,99	2,7
GGFEH	7,16	1,8
GGFISFEH	7,41	1,0

A ordem nos valores de massa molar de pico é a mesma mostrada para a massa molar viscosimétrica. A distribuição de massa molar é mais homogênea para as amostras purificadas pelo método Fehling.

4.1.2.6. Estudo reológico das amostras de goma

A reologia das amostras de goma foi realizada em soluções aquosas em uma concentração de 1% (Figura 31).

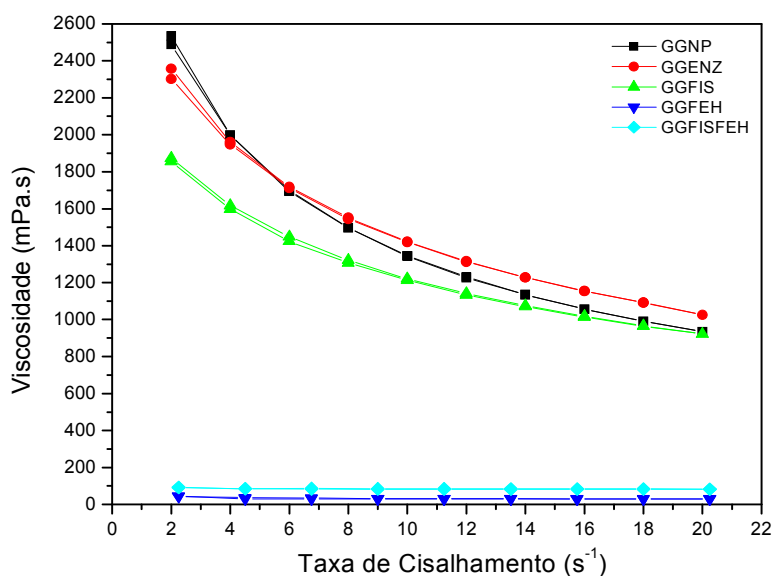


FIGURA 31 - Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento das amostras de GGNP e das gomas purificadas, solução aquosa 1%, T=25°C.

Para uma mesma faixa de taxa de cisalhamento, as amostras de GGFEH e GGFISFEH apresentam comportamento Newtoniano. A viscosidade (taxa de cisalhamento de 20 s⁻¹) para a GGFEH é de 30 mPa.s e para a GGFISFEH é de 82 mPa.s. As demais amostras de goma apresentam comportamento pseudoplástico e viscosidade bem mais alta do que às das duas amostras que foram purificadas utilizando-se método de Fehling. Para uma taxa de cisalhamento de 20 s⁻¹, GGENZ tem viscosidade de 1020 mPa.s e tanto GGNP quanto GGFIS de 933 mPa.s.

As propriedades reológicas de fluidos Newtonianos são independentes da taxa de cisalhamento e do histórico anterior de cisalhamento. Já os fluidos pseudoplásticos são caracterizados pelo decréscimo na viscosidade com um aumento na tensão de cisalhamento [McClements, 2005]. Esses fluidos em repouso apresentam um estado desordenado, e quando submetidos a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. Quanto maior a tensão aplicada, maior será a ordenação. Conseqüentemente, a viscosidade aparente será menor [Holdsworth, 1971].

As amostras purificadas pelo método de Fehling apresentam considerável redução na viscosidade aparente de suas soluções, o que está

condizente com a redução das massas molares constatada por GPC e viscosidade intrínseca.

4.1.2.7. Turbidez

A Tabela 9 mostra os valores de turbidez para as amostras de GGNP e gomas purificadas.

TABELA 9 - Turbidez das soluções aquosas 0,1% de guar purificada e não purificada

Amostras	Turbidez (NTU)
GGNP	41,7
GGENZ	35,1
GGFIS	18,8
GGFEH	22,7
GGFISFEH	9,2

A goma guar não purificada (GGNP) mostra uma maior turbidez do que as demais amostras, devido ao fato de ela conter um total de açúcares contaminantes de 7,6%, glicose e arabinose, oriundos de polissacarídeos insolúveis, de fibras e/ou material celulósico [Mark e col., 1980]. A turbidez é causada pela presença de porções insolúveis de endospema [Seaman, 1980].

Para todos os procedimentos de purificação, houve redução da turbidez das amostras de guar. Tal redução demonstra que contaminantes de natureza insolúvel em água, contidos na guar comercial, foram removidos em menor ou maior grau. A amostra que apresenta a menor turbidez é a GGFISFEH, a mesma

que apresentou a maior redução de monossacarídeos contaminantes e a retirada mais eficiente de proteínas.

Prabhanjan, Gharia e Srivastava [1989], ao estudarem a modificação da goma guar e a influência da modificação na viscosidade da goma guar, encontraram um valor de turbidez de 35 NTU para uma solução aquosa (0,25%) de uma amostra comercial de guar.

O valor de turbidez das amostras purificadas parece não estar relacionada apenas com a presença de polissacarídeos contaminantes, mas também com a viscosidade.

O valor de turbidez de GGFEH é menor que o de GGFIS, sendo que o teor de açúcares contaminantes em GGFEH é bem maior que em GGFIS. Quando se compara GGFEH com GGENZ, apesar do teor de monossacarídeos contaminantes de GGFEH ser maior que GGENZ, o valor de turbidez de GGENZ é maior que o de GGFEH. Em cada um destes casos, a única forma de explicar a discordância da relação de turbidez com a presença de polissacarídeo contaminante é a diferença de viscosidade. Em todos os casos em que a turbidez foi maior para as amostras com menor teor de açúcares contaminantes, estas amostras apresentaram maior viscosidade. Em soluções com maiores valores de viscosidade, as partículas se encontram mais agregadas, resultando numa modificação do espalhamento de luz [Prabhanjan, Gharia e Srivastava., 1989].

4.1.2.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C

O espectro de RMN de ^{13}C da goma guar não purificada está mostrado na Figura 32.

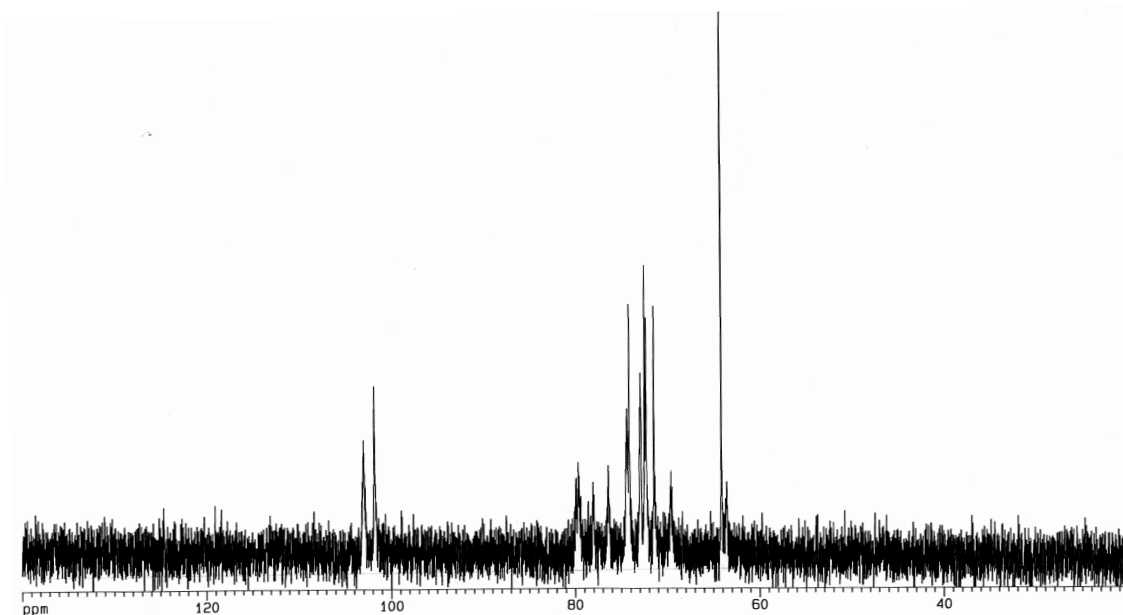


FIGURA 32 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN) da goma guar GGNP em D_2O .

Todas as atribuições dos deslocamentos utilizadas aqui estão baseadas nos estudos de Gransdalen e Painter [1980], sobre a composição e a seqüência das galactomananas de sementes de leguminosa (goma guar e goma da "locust bean") por ressonância magnética nuclear.

Primeiramente, enfocando-se a região de carbono anomérico, observa-se um pico em 103 ppm que é atribuído ao carbono anomérico (C1) da manose que pode estar ramificada ou não no carbono 6. Um outro pico de carbono anomérico (C1) em 101,8 ppm é atribuído ao C1 da galactose.

Em 79,9 e 79,6 ppm, tem-se sinais de C4 da manose tanto ramificada quanto não ramificada no carbono 6, enquanto que o C4 da galactose tem seu sinal 72,5 ppm. Tal diferença se deve ao fato de que na manose o C4 está participando da ligação glicosídica.

O sinal em 78,1 ppm é atribuído ao C5 da manose que não está ramificada no carbono 6 e o sinal em 76,4 ppm é atribuído ao C5 da manose que está ramificada no carbono 6. Esta diferença de 1,6 ppm deve-se à influência da ramificação que está no carbono 6. O C5 da galactose tem seu sinal em 74,1 ppm.

Na região de carbono primário C6 tem-se o sinal do C6 da galactose e para a manose tem-se dois sinais bem distintos, um em 69,6 ppm, que é atribuído ao C-6 da manose que está ramificada neste carbono, e o outro em 63,6 ppm,

atribuído ao C-6 da manose que não está ramificada. A diferença de 6 ppm se deve à presença da ramificação.

O espectro de RMN de ^{13}C da goma guar purificada GGFISFEH está mostrado na Figura 33.

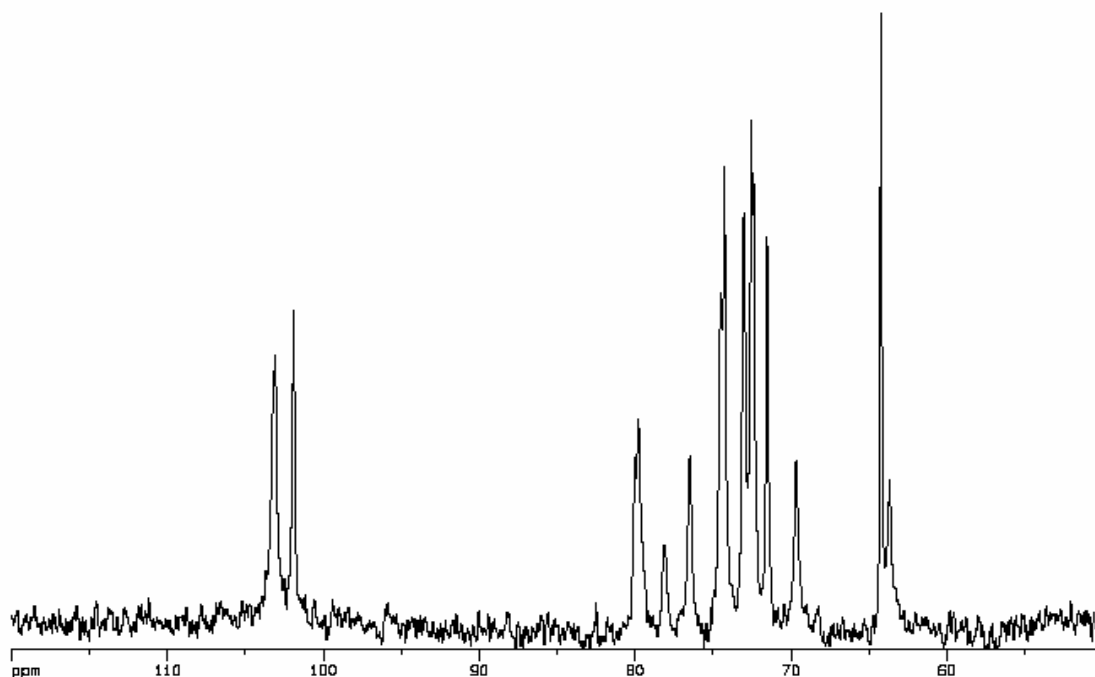


FIGURA 33 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN) da goma guar GGFISFEH em D_2O .

Os espectros de ^{13}C RMN para a GGFISFEH e GGNP são semelhantes, mostrando que a goma após o tratamento de purificação físico+Fehling mantém a sua estrutura inalterada.

A Tabela 10 apresenta as atribuições dos sinais observados para a goma guar, comparados com os dados da literatura.

TABELA 10 - Atribuições dos picos de ^{13}C (RMN) da goma guar (GGNP e GGFISFEH) deste trabalho e da referência [Gransdalen e Painter, 1980].

Tipo de unidade	Goma Guar	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α -D-galactopiranosil	Referência	101,8	72,3	71,4	72,5	74,1	64,1
	GGFISFEH	101,9	72,4	71,5	72,5	74,3	64,2
	GGNP	101,8	72,3	71,5	72,5	74,2	64,2
β -D-manopiranosil não ramificada em C 6	Referência	103,0	72,9	74,4	79,3* 79,6**	78	63,6
	GGFISFEH	103,1	73,0	74,5	79,6	78,2	63,7
	GGNP	103,0	72,9	74,4	79,6	78,1	63,6
β -D-manopiranosil ramificada em C 6	Referência	103,0	72,9	74,4	79,6* 79,9**	76,4	69,6
	GGFISFEH	103,1	73,0	74,5	80,0	76,4	69,3
	GGNP	103,0	72,9	74,4	79,9	76,4	69,7

*Quando o resíduo anterior de manose não é ramificado. **Quando o resíduo anterior de manose é ramificado

4.1.2.9. Análise Termogravimétrica

Os termogramas e as DTG das gomas estão mostrados na Figura 34.

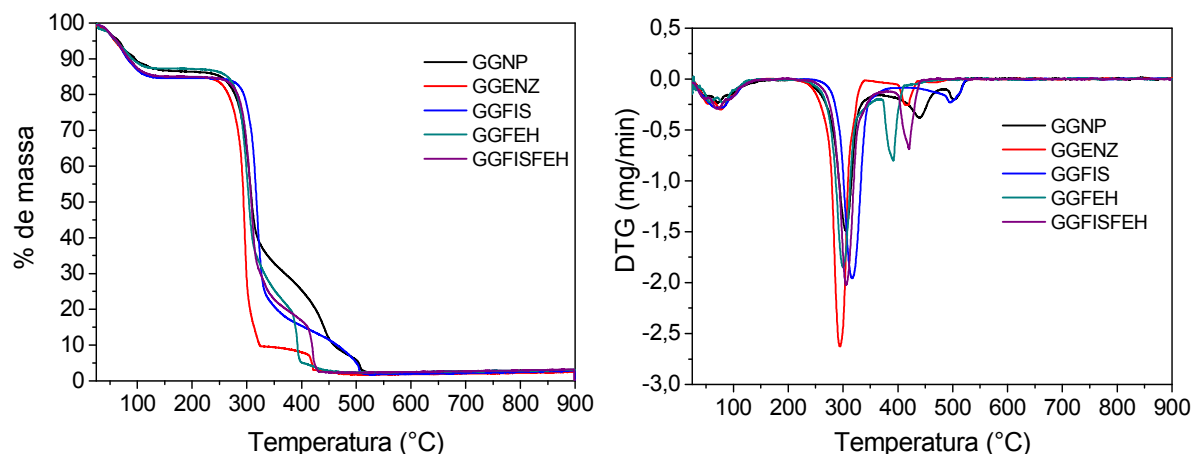


FIGURA 34 - Curvas termogravimétricas e DTG das amostras de guar a 10°C/min em ar.

Os parâmetros termogravimétricos: temperatura inicial de decomposição (T_i), temperatura de máxima decomposição (T_{max}) e IPDT foram encontrados e calculados (Tabela 11).

TABELA 11 - Parâmetros de estabilidade térmica das amostras de guar.

Amostras	T_i (°C)	T_{max} nos eventos (°C)				Umidade (%)	Resíduo em 900°C (%)	IPDT (°C)
		I	II	III	IV			
GGNP	233	67	307	440	504	13,1	3,7	355
GGENZ	233	70	297	417	-	14,4	2,7	296
GGFIS	250	69	317	503	-	14,9	2,9	327
GGFEH	232	66	302	387	-	11,1	4,4	312
GGFISFEH	236	68	308	416	-	14,6	3,7	318

Todas as amostras de goma apresentam um primeiro evento de perda de massa, que se deve à perda de umidade. O % de umidade das amostras varia entre 11 e 15%. O resíduo final em 900°C varia entre 2,7 e 4,4%. As amostras tratadas com a solução de Fehling apresentaram resíduo final ligeiramente superior ao das outras amostras purificadas, explicado pela presença de cobre.

Para a GGNP, ocorre a presença de três eventos de perda de massa que são associados à decomposição térmica, com temperaturas máximas (T_m) de

decomposição de 307, 440 e 504°C. Varma e col. [1997] encontraram dois eventos de decomposição termoxidativa da goma guar, com temperaturas máximas de 306 e 446°C e uma temperatura inicial de decomposição de 231°C.

As demais amostras apresentam apenas dois eventos de perda de massa associados à decomposição térmica. A amostra GGFEH é a que apresenta as mais altas temperaturas máximas de decomposição, sendo estas 317 e 503. A T_m do 1º evento de decomposição para as amostras de guar variou de 297 a 317°C. A T_m do 2º evento de decomposição para as amostras de guar variou de 387 a 503°C.

Os valores de IPDT das amostras listadas na Tabela 11 mostram o maior valor desta temperatura para a amostra GGNP. A amostra GGENZ mostra o menor valor de IPDT e os menores valores de temperaturas máximas de decomposição, indicando que tal amostra apresenta a menor estabilidade térmica. Todos os métodos de purificação utilizados resultaram em alguma mudança no comportamento termogravimétrico da GGNP.

Todos os métodos de purificação testados retiraram proteínas e polissacarídeos contaminantes. As amostras purificadas apresentaram também redução na turbidez. Dentre os métodos utilizados, o físico+Fehling resultou em retirada completa das proteínas, maior redução de açúcares contaminantes, e originou uma goma cuja solução apresentou menor turbidez, entretanto a goma obtida teve a maior redução de massa molar e apresenta cobre residual. O método físico parece ter bom desempenho, já que reduz bastante o teor de proteína (redução de 98%) e reduz o teor de açúcares contaminantes de modo semelhante ao do método físico+Fehling, entretanto a solução da GGFIS tem o dobro da turbidez da solução da GGFISFEH. A vantagem deste método é que ele ocasiona uma pequena redução na massa molar do polissacarídeo e este não apresenta cobre residual em sua composição.



4.2. Reticulação de diversos polissacarídeos



4.2. RETICULAÇÃO DE DIVERSOS POLISSACARÍDEOS

Os resultados dos testes de reticulação de alguns polissacarídeos com glutaraldeído estão resumidos na Tabela 12.

TABELA 12 - Resultado da reticulação de vários polissacarídeos com glutaraldeído

Polissacarídeo	Concentração	Proporção Goma /GA (v/v)	Tempo de reação (dias)	Reticulação
Goma Caraia	1%	20/1	16	Não
Goma do Cajueiro	1%	20/1	16	Não
Goma do Chichá	0,5%	40/1	16	Não
	0,5%	20/1	16	Não
	1%	10/1	16	Não
	1%	20/1	16	Não
	2%	5/1	16	Não
	2%	2,5/1	16	Não
Goma Guar	0,8%	40/1	16	Sim
	0,8%	25/1	16	Sim
Goma Xantana	0,5%	40/1	16	Não
	0,5%	20/1	16	Não
Dextrana	2%	5/1	16	Não
	5%	4/1	16	Não
Agar	0,8%	40/1	16	Não

A reticulação de outros polissacarídeos, que não goma guar, não foi possível, pelo menos nas condições avaliadas. Os polissacarídeos mostrados na Tabela 12 têm estruturas diferentes, sendo de alta e baixa viscosidade, carregados negativamente ou neutros, ramificados ou lineares, não sendo assim possível associar a não ocorrência de reticulação com características estruturais (Tabela 13).

TABELA 13 – Resumo da características estruturais do polissacarídeos testados na reticulação com glutaraldeído

Polissacarídeo	Monossacarídeos	Grupamento Iônico	Presença de ramificação
Goma Caraia	Ácido galacturônico, ramnose e galactose	Carboxílico	Sim
Goma do Cajueiro	Galactose e arabinose	Carboxílico	Sim
Goma do Chichá	Galactose, ramnose, ácido galacturônico e glucurônico	Carboxílico	Sim
Goma Guar	Manose e galactose	-	Não
Goma Xantana	Glucose, manose e ácido glucurônico	Carboxílico	Sim
Dextrana	Glucose	-	Não
Agar	Galactose	Sulfato	Sim



4.3. Reticulação de Goma Guar



4.3. RETICULAÇÃO DA GOMA GUAR

4.3.1. Fatores que influenciam a reação de reticulação

4.3.1.1. Proporção de goma guar : glutaraldeído

Para verificar como a quantidade de glutaraldeído influencia na cinética da reação de reticulação, acompanhou-se a variação de viscosidade de cada mistura reacional com três proporções diferentes de goma guar (GGNP)/ glutaraldeído (GA): 320 mg/3,75 mmol; 320 mg/2,50 mmol e 320 mg/1,25 mmol (Figura 35).

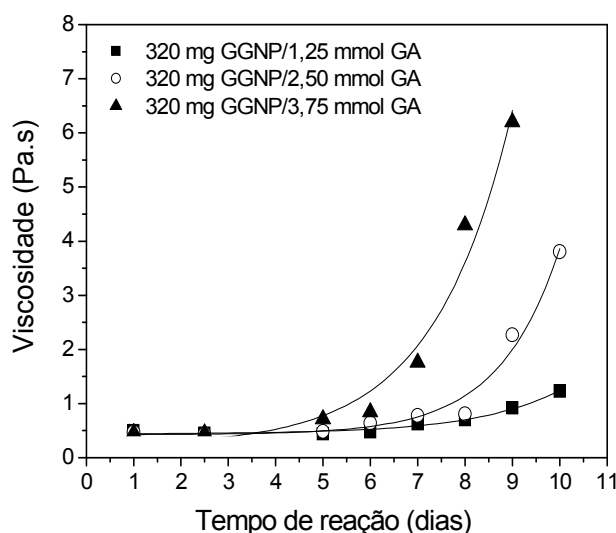


FIGURA 35 - Cinética de reação da reticulação da GGNP em três proporções diferentes de goma/glutaraldeído. Taxa de cisalhamento de 3 s^{-1} a 36°C .

Para as três proporções de mistura reacional, o aumento da viscosidade das misturas ocorre de um modo exponencial (Figura 35). No início da reação, as três misturas tem viscosidades semelhantes, sendo em média de 0,5 Pa.s. Até o 4º dia de reação, nenhuma das misturas apresenta aumento de viscosidade.

Para a proporção 320mg GGNP/3,75 mmol GA, a partir do quarto dia de reação observa-se o início do aumento da viscosidade, sendo este crescimento bem acentuado em relação às demais proporções a partir do sétimo dia de reação. Para a proporção 320mg GGNP/2,5 mmol GA um aumento na viscosidade de mesma magnitude do que ocorreu no sétimo dia para proporção 320mg GGNP/ 3,75 mmol GA só veio a ocorrer no nono dia, e para a proporção 320mg GGNP/

1,25 mmol GA somente no décimo primeiro dia de reação. Para a proporção 320mg GGNP/3,75 mmol GA, no nono dia de reação, observa-se um aumento na viscosidade de doze vezes. Já para a proporção 320mg GGNP/2,5 mmol GA, neste mesmo tempo, o aumento foi de 4,5 vezes e para a proporção 320mg GGNP/1,25 mmol GA o aumento foi de apenas duas vezes.

Fica evidenciado que, mantida constante a quantidade de goma, ao aumentar-se a quantidade de glutaraldeído, a velocidade de formação do gel também aumenta proporcionalmente. A formação do gel reportado por Gliko-Kabir e col. [1999] ocorre em até 48 horas de reação. Os hidrogéis reportados neste trabalho só foram efetivamente formados após o décimo dia de reação.

4.3.1.2. Tipo de glutaraldeído

Devido à demora na ocorrência da reação de reticulação da goma guar com o glutaraldeído da VETEC, resolveu-se avaliar se a procedência deste reticulante interferiria na velocidade da reação. Foram feitas reações de reticulações com glutaraldeído de marcas diferentes nas mesmas condições que a proporção 320 mg GGNP/1,25 mmol GA, sendo um glutaraldeído proveniente da VETEC e o outro da SERVA. A Figura 36 mostra o acompanhamento do aumento da viscosidade com o tempo de reação.

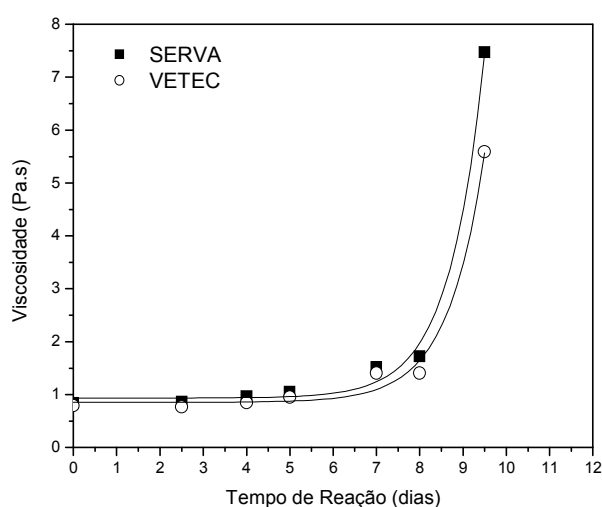


FIGURA 36 - Cinética da reação de reticulação de GGNP com glutaraldeído da VETEC e da SERVA na proporção 320 mg GGNP/ 2,50 mmol GA. Taxa de cisalhamento de 2 s^{-1} a 36°C .

A cinética de reticulação demonstra que não há diferenças representativas na velocidade com que as duas reações de reticulação ocorrem. A origem do glutaraldeído parece não ser fator determinante na velocidade de reação de reticulação.

4.3.2. Reticulação da GGNP e GGFISFEH

4.3.2.1. Reologia comparativa da goma GGNP e GGFISFEH, dos seus géis GelGGNP, GelGGFISFEH e do Hilano G-F 20

A reologia de fluxo da solução de guar purificada GGFISFEH na concentração de 0,8% em solução salina (NaCl 0,9%) foi realizada variando a taxa de cisalhamento e verificando qual o efeito desta sobre a viscosidade. A Figura 37 mostra que a solução de GGFISFEH apresenta um comportamento de fluxo com certa pseudoplastia e uma viscosidade na faixa de 65 a 50 mPa.s.

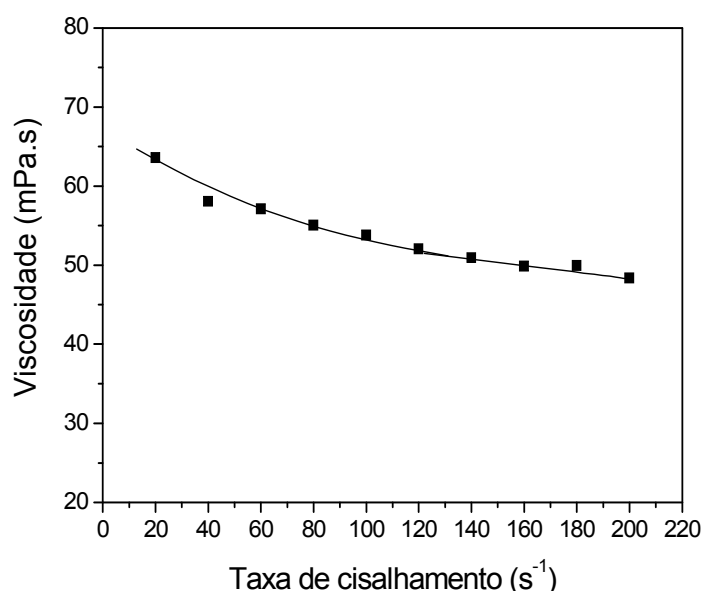


FIGURA 37 – Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento a 36° para a solução de GGFISFEH 0,8% em salina (NaCl 0,9%).

A Tabela 14 mostra o valor de viscosidade aparente calculado em reômetro cone-placa para a goma guar em solução e seu hidrogel, comparando-se

o valor destas viscosidades com a do medicamento utilizado no tratamento de viscosuplementação, Hilano G-F 20.

Para a GGNP, após a formação do gel, houve um aumento de quarenta vezes no valor de viscosidade. Já para a GGFISFEH, com a formação do gel, a viscosidade teve um aumento de quase 850 vezes. Isso demonstra que a reticulação com glutaraldeído mudou completamente a ordem de grandeza da viscosidade da goma guar, tanto para a goma purificada como para a não purificada. Nestas condições de análise, o GelGGNP e GelGGFISFEH têm viscosidade muito semelhante à viscosidade do Hilano G-F 20 (medicamento utilizado em viscosuplementação).

TABELA 14 – Viscosidades das gomas GGFISFEH, GGNP, dos géis de GGNP e de GGFISFEH e do Hilano G-F20, taxa de cisalhamento de $0,02 \text{ s}^{-1}$ a 36°C

Amostras	Viscosidade (Pa.s)
GGNP	3,6
GelGGNP	110
GGFISFEH	0,13
GelGGFISFEH	110
Hilano G-F 20	120

O aspecto macroscópico do gel de goma guar purificada GGFISFEH está mostrado na Figura 38.



FIGURA 38 – Aspecto macroscópico do gel de goma guar purificada GelGGFISFEH.

4.3.2.2. Reologia Oscilatória dos GelGGFISFEH e do Hilano G-F 20

A fim de estudar as propriedades viscoelásticas do GelGGFISFEH e do medicamento Hilano, foram feitos ensaios de reologia oscilatória para estes materiais.

Os materiais viscoelásticos são materiais que apresentam propriedades que poderiam ser caracterizadas como intermediárias, entre às de um sólido elástico ideal e às de um líquido ideal (Newtoniano).

Normalmente, os corpos sólidos possuem uma forma preferencial, que é a forma que ele assume espontaneamente, quando nenhuma força está agindo sobre ele. Quando um trabalho mecânico é aplicado a um corpo sólido perfeito, este, durante a deformação, armazena todo trabalho como energia. Esta energia é chamada de energia elástica ou de energia livre de deformação. Quando o trabalho, ou força externa, é removido, o sólido ideal volta à sua forma original pela ação dessa energia, nele armazenada. Este retorno à forma original é denominado recuperação elástica [Tager, 1975].

Um corpo líquido não possui forma preferencial. Em um líquido perfeito, a tensão depende unicamente da velocidade de cisalhamento. Isto significa que, a cada momento, a tensão está subordinada diretamente à velocidade com que a

deformação está sendo feita. Nos líquidos Newtonianos, o trabalho mecânico gasto para produzir a deformação é dissipado instantaneamente, sob a forma de calor. Nestes casos, portanto, o histórico da deformação é irrelevante [Vinogradov e Malkin, 1980].

O material é dito viscoelástico quando apresenta propriedades de sólido e líquido simultaneamente, ou seja, parte da energia aplicada é armazenada e outra parte é dissipada como calor.

A viscoelasticidade de um material pode ser medida através de análises dinâmicas ou oscilatórias, onde a solução é submetida a uma tensão ou deformação senoidal oscilatória de pequena amplitude no decorrer do tempo a uma dada frequência. Quando um material viscoelástico é submetido a uma força oscilatória senoidal, a deformação não se encontra exatamente em fase com a tensão (como seria para um sólido perfeito), nem 90° , fora de fase (como seria para um líquido viscoso), mas em ângulo intermediário. Uma parte da energia armazenada é recuperada em cada ciclo e outra parte é dissipada como calor [Ferry, 1980].

O caráter sólido e líquido pode ser quantificado. O módulo de cisalhamento elástico (G') é a razão entre tensão aplicada e deformação provocada em fase, enquanto que o correspondente parâmetro para a resposta fora de fase é o chamado módulo de cisalhamento viscoso (G'') [Morris, 1995].

O módulo de cisalhamento elástico diz respeito ao caráter sólido do material, enquanto que o módulo de cisalhamento viscoso refere-se ao caráter líquido. A energia usada na deformação de um sólido elástico é recuperada quando a amostra retoma ao seu estado original, enquanto que para um líquido ideal não há tal recuperação, e a energia é perdida. Assim, os módulos G' e G'' são também denominados módulos de armazenamento e de perda, respectivamente [Morris, 1995; Mitchell, 1984]. Para um material perfeitamente elástico toda a energia é armazenada, a tensão e a deformação encontram-se em fase, e G'' é igual a zero. Para um líquido que não possui nenhuma propriedade elástica toda a energia é dissipada como calor, G' é igual a zero, e a tensão e a deformação estão fora de fase.

Primeiramente, em um experimento de reologia oscilatória, deve se determinar a faixa de viscoelasticidade linear em relação à tensão ou à deformação. Nesta região os módulos G' e G'' são independente da tensão ou deformação aplicada ao sistema. A fim de determinar a região de viscoelasticidade linear para o GelGGFISFEH e o Hilano G-F 20, foram realizadas varreduras de tensão (0,06 a 5 Pa) em frequências angulares entre 0,1 a 20 rad/s (Figura 39).

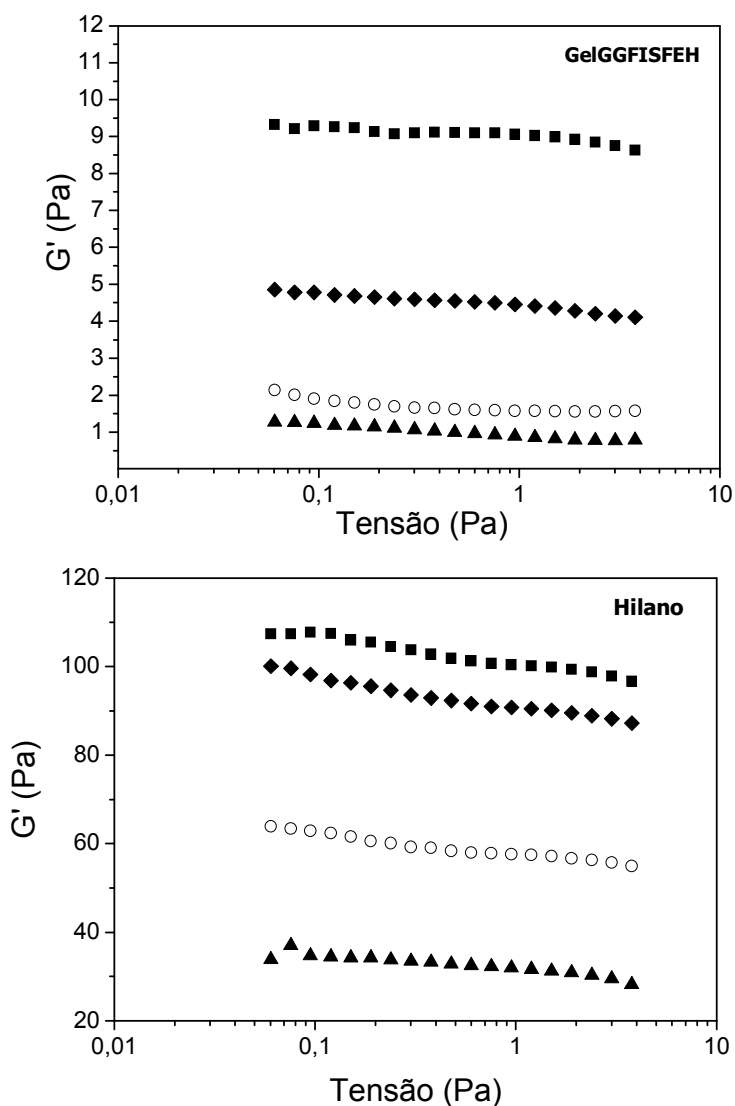


FIGURA 39 – Varredura de tensão para determinação de comportamento viscoelástico linear para GelGGFISFEH (■ 0,1 rad/s, ◆ 1 rad/s, ○ 10 rad/s e ▲ 20 rad/s) e Hilano G-F 20 (■ 0,1 rad/s, ◆ 0,63 rad/s, ○ 6,3 rad/s e ▲ 18,8 rad/s) a 36°C.

Em toda a faixa de tensão estudada, para os dois materiais, os valores de G' tiveram pouca variação. A partir destes resultados, escolheu-se uma tensão de 0,75 Pa para se fazer a varredura de frequência.

O comportamento viscoelástico pode então ser avaliado, verificando-se como os dois módulos de viscoelasticidade se comportam frente à variação da frequência de oscilação do experimento.

A Figura 40 mostra o comportamento viscoelástico do GelGGFISFEH e Hilano G-F 20.

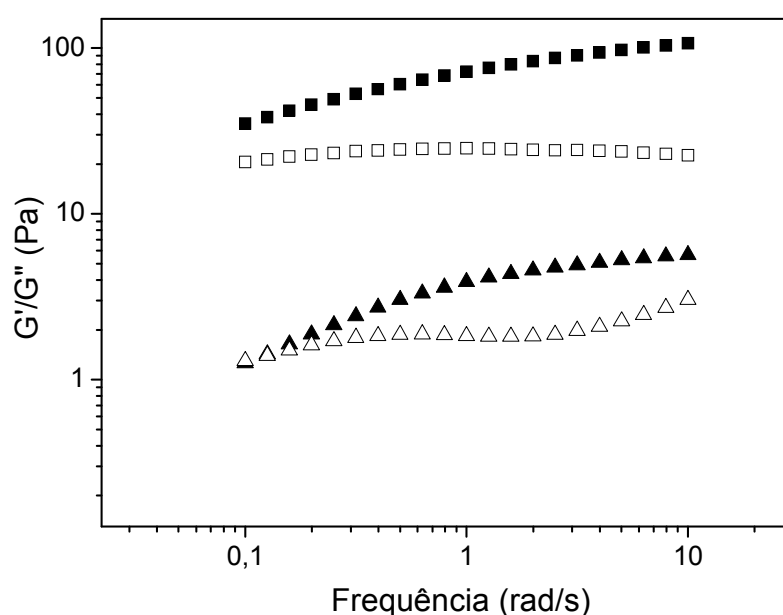


FIGURA 40 – Análise do comportamento viscoelástico para GelGGFISFEH ($\blacktriangle G'$, $\triangle G''$) e Hilano G-F 20 ($\blacksquare G'$, $\square G''$) a 36°C.

O Hilano apresenta os módulos de cisalhamento G' e G'' maiores que os mesmos módulos para o GelGGFISFEH. Para este gel, G' é igual a G'' (chamado ponto de gel) até uma frequência de 0,2 rad/s. Após esta frequência G' é sempre maior que G'' , tendo um valor máximo da relação G'/G'' de 2,6 em frequência angular de 2,5 rad/s. A média da relação G'/G'' para este material foi de 1,8.

Para o Hilano a relação G'/G'' máximo foi de 5,3 em frequência de 10 rad/s. Este material tem um relação $G'/G'' < 3$ até uma frequência de 1,26 rad/s, só a partir desta frequência, $G'/G'' > 3$.

O líquido sinovial saudável na faixa de 0,1 a 10 rad/s, tem um comportamento de fluido viscoelástico, e na frequência correspondente à frequência de movimentação do joelho andando ou correndo, G' é sempre maior que G'' . [Pelletier e col., 2001]. Outra característica do líquido sinovial é que este tem um ponto de gel em uma frequência entre 1 e 2 rad/s.

A Figura 41 mostra o comportamento viscoelástico de GelGGFISFEH e Hilano na faixa de frequência do joelho normal (2 a 8 rad/s).

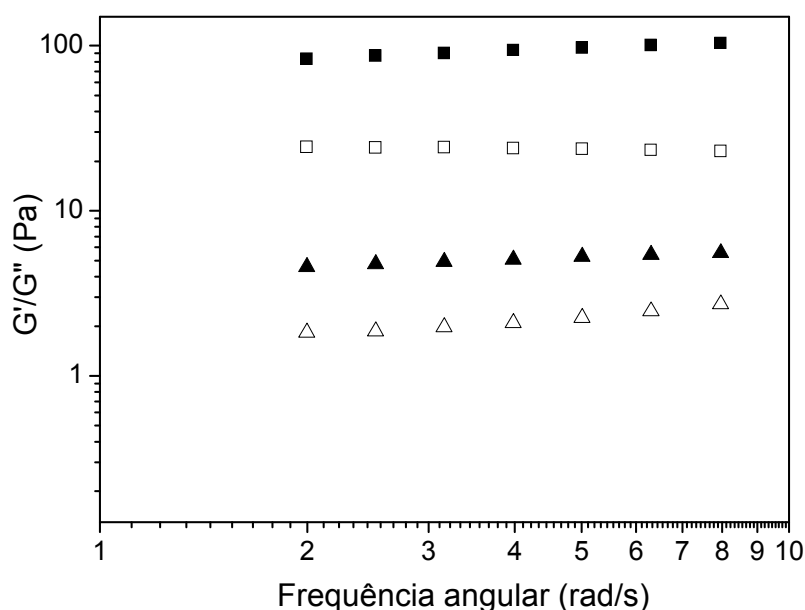


FIGURA 41 – Análise do comportamento viscoelástico para GelGGFISFEH (\blacktriangle G' , \triangle G'') e Hilano G-F 20 (\blacksquare G' , \square G'') a 36°C na faixa de frequência de movimentação do joelho.

Na faixa de movimentação do joelho, tanto o gel de goma guar quanto o Hilano apresentam G' sempre maior que G'' , comportamento semelhante ao líquido sinovial. Entretanto, os valores de G' do Hilano são consideravelmente maiores que o G' da gel de guar, caracterizando que o Hilano tem caráter mais elástico que o gel de guar.

O líquido sinovial doente apresenta propriedades reológicas completamente diferentes do saudável [Pelletier e col., 2002], apresentando G' sempre menor que G'' na faixa de frequência de movimentação do joelho e não apresentando um ponto de gel ($G'=G''$).

Outro estudo reológico foi realizado para o gel de guar e o Hilano. Submeteu-se os dois materiais a uma frequência constante de 2 rad/s por 30 minutos. O resultado deste experimento está mostrado na Figura 42.

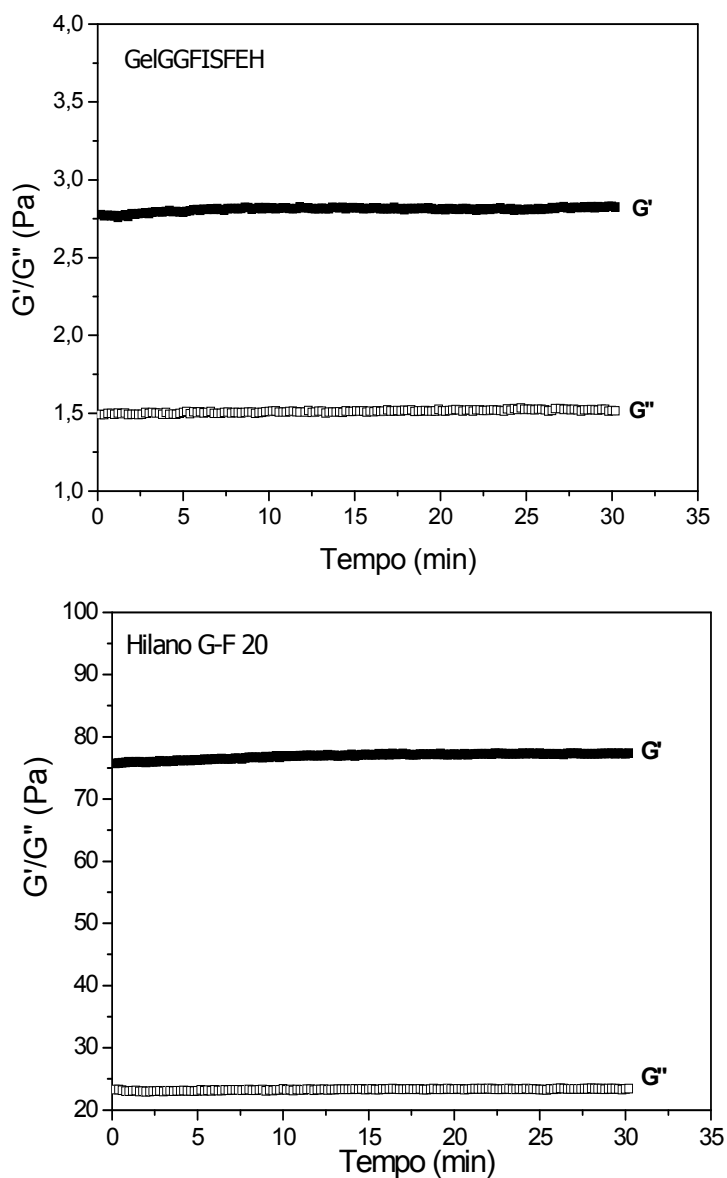


FIGURA 42 – Análise do comportamento viscoelástico para GelGGFISFEH e Hilano G-F 20 (■ G', □ G'') a 36°C, e frequência de 2 rad/s.

Em todo o intervalo de tempo avaliado os módulos G' e G'' se mantiveram constante, tanto para o gel de guar como para o Hilano G-F 20,

demonstrando a estabilidade das propriedades viscoelásticas na frequência avaliada (2 rad/s).

4.3.3. Caracterização comparativa da goma GGNP e GGFISFEH com seus géis

4.3.3.1. Conteúdo de água e teor de glutaraldeído

O conteúdo de água para o hidrogel de goma guar GelGGNP foi de 96% e para o GelGGFISFEH foi de 98%. O líquido sinovial tem a água como componente majoritário, pois está presente com um teor de 95% [Stanley, Francone e Lossow, 1990].

Já que o glutaraldeído tem toxicidade considerável, propõe-se um método de quantificação do residual deste reagente no hidrogel de goma guar.

O glutaraldeído apresenta um espectro na região do ultravioleta bem característico. Quando em solução, este se apresenta em duas formas distintas, como glutaraldeído monomérico e polimérico. Das duas formas, tem-se indícios de que a responsável pela reticulação seja a monomérica [Kawahara e col., 1992]. O espectro de absorção deste reticulante no ultravioleta possui duas bandas bastante distintas, uma em 235 nm, que é devido a espécie polimérica, e outra em 280 nm que é devido a espécie monomérica [Kawahara e col., 1992].

Tomando como base essa informação de que o glutaraldeído apresenta bandas características no ultravioleta, fez-se uma curva padrão onde se relacionou a concentração de glutaraldeído com a absorbância máxima no comprimento de onda (λ) de 235 nm. Soluções de glutaraldeído com concentrações conhecidas foram preparadas e suas absorbâncias medidas (Figura 43).

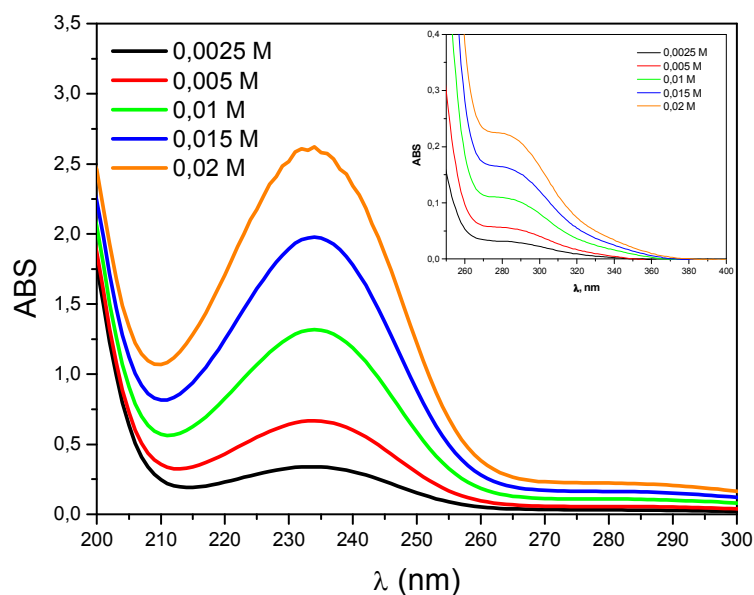


FIGURA 43 - Espectro de UV para as várias soluções padrão de glutaraldeído em tampão fosfato (pH = 7,3) e ampliação na região de comprimento de onda de 280 nm.

Encontrou-se uma relação linear ($R= 0,999$) entre a absorbância máxima (ABS) e a concentração (C) para o glutaraldeído, sendo esta:

$$\text{ABS} = - 0,0179 + 96,86 C \quad (\text{Equação 4})$$

Conhecida a absorbância da água de lavagem do gel (descrito no procedimento 3.6.14), considerando-se as diluições, calculou-se a quantidade de glutaraldeído residual no GelGGNP. Para os 2 mL de GelGGNP, a quantidade de glutaraldeído polimérico residual foi de $3,14 \times 10^{-6}$ mols.

Considerando-se que a dosagem a ser aplicada na articulação de ratos Wistar (200 g) é de 50 μL , a quantidade de GA pode ser expressa como mg de GA/kg do animal. O teor de glutaraldeído na injeção do GelGGNP é de 0,04 mg de GA/kg do animal. A DL-50 do glutaraldeído em injeção intraperitoneal é de 17,9 mg de GA por kg do animal [PTCL, 2006]. O residual de GA no GelGGNP é quase 490 vezes menor que a DL-50.

Pelo espectro na região do ultravioleta do glutaraldeído, observa-se que há uma predominância da espécie polimérica (banda em 235 nm). Já que a espécie preferencialmente responsável pela reticulação é a monomérica [Kawahara, 1992], pode-se supor que um maior tempo requerido para a formação do gel de guar neste trabalho deva-se à predominância da espécie polimérica.

No estudo de cinética de reticulação mostrado anteriormente, a reação de reticulação necessitava de um tempo mínimo para que começasse a ocorrer (normalmente 6 dias). Como as espécies monomérica e polimérica se encontram em equilíbrio [Kawahara, 1992], supõe-se que este tempo mínimo seja gasto para que ao consumir a espécie monomérica (que se encontra em uma quantidade muito pequena) o equilíbrio desloque-se no sentido de originar mais espécie monomérica e daí então a reação possa ocorrer mais rapidamente.

4.3.3.2. Infravermelho da GGNP e GGFISFEH e dos seus respectivos géis

Os espectros de infravermelho para a goma e o gel obtidos em pastilhas de KBr estão mostrados na Figura 44. Freqüências relativas aos grupos O-H ($3000-3490\text{ cm}^{-1}$), aos grupos C-O de álcool (1016 e 1074 cm^{-1}) e relativa a C-O-C (1159 cm^{-1}) são observadas de modo semelhante tanto para a goma guar como para o gel, sendo estas freqüências características de polissacarídeo.

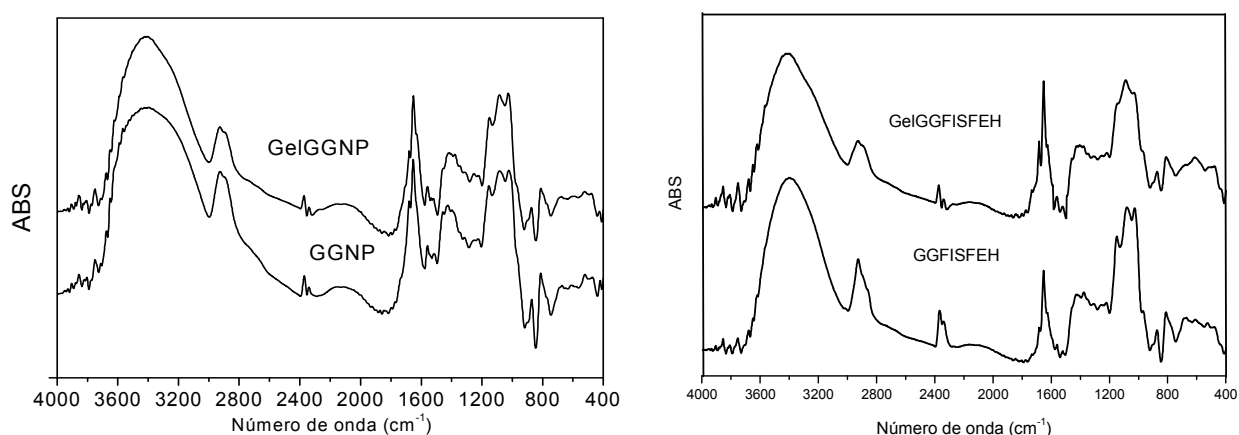


FIGURA 44 - Espectro de infravermelho da GGNP e seu gel e GGFISFEH e seu gel.

A banda em 1657 cm^{-1} é observada tanto para as gomas quanto para os géis, podendo ser atribuída à água presente como umidade. Ao comparar os

dois espectros de infravermelho, observa-se que estes são bastante semelhantes, indicando que nenhuma modificação que não fosse esperada tenha ocorrido na estrutura da goma guar quando submetida à reticulação, pois a reação de reticulação da goma guar com glutaraldeído não gera grupamentos diferentes daqueles já presentes na estrutura do polissacarídeo.

4.3.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da GGNP, GGFISFEH e dos seus géis.

A análise morfológica obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura das gomas e dos seus géis está mostrada na Figura 45.

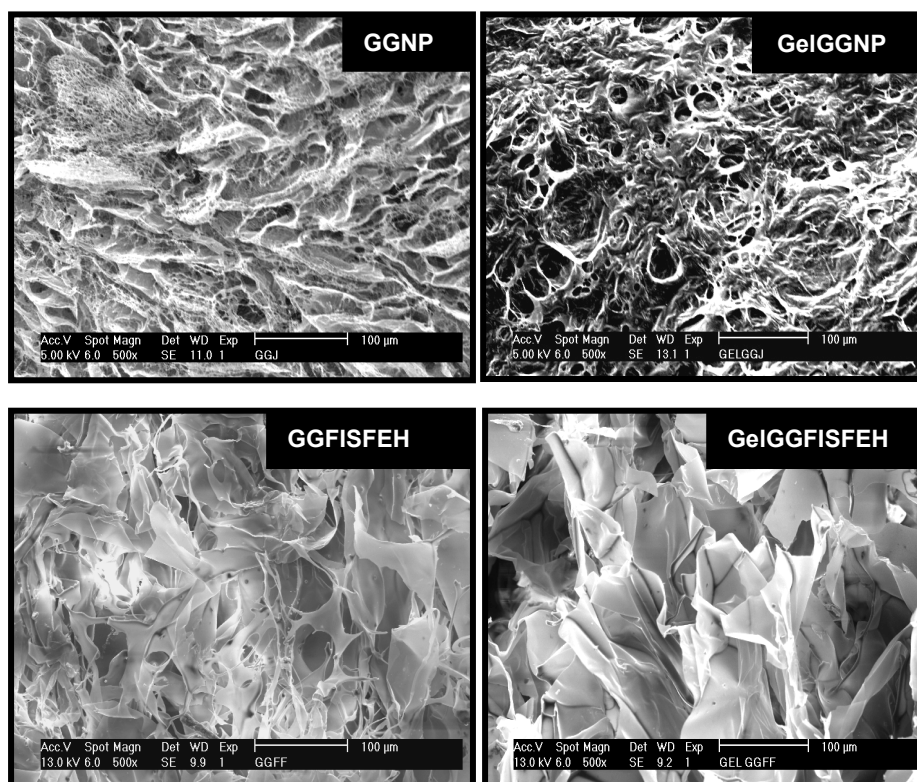


FIGURA 45 – MEV da GGNP, GELGGNP, GGFISFEH e GeIGGFISFEH (aumento de 500X)

Observando-se a análise morfológica da GGNP percebe-se que com a saída de água durante a secagem por liofilização forma-se uma estrutura frágil e de aspecto esponjoso. Já o gel apresenta poros bem definidos, formando canais

tridimensionais com diâmetros variados. A distribuição destes poros é bem homogênea, com eles formando uma rede com estrutura interconectada.

A GGFISFEH apresenta-se com uma estrutura mais compactada e menos esponjosa do que a da GGNP. Comparando-se GGFISFEH com seu gel, percebe-se uma estrutura com uma formação mais compactada para o gel. Diferentemente do gel de GGNP, o gel de FISFEH apresenta uma estrutura compactada e não porosa.

A análise morfológica do Hilano G-F 20 seco está mostrado na Figura 46.

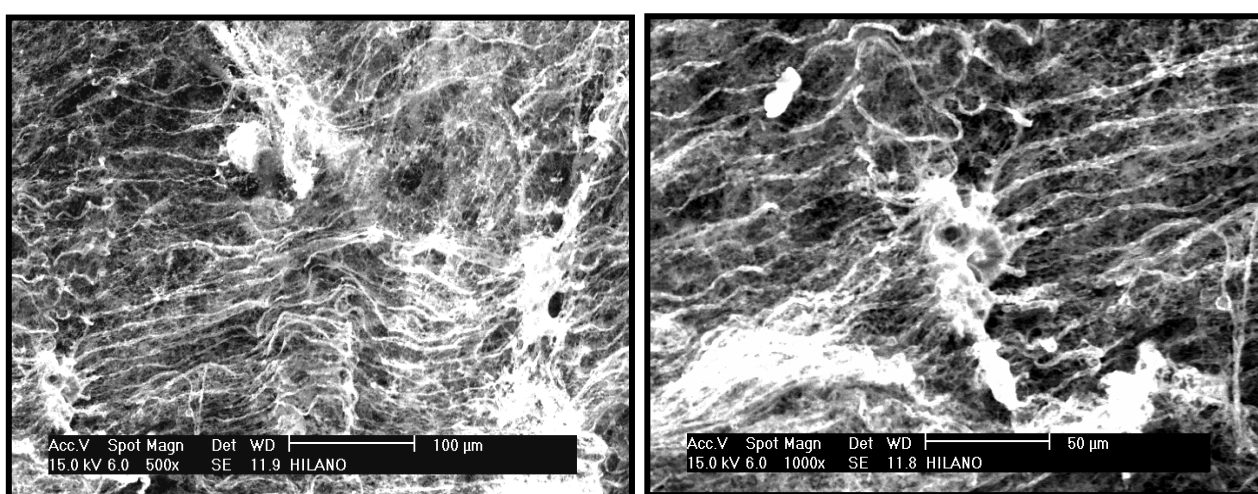


FIGURA 46 – MEV do Hilano G-F 20 dialisado e liofilizado (aumento de 500X e 1000X)

Percebe-se que com a saída de água durante a secagem por liofilização forma-se uma estrutura heterogênea, com regiões mais porosas e regiões mais compactadas. Essa diferença de regiões pode estar relacionada com a composição do Hilano G-F20, já que este é uma composição de material reticulado solúvel (Hilano fluido) e insolúvel (Hilano gel) em água. A parte do polissacarídeo em solução, quando congelada e seca, daria uma estrutura mais aberta (porosa). A parte insolúvel ficaria mais compactada em água e quando congelada e seca manteria essa compactação.

4.3.3.4. Análise termogravimétrica da GGNP, da GGFISFEH e dos seus géis

Os termogramas de TGA para a GG e GelGG liofilizados estão mostrados na Figura 47 em atmosfera de ar sintético.

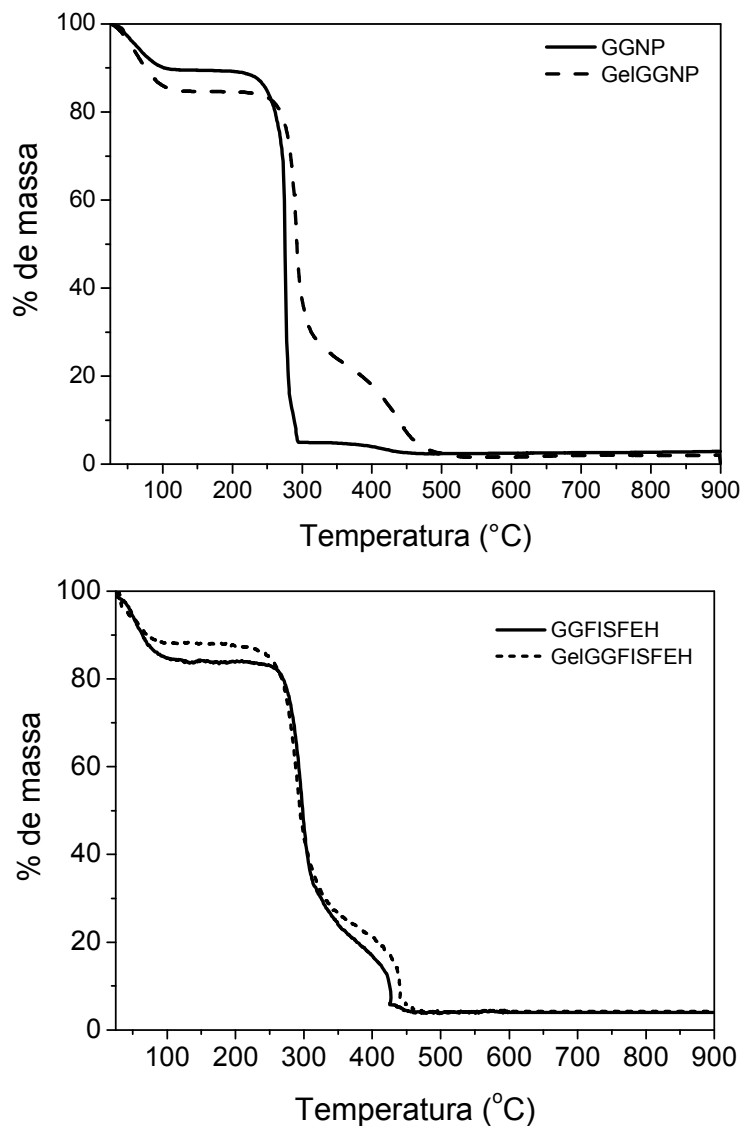


FIGURA 47 – Termograma das amostras de GGNP, GGFISFEH e dos seus géis obtida em atmosfera de ar sintético.

A Tabela 15 mostra o resumo dos parâmetros térmicos para as gomas e seus géis.

TABELA 15 – Análise termogravimétrica am ar sintético da GGNP, GGFSIFEH e dos seus géis

Amostra	T _i (°C)	T max nos eventos (°C)			%resíduo (900°C)
		I	II	III	
GGNP	174	67	276	-	2,7
GelGGNP	198	67	292	431	2,3
GGFISFEH	226	55	294	422	4,3
GelGGFISFEH	226	55	290	436	4,3

O primeiro evento de perda de massa para os quatro materiais corresponde à perda de umidade. Os outros eventos demonstrados são atribuídos à decomposição dos materiais. A temperatura inicial da GGNP é menor que a do seu gel. No entanto, tanto a GGNP quanto o seu gel têm temperaturas iniciais de decomposição menores que as temperaturas iniciais da GGFISFEH e do seu gel. Em atmosfera de ar sintético, a diferença entre a temperatura máxima de decomposição (T_{max}) mostrada pela DTG do gel e da goma GGNP foi de 16°C. Gliko-Kabir e col. [1999] encontraram diferenças de 10 a 30°C na T_{max} entre a goma guar e seus reticulados com GA. Para GGFISFEH não há diferença entre a temperatura máxima de decomposição e o seu gel, assim como também para os valores de temperatura inicial de decomposição.

Para a GGNP, a reticulação parece aumentar a estabilidade térmica desta goma, já para a GGFISFEH a reticulação não resulta em mudanças nos parâmetros de estabilidade térmica.

A diferença dos parâmetros de comportamento térmico da GGNP mostrada na Tabela 15, para os parâmetros mostrados na Tabela 11, se deve à forma da amostra. No caso da Tabela 11, a análise termogravimétrica foi realizada com a amostra na forma de pó, já no caso dos resultados da Tabela 15, a análise

termogravimétrica foi realizada com a GGNP na forma de uma pastilha obtida por liofilização.



4.4. Modificação da Goma Guar



4.4. MODIFICAÇÃO DA GOMA GUAR - INTRODUÇÃO DE GRUPOS CARREGADOS

4.4.1. Rendimento das reações de modificação da GGFISFEH

Os rendimentos para a reação de oxidação e sulfatação foram de 78% e 80%, respectivamente.

4.4.2. Caracterização da goma não modificada GGFISFEH e das modificadas GGOXID e GGSULF

4.4.2.1. Infravermelho

Com a finalidade de verificar a modificação estrutural nos derivados de GGFISFEH fez-se o espectro de infravermelho. Os espectros da goma sem modificação e após as modificações estão mostrados na Figura 48.

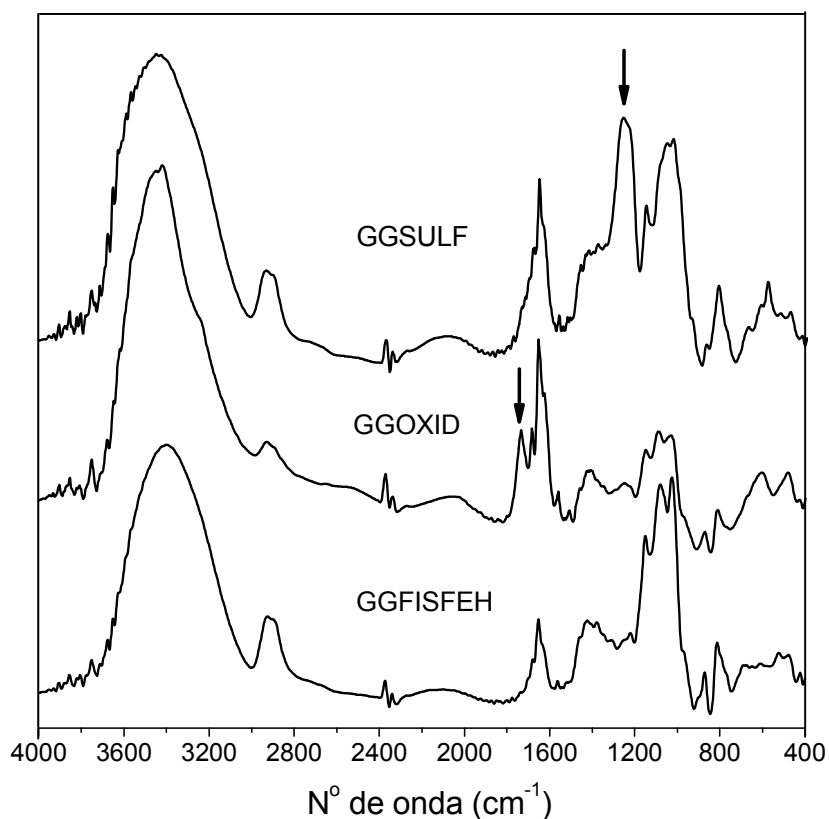


FIGURA 48 - Espectro de infravermelho de GGFISFEH, GGOXID e GGSULF.

Os espectros de infravermelho mostram claramente a modificação ocorrida na estrutura da goma. A goma guar oxidada apresenta uma banda diferenciada da goma guar sem modificação, sendo esta em 1730 cm^{-1} , atribuída ao grupamento carboxila (COOH).

A goma guar sulfatada também apresenta uma diferença em seu espectro, o aparecimento de uma banda em 1262 cm^{-1} bastante acentuada e a intensificação da banda em 813 cm^{-1} . O aparecimento da banda em 1262 cm^{-1} é atribuído ao estiramento assimétrico da ligação S=O, e a banda em 813 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração assimétrica de C-O-S.

Os espectros de infravermelho confirmam a modificação do polissacarídeo, tanto pela reação de oxidação, quanto pela sulfatação.

4.4.2.2. Determinação do teor de ácido urônico e grau de substituição

O teor de ácido urônico da GGFISFEH oxidada foi de 32% (m/m), apresentando assim um aumento no seu teor de ácido urônico de 10 vezes após a oxidação, já que inicialmente (sem a modificação) este material tinha 3% de ácido urônico.

O grau de substituição para a goma oxidada foi calculado pela titulação potenciométrica com solução de NaOH da solução do polissacarídeo carregada com grupos ácido. O volume gasto de NaOH foi relacionado ao número de moles de grupos ácido presentes. Este, por sua vez, foi relacionado com o número de mols de unidades monossacarídicas. O grau de substituição (razão entre o número de mols de grupos carboxilato e o número de mols de unidade monossacarídica) para a oxidada foi de 0,36.

O teor de enxofre da goma guar sulfatada, da goma não modificada e da goma modificada por sulfatação foi determinado por análise elementar. A goma não modificada apresentou um teor zero de enxofre, enquanto que a amostra modificada por sulfatação apresentou um teor de enxofre de 9,79%. Através do teor de enxofre, o grau de sulfatação da amostra foi calculado. O grau de

sulfatação (razão entre o número de moles de grupos sulfato e o número de moles de unidade monossacarídica) assim calculado foi de 0,60.

4.4.2.3. Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H

As amostras de GGFISFEH e GGOXID foram analisadas por ressonância magnética nuclear mono e bidimensional. A goma guar sulfatada GGSULF foi analisada apenas por RMN monodimensional.

Primeiramente avaliou-se os espectros da goma guar sem modificação GGFISFEH. A Figura 49 mostra o espectro de RMN de ^{13}C desta goma. As atribuições dos deslocamentos utilizadas estão baseadas nos resultados de Grandsalen e Painter [1980], onde os autores estudaram a composição e a seqüência das galactomananas de sementes de leguminosa (goma guar e goma da "locust bean") por ressonância magnética nuclear.

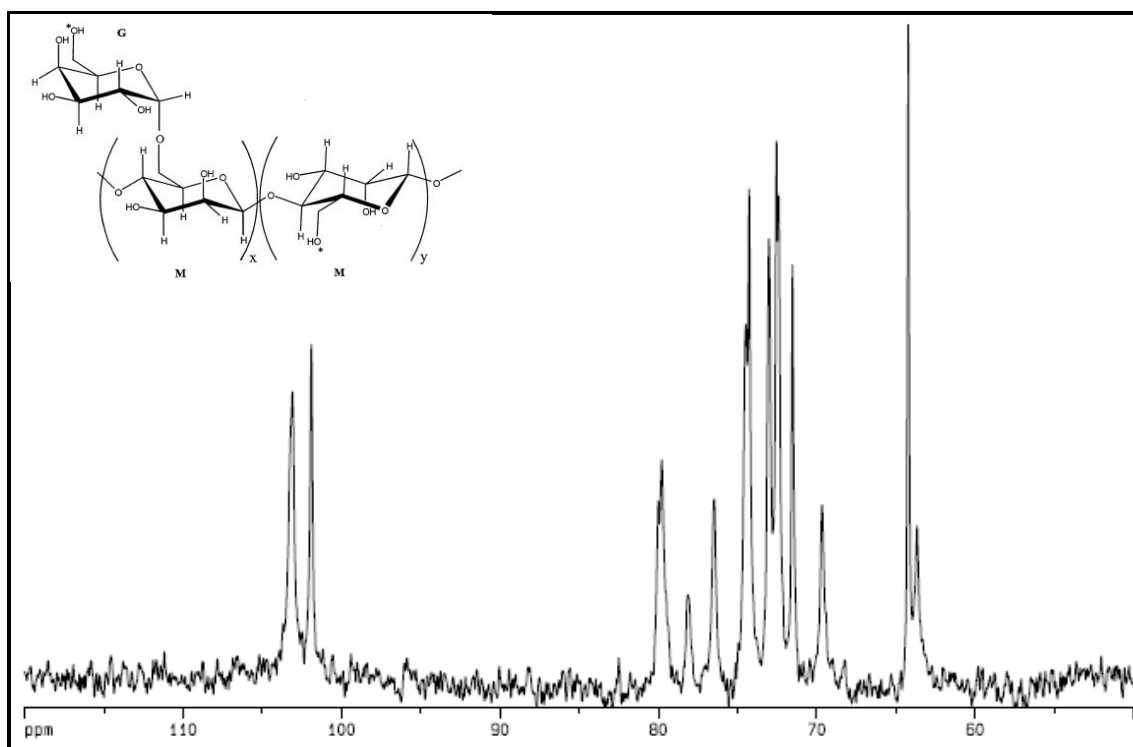


FIGURA 49 - Espectro de RMN- ^{13}C da goma GGFISFEH não modificada em D_2O .

Enfocando-se a região de carbono anomérico, observa-se um sinal em 103 ppm, atribuído ao carbono anomérico (C1) da manose que pode estar ramificada ou não no carbono 6. Um outro sinal em região de carbono anomérico (101,8 ppm) é atribuído ao C1 da galactose.

Na região de 80 a 71 ppm tem-se os sinais de C2 a C5 da galactose e manose. Na região de carbono primário tem-se o sinal do C6 da galactose (64,2 ppm) e para a manose tem-se dois sinais bem distintos, um sinal em 69,6 ppm, que é atribuído ao C6 da manose que está ramificada e um outro sinal em 63,6 ppm, atribuído ao C6 da manose que não está ramificada.

Com base no trabalho de Gransdalen e Painter [1980], os valores de deslocamento de ^{13}C para a goma guar GGFISFEH e suas atribuições estão mostrados na Tabela 16.

TABELA 16 – Atribuições dos deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C da goma GGFISFEH.

Deslocamento (ppm)	Atribuição
63,6	C6 manose livre
64,2	C6 galactose
69,7	C6 manose substituída
71,5	C3 galactose
72,4	C2 galactose
72,5	C4 galactose
73,0	C2 manose
74,3	C5 galactose
74,6	C3 manose
76,4	C5 manose substituída
78,2	C5 manose livre
80,0	C4 manose
101,9	C1 galactose
103,1	C1 manose

Para melhor elucidação da estrutura da guar sem modificação, foi realizado um RMN bidimensional, o HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), onde são observados os acoplamentos entre hidrogênio e carbono da mesma ligação química. O espectro de HMQC da goma guar não modificada (GGFISFEH) está mostrado na Figura 50.

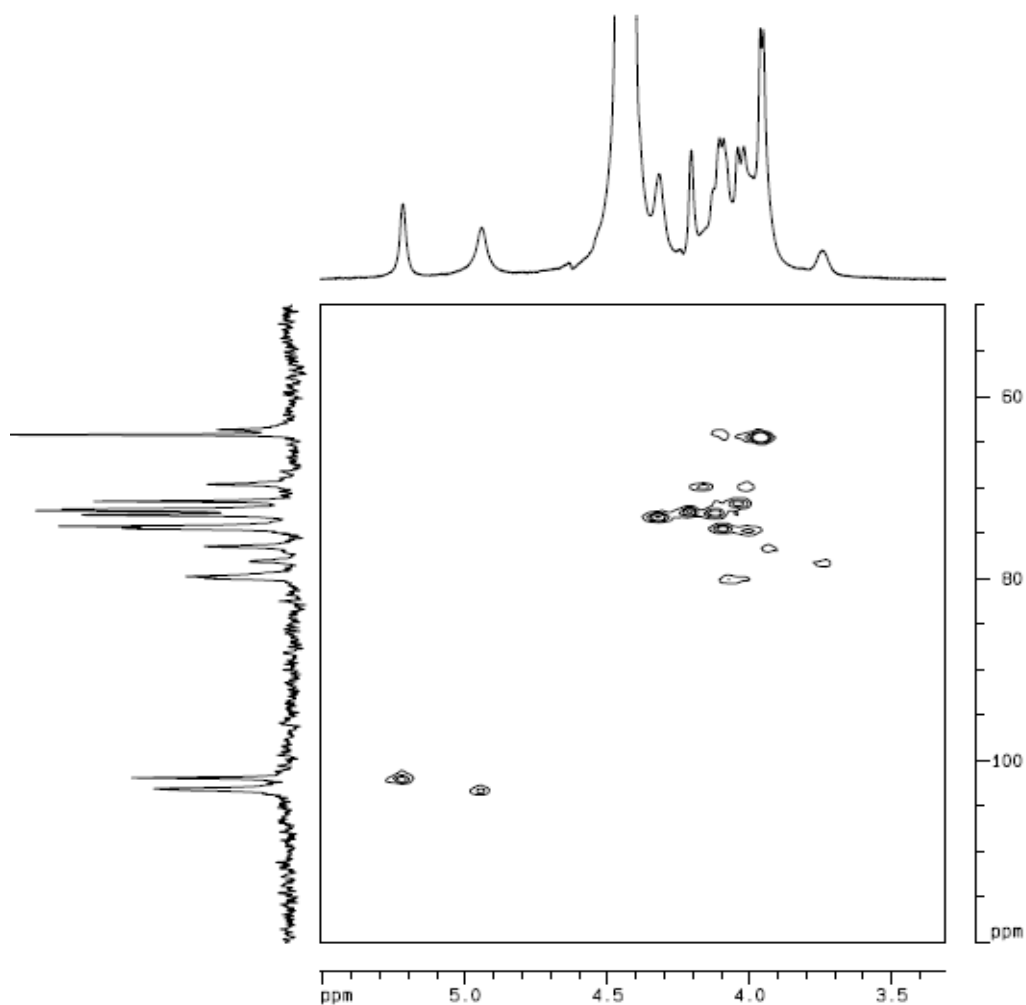


FIGURA 50 - Espectro de HMQC da goma não modificada GGFISFEH em D₂O.

Através de espectro de HMQC, correlacionou-se os hidrogênios da estrutura do polissacarídeo com cada carbono ligado diretamente a eles. A correlação tomou como base os valores de deslocamento de ¹³C da Tabela 16. Os valores destas correlações estão mostrados na Tabela 17.

TABELA 17 – Atribuições das correlações ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HMQC da guar sem modificação (GGFISFEH)

Deslocamento químico (ppm)		Atribuição
^{13}C (ppm)	^{13}H (ppm)	
103,1	4,94	C1/ H1 Manose
101,9	5,21	C1/ H1 Galactose
80,0	4,09	C4/ H4 Manose
78,2	3,74	C5/ H5 Manose livre
76,4	3,95	C5/ H5 Manose substituída
74,5	4,02	C3/ H3 Manose
74,3	4,10	C5/ H5 Galactose
73,0	4,31	C2/ H2 Manose
72,6	4,13	C4/ H4 Galactose
72,4	4,20	C2/ H2 Galactose
71,5	4,04	C3/ H3 Galactose
69,7	4,04	C6/ H6 Manose substituída
69,7	4,16	C6/ H6 Manose substituída
64,2	4,02	C6/ H6 Galactose
63,7	4,10	C6/ H6 Manose livre

O espectro de RMN de ^{13}C da goma guar oxidada (GGOXID) é mostrado na Figura 51, juntamente com o da goma sem modificação para efeito de comparação.

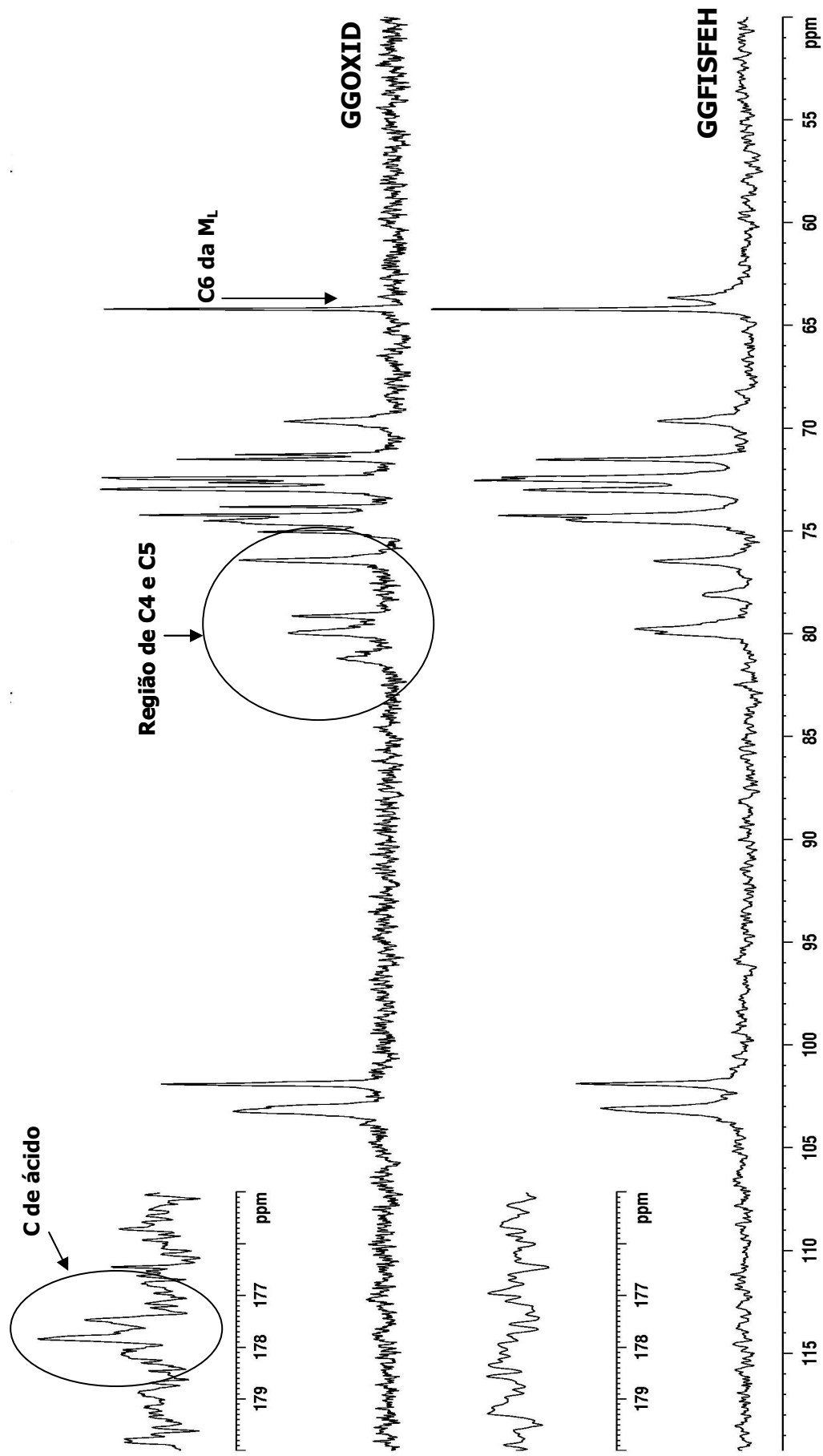


FIGURA 51 - Espectro de ^{13}C da goma não modificada GGFISFEH e da goma modificada por oxidação GGOXID em D_2O .

Comparando-se os espectros de RMN ^{13}C da goma não modificada e a goma oxidada observa-se o desaparecimento total do sinal em 63,7 ppm de C6 da manose livre (manose não ramificada com galactose), e o aparecimento de dois sinais em 177,5 e 177,8 ppm, indicando a presença do grupo $\text{C}=\text{O}$ do ácido, confirmando a modificação. O desaparecimento total do sinal de C6 da manose livre indica que esta foi totalmente substituída na reação de oxidação. Na goma guar (manose:galactose = 1,6:1), existe a possibilidade de reação modificação no C6 tanto da manose quanto da galactose [Sierakowski e col., 2000], como mostra a Figura 52.

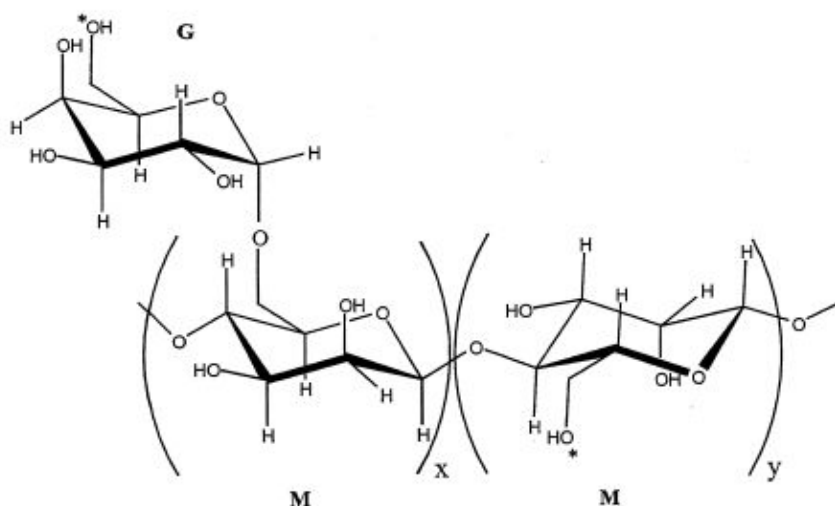


FIGURA 52 – Estrutura da guar mostrando as hidroxilas que podem ser oxidadas pelo reagente TEMPO. M= manose e G= galactose. [Sierakowski e col., 2000]

Para melhor elucidar a modificação da guar por oxidação, realizou-se o experimento de HMQC para esta amostra (Figura 53).

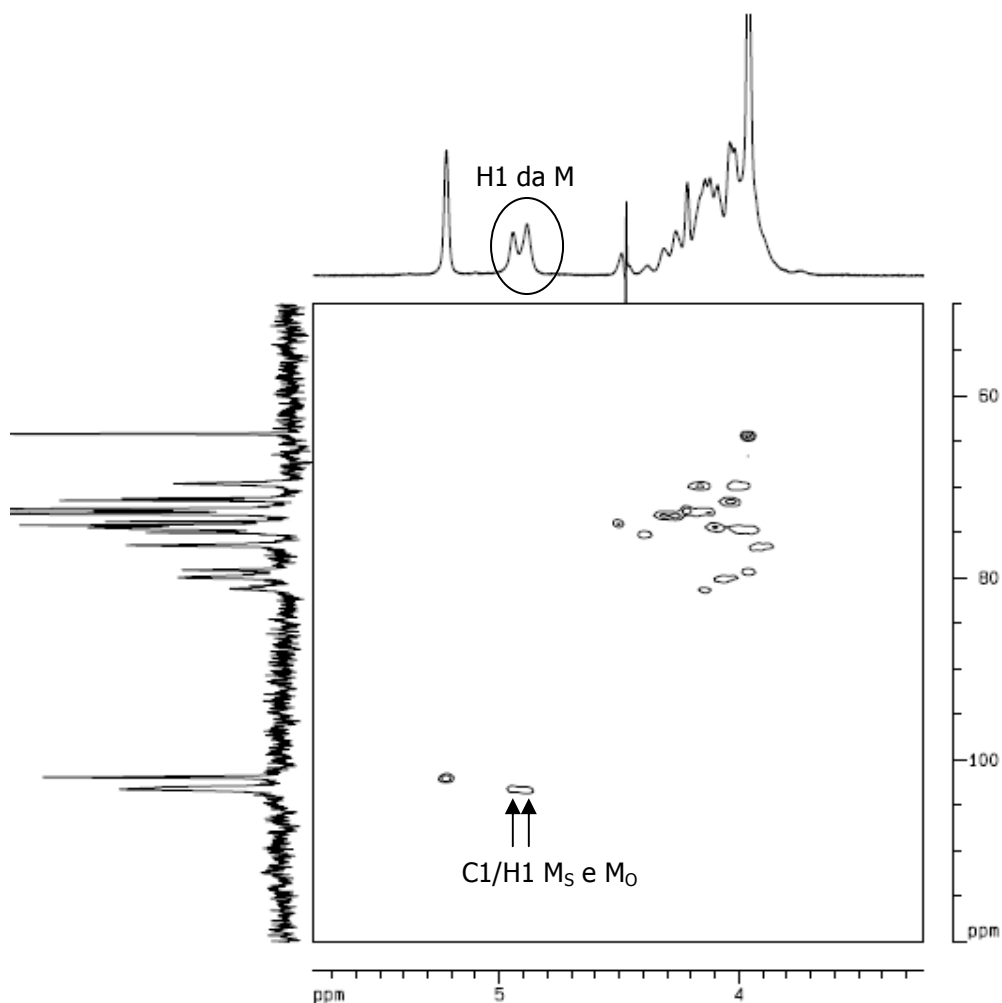


FIGURA 53 - Espectro de HMQC da goma modificada GGOXID em D₂O.

Comparando-se o espectro de HMQC da goma sem modificação (Figura 50) com o da goma oxidada, observa-se na região de carbono anomérico que o sinal devido ao C1 da manose faz correlação com dois hidrogênios, C1 Man/ H1 Man (103,1/ 4,94 ppm) e C1 Man/ H1 Man (103,1/ 4,88 ppm). O primeiro sinal C1 Man/ H1 Man (103,1/ 4,94 ppm), já está presente na GGFISFEH, mas o segundo não, indicando que na modificação por oxidação o H1 da manose sofre perturbação do novo grupo e desloca para um valor menor (-0,06 ppm). Deslocamento semelhante está relatado para o H1 da manose livre após a oxidação de galactomanana de *Leucaema leucocephala* no trabalho de Sierakowski e col. [2000].

A Figura 54 mostra o espectro de HMQC expandido sem a região de carbono anomérico da GGFISFEH e GGOXID.

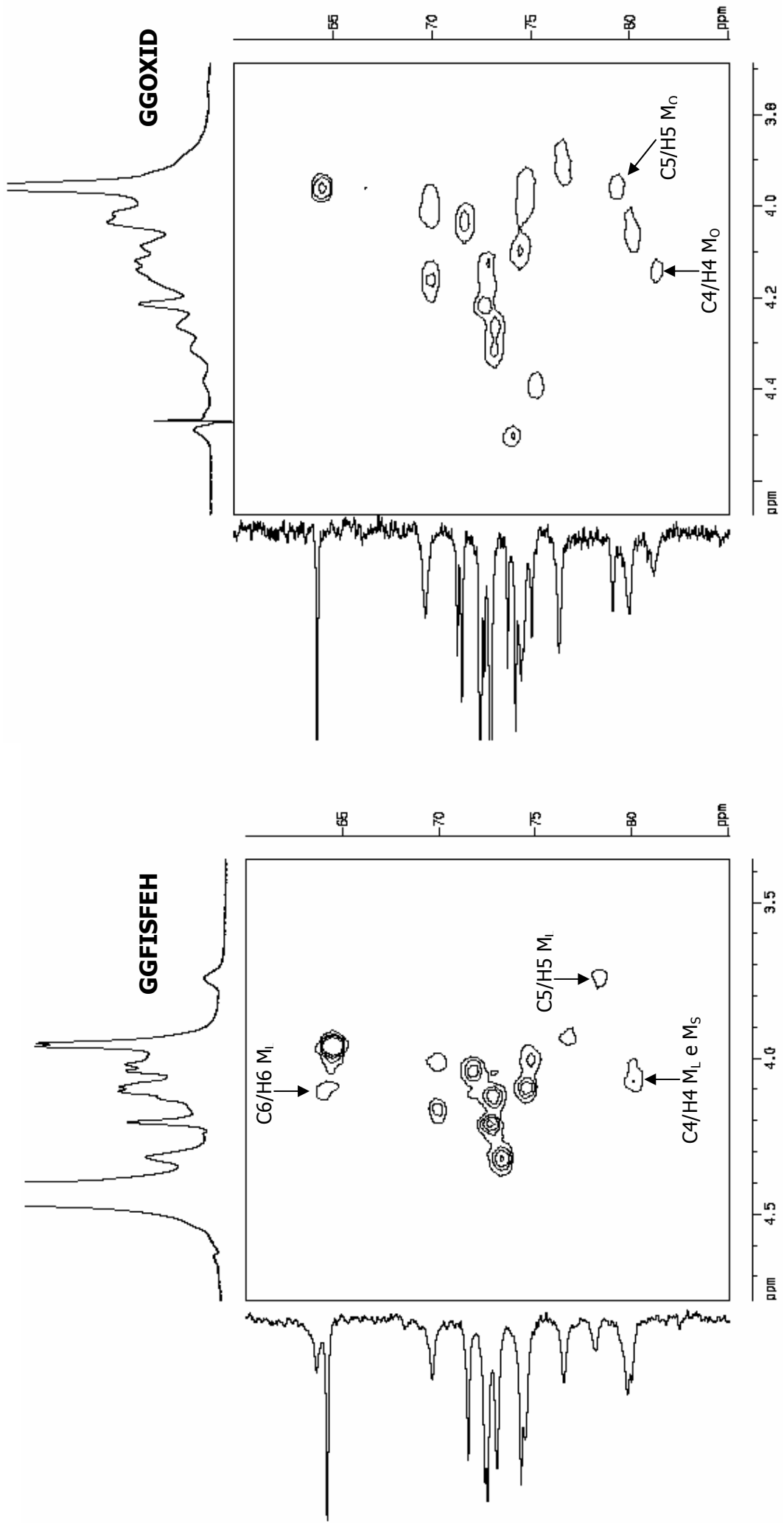


FIGURA 54 - Espectro de HMQC da GGFISFEH e da goma modificada por oxidação GGOXID em D₂O.

Comparando-se os dois espectros de HMQC, observa-se claramente o desaparecimento do sinal de C6/H6 da manose livre (63,7/4,10 ppm) e C5/H5 manose livre (78,2/3,74 ppm) e o aparecimento de dois novos sinais, um de C (79,2 ppm)/H (3,95 ppm) e outro em C (81,2 ppm)/H (4,14 ppm).

O desaparecimento do sinal em C6/H6 da manose livre (63,7/4,10 ppm) indica a sua total modificação. Com a oxidação do C6 da manose, os sinais de C5 e C4 são afetados pela nova vizinhança.

O aparecimento de um novo sinal em C (79,2 ppm)/H (3,95 ppm) em região próxima do C5 da manose livre (C-78,2/ H-3,74 ppm), pode indicar que este sinal trata-se do novo sinal de C5 da manose oxidada. Com a oxidação, os sinais de C5 e H5 seriam deslocados para valores maiores de deslocamento. O H5 do ácido manurônico tem um deslocamento químico em 3,63 ppm, já para o H5 da manose o deslocamento químico é de 3,38 ppm, uma diferença de +0,25 ppm para o manurônico [Agrawal, 1992]. Variação semelhante ocorreu para o H5 de manose da guar oxidada.

O deslocamento químico do C4 da manose ocorre em 67,7 ppm, enquanto que o do C4 do ácido manurônico aparece deslocado em +2 ppm (69,6 ppm) [Agrawal, 1992]. A correlação de C4/H4 da goma não oxidada aparece em 80,0/4,09 ppm, enquanto que o da goma oxidada aparece em 81,2/4,14 ppm, uma variação (+2,2 ppm), semelhante a observada entre o C4 da manose e do ácido manurônico. Os resultados indicam que a oxidação ocorreu majoritariamente na manose.

A modificação da guar por sulfatação foi estudada por RMN monodimensional. A Figura 55 mostra os espectros de RMN de ^{13}C da guar sulfatada (GGSULF) e da guar sem modificação (GGFISFEH).

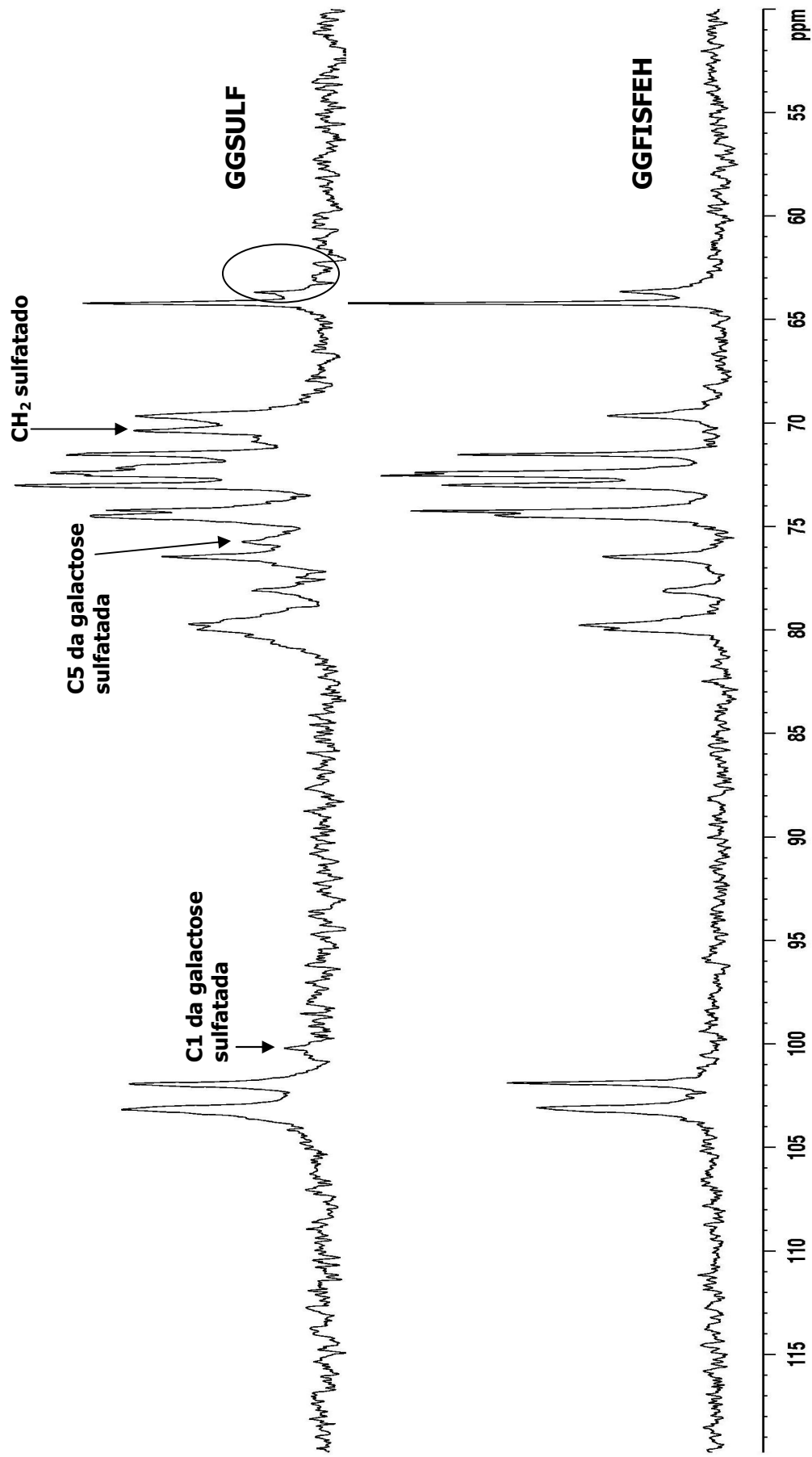


FIGURA 55 - Espectro de ^{13}C da goma não modificada GGFISFEH e da goma modificada por sulfatação GGSULF em D_2O .

Comparando-se os dois espectros percebem-se novos sinais em 70,3; 75,6 e 100,5 ppm. O primeiro sinal é devido à inserção do grupamento sulfato em carbono primário (C6), o que provoca um deslocamento do sinal de CH₂ para uma região de maior deslocamento químico (70,4 ppm). A comprovação que este novo sinal é um CH₂ substituído foi obtida analisando-se o espectro de DEPT 135 da goma sulfatada (Figura 56). Neste experimento, os sinais devido a CH₂ aparecem opostos aos grupos CH e CH₃.

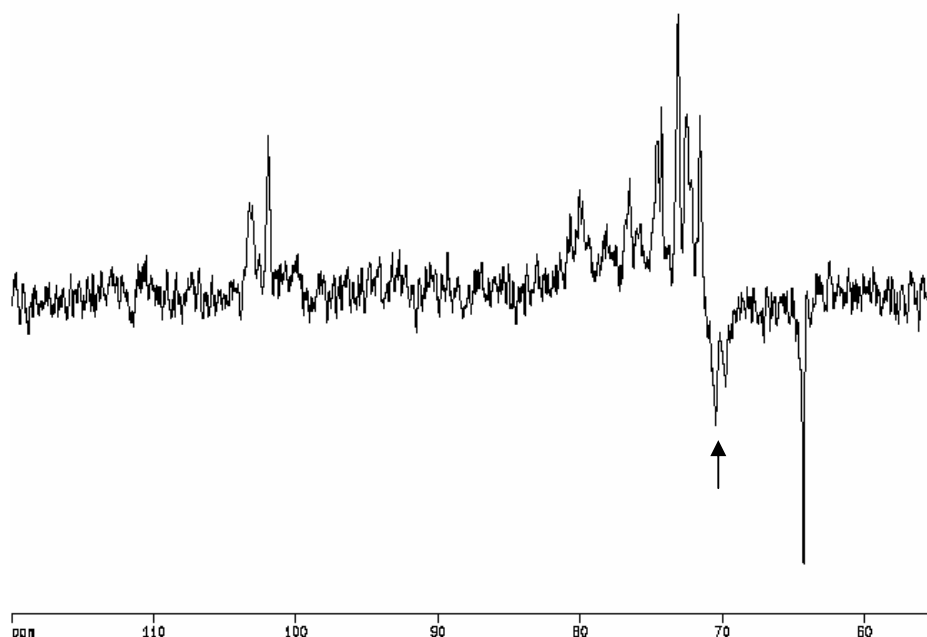


FIGURA 56 - Espectro de DEPT da goma modificada por sulfatação GGSULF em D₂O.

A permanência do sinal de C6 de manose livre após a modificação da amostra de guar é um indício de que a sulfatação não ocorre nesta posição. Alguns aspectos do espectro de RMN de ¹³C mostrado na Figura 55 apontam para a ocorrência da sulfatação preferencialmente no C6 da galactose.

Contreras e col. [1988] mostraram que após a sulfatação da metilgalactopiranosose observa-se um aumento de 2,2 ppm no C5 e uma diminuição no deslocamento do carbono anomérico. Baseado nestes dados atribuiu-se os novos sinais em 75,6 ppm (deslocado em +1,4 ppm) e 100,5 ppm (deslocado em -0,05 ppm) a C5 e C1 da galactose sulfatada.

4.4.2.4. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Para avaliar se as amostras de goma guar modificadas sofreram algum tipo de degradação, avaliou-se a massa molar por GPC. Os cromatogramas estão mostrados na Figura 57.

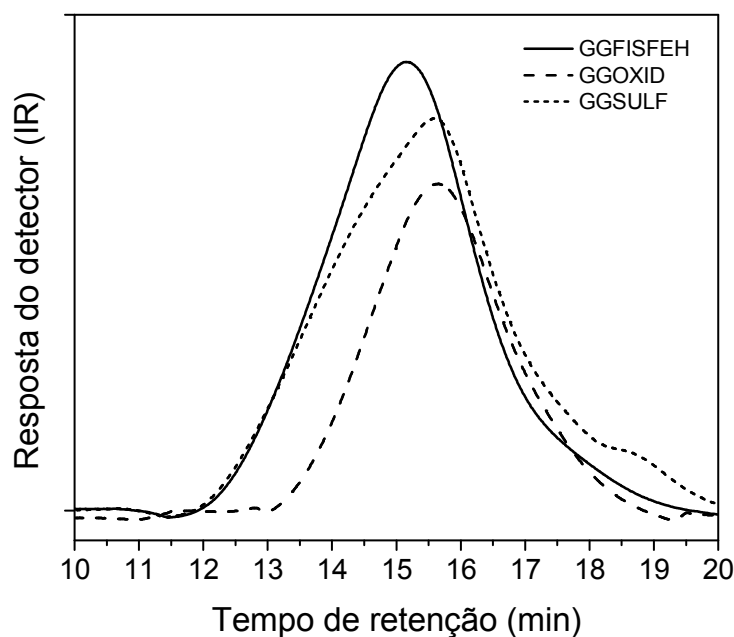


FIGURA 57 - GPC de GGFISFEH, GGOXID e GGSULF em solução salina de NaNO_3 .

Analisando o cromatograma, observa-se que as gomas modificadas apresentam um deslocamento para regiões de maiores tempos de retenção, indicando valores de massa molar menores. Com a introdução de grupos carregados, esperava-se que os cromatogramas das gomas modificadas fossem deslocados para a esquerda em relação ao da goma sem modificação (região de maior massa molar), devido ao aumento no volume hidrodinâmico resultante da introdução das cargas. Entretanto, o deslocamento mostrado para as modificadas foi para a direita, o que indica redução da massa molar. A GGSULF apresenta um ombro na sua distribuição, localizado em 14,8 minutos, outro em 18,65 minutos e um pico principal com tempo de retenção em 15,6 minutos. A goma oxidada apresenta apenas um pico principal com tempo de retenção em 15,6 minutos.

4.4.2.5. Espalhamento de luz para cálculo de massa molar ponderal média

Os valores de massa molar ponderal média (\bar{M}_w) foram calculados pelos resultados obtidos no experimento de espalhamento de luz. Os valores de \bar{M}_w para goma FISFEH e para suas modificadas foram calculadas com base no gráfico de Zimm obtidos. Os valores de massa molar ponderal média para GGFISFEH foi de $3,87 \times 10^6$ g/mol, para GGOXID foi de $2,62 \times 10^6$ g/mol e para GGSULF foi de $2,79 \times 10^6$ g/mol.

Para a GGFISFEH, a diferença de valores de massa molar ponderal média ($3,87 \times 10^6$ g/mol) e massa molar de pico obtida pelo GPC ($1,0 \times 10^6$ g/mol) se deve ao fato de que a \bar{M}_w leva mais em consideração as cadeias de massas molares maiores.

Esses resultados demonstram que ocorreu redução na massa molar para as gomas modificadas após as reações as quais foram submetidas. O valor de massa molar ponderal para GGOXID foi menor que o da GGSULF, isto pode ser devido à distribuição não homogênea de massa molar da GGSULF, já que o GPC desta goma mostra um ombro na distribuição.

4.4.2.6. Viscosidade Intrínseca

Soluções das gomas GGFISFEH não modificada, GGOXID e GGSULF foram preparadas na concentração inicial de 0,3% em solução 0,1 M de NaCl, com o auxílio de agitação magnética por mais de 24 horas. As soluções foram filtradas em funil G4. A viscosidade intrínseca foi determinada pela equação de Huggins relacionando a viscosidade reduzida com a concentração pelo gráfico da Figura 58.

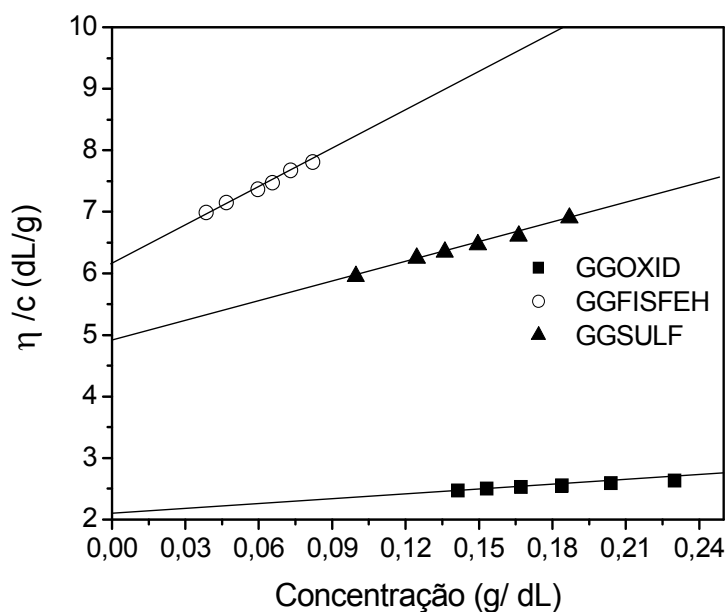


FIGURA 58 - Gráfico de η_{esp}/c versus concentração para GGFISFEH, GGOXID e GGSULF em solução de NaCl 0,1 M.

Os valores de viscosidade intrínseca foram 6,2; 2,2 e 4,9 dL/g, para GGFISFEH, GGOXID e GGSULF. Para as duas amostras de goma ocorre redução de viscosidade intrínseca, sendo maior para a goma guar modificada por oxidação, redução de 2,8 vezes. Em seu trabalho sobre oxidação de galactomananas, Sierakowski e col. [2000] obtiveram derivados que sofreram redução nos valores de viscosidade intrínseca de 1,3 vezes.

4.4.2.7. Reologia Rotacional das soluções aquosas

Soluções das gomas GGFISFEH, GGOXID e GGSULF foram preparadas na concentração de 1% em água deionizada com o auxílio de agitação magnética por mais de 24 horas e estudadas por reologia rotacional. A Figura 59 apresenta estes estudos reológicos.

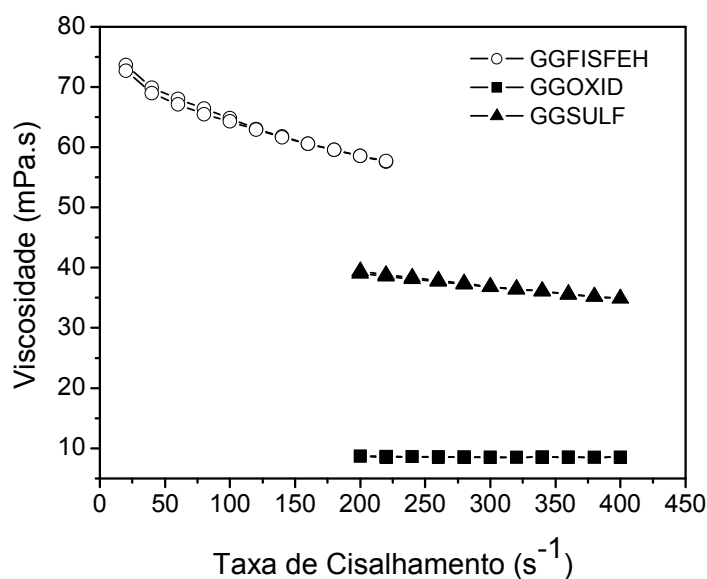


FIGURA 59 - Gráfico de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para GGFISFEH, GGOXID e GGSULF em solução aquosa 1% a 25°C.

A solução de goma não modificada e sulfatada demonstram uma certa pseudoplastia, enquanto que a solução de goma oxidada apresenta comportamento Newtoniano. Em uma taxa de cisalhamento de 200 s^{-1} , os valores de viscosidade foram de 58, 39 e 9 mPa.s para a GGFISFEH, GGSULF e GGOXID, respectivamente.

4.4.2.8. Análise Termogravimétrica

A modificação da goma guar pela introdução de grupos carregados negativamente pode resultar em um comportamento térmico diferenciado. Para verificar esta modificação, estudaram-se as gomas por análise termogravimétrica. A Figura 60 mostra as curvas termogravimétricas para GGFISFEH, GGOXID e GGSULF.

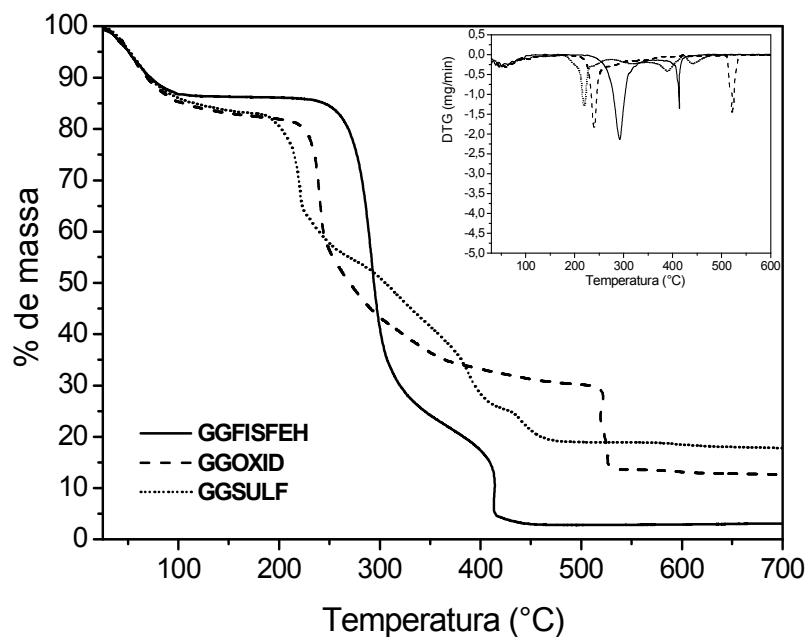


FIGURA 60 - Curvas termogravimétricas e DTG das amostras de GGFISFEH, GGOXID e GGSULF em ar sintético.

Os eventos térmicos mostrados pela análise termogravimétrica estão resumidos na Tabela 18.

TABELA 18 - Parâmetros de termogravimetria em ar sintético para GGFISFEH, GGOXID e GGSULF.

Amostra	Ti (°C)	T _{max} nos eventos (°C)				Resíduo (%)
		I	II	III	IV	
GGFISFEH não modificada	214	55	296	419	-	3,0
GGOXID	196	55	243	522	-	12,6
GGSULF	175	55	219	388	440	17,8

Todas as amostras apresentam um evento de perda de massa em 55°C, que indica a perda de umidade. A goma guar sulfatada apresenta 3 eventos de

decomposição, enquanto que a GGFISFEH não modificada e a goma oxidada apresentam dois eventos de decomposição. O resíduo das amostras de goma modificadas são consideravelmente maiores do que o da goma sem modificação. Este aumento no resíduo pode ser atribuído ao contra-íon Na^+ presente na estrutura do polissacarídeo após a reação de modificação.

As amostras de GGSULF e GGOXID foram dialisadas por 5 dias para a retirada de todo sal residual das reações. Após diálise, as amostras foram liofilizadas e analisadas por análise termogravimétrica com aquecimento até 700°C . O resíduo de GGSULF foi de 15% e para GGOXID foi de 7%. A redução dos resíduos após diálise indica que as gomas obtidas tinham sal residual proveniente da reação (2,8% para GGSULF e 5,6% para GGOXID).

As amostras modificadas apresentam diminuição na temperatura inicial de decomposição (T_i), sendo que esta redução é mais acentuada na amostra de goma sulfatada (40°C).

A termogravimetria também indica a diminuição de estabilidade térmica da goma guar depois de sofridas as modificações por sulfatação e oxidação. Diminuição da estabilidade térmica para derivado oxidado de goma do cajueiro [Cunha e col., aceito para publicação] e para derivado oxidado de galactoxiloglucana [Freitas e col., 2004] também foi observada.



4.5. Carboximetilação da Quitina



4.5. CARBOXIMETILAÇÃO DA QUITINA

4.5.1. Fatores reacionais que podem influenciar no grau de substituição

Várias condições diferentes de reação foram testadas a fim de avaliar os fatores que podem influenciar no grau de substituição e rendimento da reação de carboximetilação da quitina. A Tabela 19 traz resumidamente os fatores avaliados, grau de substituição dos derivados obtidos e o rendimento de cada uma destas reações.

O grau de substituição foi calculado através do volume de NaOH gasto na neutralização dos grupos ácidos (que foram adicionados com a reação), relacionando este volume com o número de mols de ácidos. O número de mols de ácido foi relacionado com o número de mols de unidade monomérica. O grau de substituição foi então definido como a razão entre o número de mols de grupos carboximetil e o número de mols de unidades monoméricas.

Em algumas condições avaliadas considerou-se não haver a obtenção de derivado carboximetilado, pois foram considerados apenas os derivados solúveis. O grau de substituição (GS) obtido na reação de carboximetilação é função de vários fatores, tais como: proporção de reagentes, temperatura, duração da reação e solventes utilizados. Cada um destes fatores vai ser avaliado separadamente.

O primeiro fator avaliado foi o tempo de permanência da mistura quitina/NaOH em contato com o solvente isopropanol afeta o grau de substituição (GS) e o rendimento da reação (Tabela 19, série A).

TABELA 19 – Avaliação das condições reações sobre o grau de substituição e rendimento da carboximetilação da quitina

Séries	Fator avaliado	Variação	Amostra	Obtenção do derivado	Rendimento (%)	GS
Série A	Tempo de permanência no solvente (h)	0 h	1	Não	-	-
		2 h	2	Sim	34	0,60
		3 h	3	Sim	31	0,54
		4 h	4	Sim	15	0,33
Série B	Proporção Molar AMCA:Quitina	4,6/1	1	Sim	43	0,16
		9,2/1	2	Sim	92	0,53
		13/1	3	Sim	31	0,54
Série C	Temperatura da reação (°C)	15	1	Não	-	-
		30	2	Sim	92	0,53
		50	3	Sim	57	0,50
Série D	Tempo de intumescimento no NaOH (h)	6	1	Não	-	-
		16	2	Sim	92	0,53
		24	3	Sim	14	0,64
Série E	Solvente	Isopropanol	1	Sim	92	0,53
		Água	2	Não	-	-
		Isopropanol/ água (50:50 v/v)	3	Sim	10	0,35

O tempo de permanência no isopropanol é considerado zero, quando apenas misturou-se a suspensão quitina/NaOH a este solvente e logo realizou-se a neutralização com ácido monocloroacético. Essa condição não originou um derivado solúvel. Para os demais tempos, percebe-se que aumentar o tempo de 2 para 4 horas, ocorre uma diminuição tanto no GS da carboximetilquitina como no rendimento da reação.

O papel do solvente na reação de carboximetilação é garantir acessibilidade do agente eterificante ao centro da estrutura do polímero [Barai, Singhal, Kulkarni, 1997]. Para a carboximetilação da quitina, um tempo de contato entre a suspensão quitina/NaOH com o solvente é necessário, já que em um tempo igual a zero, não houve a formação de derivado. Este tempo deve ser necessário para garantir a acessibilidade do ácido monocloroacético ao polissacarídeo.

A influência da razão molar ácido monocloroacético/quitina está mostrada na Tabela 19, série B. O aumento da quantidade de AMCA aumentou o grau de substituição dos derivados carboximetilados. No entanto mesmo quando uma grande quantidade de AMCA foi adicionada, não houve uma mudança considerável no GS. No caso das amostras 1B e 2B a quantidade de AMCA calculada foi adicionada e o restante da neutralização foi realizada com solução de HCl 2M. Para a amostra 3B a própria quantidade de AMCA adicionada foi suficiente para a neutralização.

Comparando-se a amostra 2B e 3B verifica-se que elas têm GS semelhantes. No entanto, o rendimento da reação é totalmente diferente. As condições de obtenção do derivado 2B foram mais eficientes, já que o rendimento da reação foi de 92%.

Na carboximetilação da celulose, Barai, Singhal e Kulkarni [1997] descrevem que à medida que aumenta a concentração de ácido monocloroacético, aumenta o grau de substituição, até certo valor. Após este valor, mesmo aumentando a concentração de ácido, o GS se apresenta constante.

A influência da temperatura na reação de carboximetilação (etapa da neutralização) também foi avaliada e mostrada na Tabela 16, série C. A uma temperatura de 15°C não há formação de derivado carboximetilado. O aumento da temperatura (de 30°C para 50°C) não aumenta o grau de substituição, sendo que o máximo de rendimento foi conseguido para uma temperatura de 30°C.

Para a carboximetilação da goma do cajueiro, um máximo do GS foi conseguido em uma temperatura de 30°C [Silva e col., 2004]. Neste caso, os autores testaram três temperaturas (30, 55 e 70°C). A reação de carboximetilação da inulina mostra que um aumento da temperatura de 55°C para 95°C resulta em um decréscimo do GS de 0,73–0,65 [Verrast e col., 1995].

A influência do tempo de intumescimento da quitina na solução de NaOH foi também avaliada e está mostrada na Tabela 19, série D. O intumescimento da quitina no NaOH é a primeira fase da carboximetilação da quitina. Este é o tempo em que a mistura quitina em pó/ solução de NaOH 50% é deixada no freezer a -18°C. Neste tempo espera-se que haja a formação do alcoóxido para posterior carboximetilação.

Para um tempo de 6 horas, não ocorre a formação de derivado carboximetilado. Este tempo não foi suficiente para a formação do alcoóxido. Com a temperatura muito baixa e a insolubilidade da quitina, um tempo mínimo de contato deve ser necessário. Com o aumento do tempo de intumescimento houve um aumento no GS, no entanto ocorreu uma redução muito grande do rendimento da reação.

O último fator avaliado foi a influência do solvente no grau de substituição e o rendimento de carboximetilação da quitina que está mostrada na Tabela 19, série E. Ao utilizar água como solvente da reação, não ocorreu a formação de derivado carboximetilado. Já quando foi utilizado uma parte de água e outra de isopropanol, o GS foi 0,35. Maior GS foi conseguido utilizando-se isopropanol como solvente.

Um maior GS também foi conseguido ao se utilizar álcool isopropílico como solvente da reação de carboximetilação da celulose [Barai, Singhal, Kulkarni, 1997]. Neste mesmo trabalho, utilizando-se água como solvente, o derivado de celulose carboximetilada teve um GS baixo (0,14).

A diferença no desempenho do solvente durante a carboximetilação de polissacarídeo deve estar relacionado com a polaridade do solvente, já que um aumento na polaridade do solvente diminui a eficiência da reação de carboximetilação [Barai, Singhal, Kulkarni, 1997].

As melhores condições para conduzir a reação de carboximetilação da quitina (amostra 2B=2C=1E)., considerando GS e rendimento da reação são as seguintes:

- tempo no isopropanol de 2 horas,
- proporção molar de 9,2:1 de ácido monocloroacético:quitina;
- tempo de intumescimento no NaOH de 16 horas;
- neutralização realizada à temperatura ambiente por 2 horas e
- solvente da reação, o isopropanol.

Dentre todos os derivados obtidos escolheu-se um para a caracterização, sendo este o derivado 3C, com grau de substituição de 0,51 e rendimento de reação de 57%. Este será chamado de QCMT e a análises mostradas a seguir para este derivado foi realizada com este na sua forma ácida.

4.5.2. Caracterização da Quitina e do derivado carboximetilado (QCMT)

4.5.2.1. Espectro de infravermelho

Os espectros de infravermelho da quitina e do seu derivado QCMT estão mostrados na Figura 61.

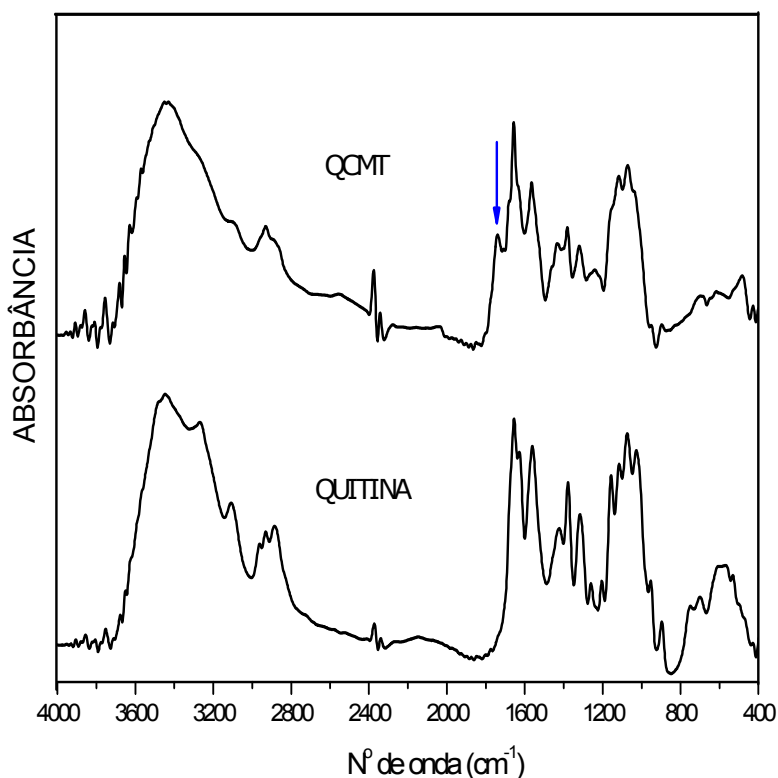


FIGURA 61 - Espectro de absorção no infravermelho da quitina e do derivado QCMT.

Freqüências relativas aos grupos O-H ($3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$), N-H (1650 cm^{-1}), aos grupos C-O de álcool (1016 cm^{-1} e 1074 cm^{-1}), e C-O-C (1159 cm^{-1}), que são características da quitina, podem ser observadas.

A diferença significativa no espectro do derivado QCMT é o aparecimento de uma banda de absorção em 1730 cm^{-1} , atribuída à vibração da ligação C-O de grupo ácido oriundo da carboximetilação.

4.5.2.2. Espectro de RMN de ^{13}C da quitina carboximetilada QCMT

A fim de melhor avaliar a modificação da quitina por carboximetilação realizou-se o espectro monodimensional de RMN de ^{13}C .

Primeiramente avaliou-se o espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{MAS}$ (Figura 62) disponível na literatura [Paulino e col., 2006] com suas atribuições.

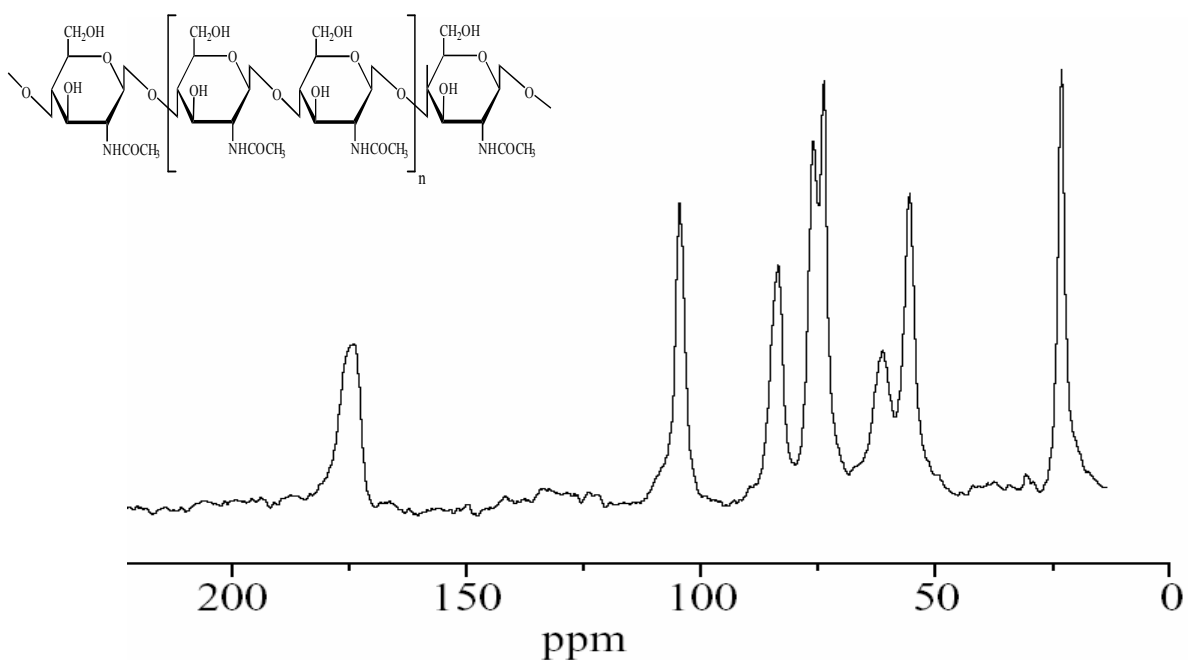


FIGURA 62 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{MAS}$ da quitina [Paulino e col., 2001].

O espectro da Figura 62 mostra a localização de cada carbono da estrutura da quitina, como: C1 (104,5 ppm), C2 (55,6 ppm), C3 (73,8 ppm), C4 (83,5 ppm), C5 (76,1 ppm), C6 (61,4 ppm), C de CH₃ do grupo acetamida (23,2 ppm) e para o C de C=O (173,5 ppm).

A Figura 63 mostra o espectro de RMN de ^{13}C para o derivado carboximetilado QCMT.

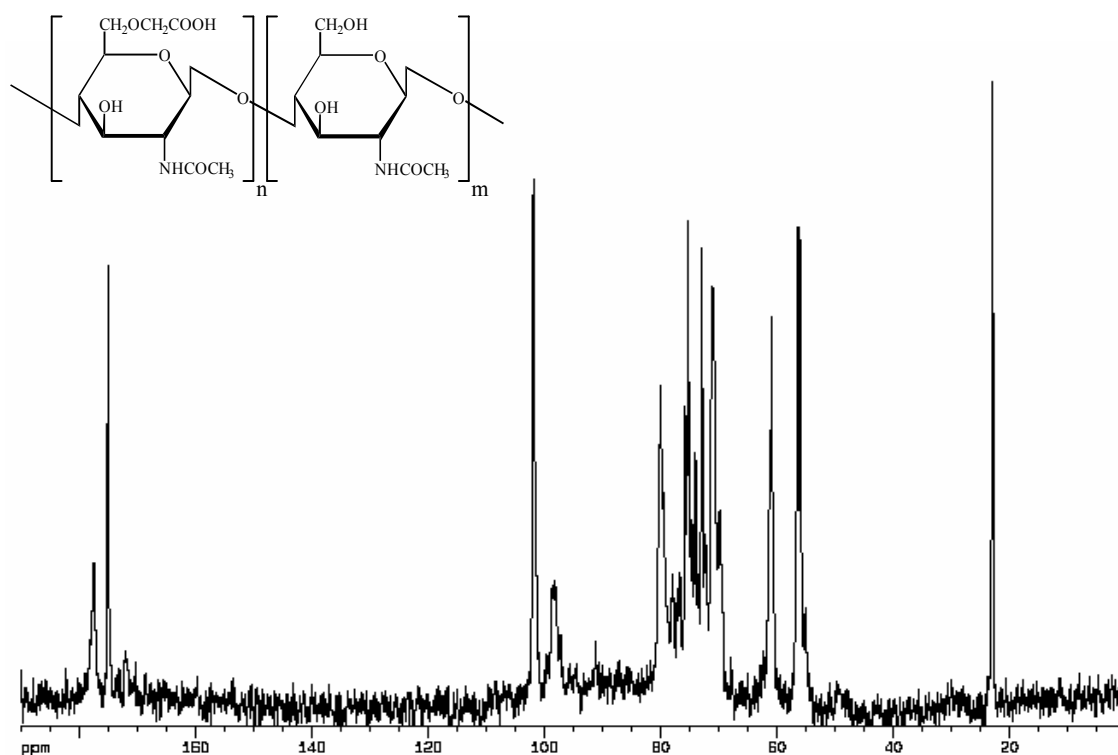


FIGURA 63 - Espectro de RMN de ^{13}C da quitina carboximetilada QCMT em D_2O .

O espectro da quitina carboximetilada mostra diferenças quando comparado ao espectro de quitina da literatura. O aparecimento de sinal em 177 ppm, vizinho ao sinal de acetoamida de maior intensidade em 175 ppm, indica a presença de carbono de grupo ácido, confirmando assim a modificação.

O sinal de C6 (60,9 ppm) está claramente mostrado no espectro da quitina. No entanto, dois novos sinais surgem na região de carbono de CH_2 , um mais intenso em 71,0 ppm e um mais discreto em 69,8 ppm. A fim de confirmar se estes sinais realmente se tratam de carbono de CH_2 um experimento DEPT 135 da quitina carboximetilada e o espectro está mostrado na Figura 64.

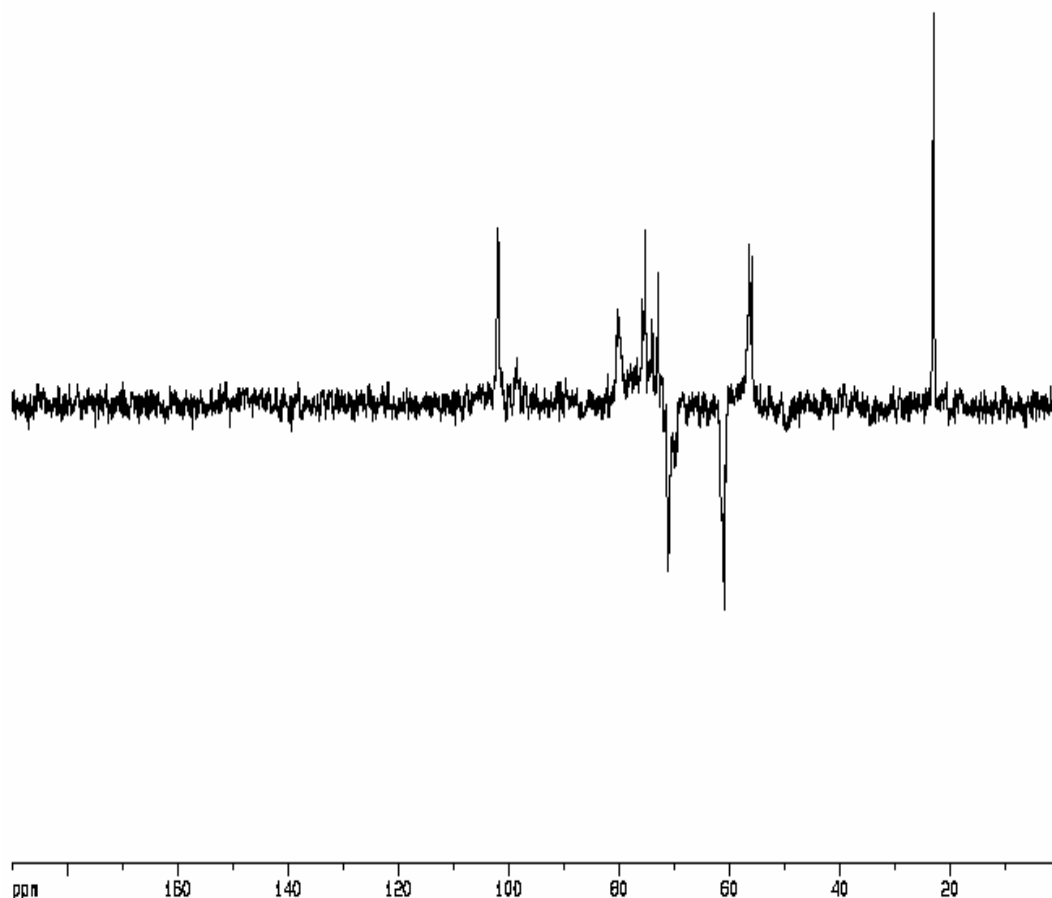


FIGURA 64 - Espectro de DEPT 135 da quitina carboximetilada QCMT em D₂O.

No espectro de DEPT 135 da QCMT pode-se observar o sinal de CH₂ em 60,9 ppm, atribuído ao C6 das unidades de quitina sem modificação (–CH₂OH). Além deste sinal observa-se um grupo de sinais de CH₂ na região de 65 a 72 ppm devido aos deslocamentos do carbono C6 do polissacarídeo substituído pelo grupo carboximetil bem como –CH₂– do grupo carboximetil adicionado à estrutura da quitina com a carboximetilação. Resultados semelhantes foram encontrados para a quitina carboximetilada por Tokura e col. [1983]

4.5.2.3. Determinação da massa molar da quitina carboximetilada (QCMT)

A massa molar ponderal (\bar{M}_w) e o raio de giro ponderal (R_g) do derivado carboximetilado foram determinado através do gráfico de Zimm mostrado na Figura 65.

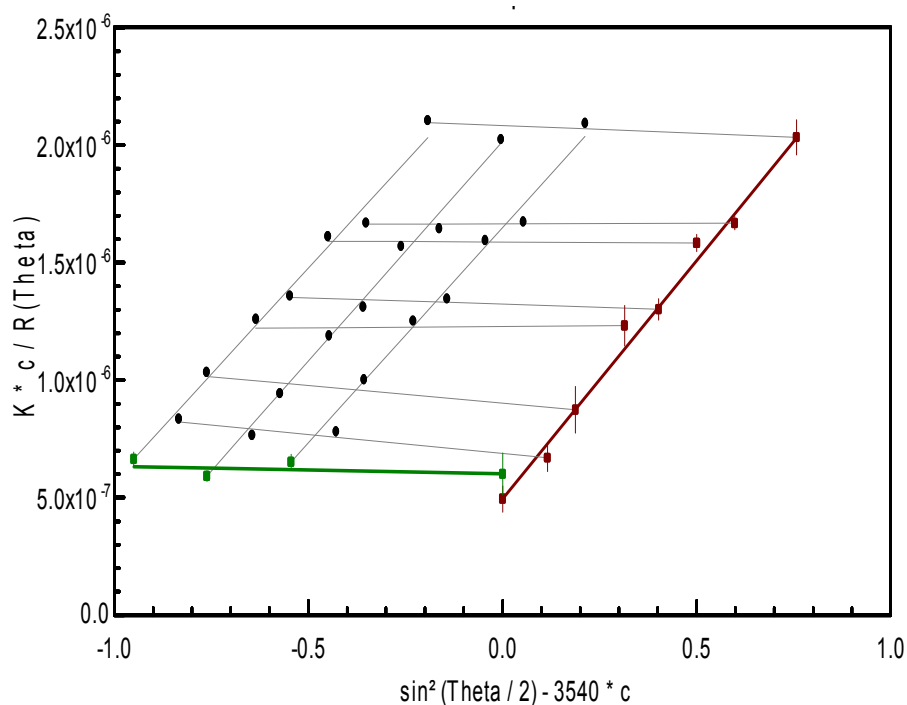


FIGURA 65 – Gráfico de Zimm da quitina carboximetilada em solução salina de NaNO_3 0,1M.

Os valores de \bar{M}_w e R_g para a quitina carboximetilada foram de $3,3 \times 10^6$ g/mol e 132 nm, respectivamente.

A massa molar ponderal encontrada para a QCMT está próximo ao valor de massa molar viscosimétrica de $3,2 \times 10^6$ g/mol encontrada para a quitina carboximetilada sintetizada por Zhao e col. [2001].

4.5.2.4. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica das amostras de quitina e QCMT em ar está mostrado na Figura 66.

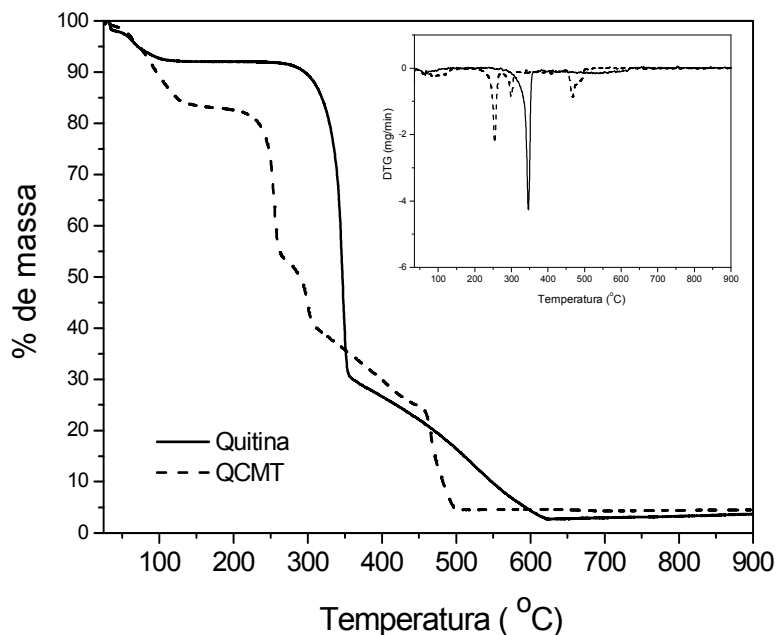


FIGURA 66 - Curvas termogravimétricas e DTG das amostras de Quitina e QCMT em ar sintético.

Os eventos térmicos mostrados pela análise termogravimétrica estão resumidos na Tabela 20.

TABELA 20– Análise termogravimétrica em ar sintético da Quitina e QCMT.

Amostra	T_i (°C)	T_{max} nos eventos (°C)				%resíduo (900°C)
		I	II	III	IV	
Quitina	268	66	347	-	-	4,0
QCMT	206	67	253	300	467	4,0

Tanto a amostra de quitina como o seu derivado carboximetilado apresentam um evento de perda de massa em 66°C, que indica a perda de umidade. A QCMT apresenta 3 eventos de decomposição, enquanto que a quitina apresenta apenas um evento de decomposição. Os resíduos das amostras são iguais.

O derivado carboximetilado apresenta uma grande redução de sua temperatura inicial de decomposição (T_i) quando comparado à da quitina, sendo

esta redução de 60°C. Este derivado apresenta também um primeiro evento de decomposição em temperatura bastante inferior a temperatura observada para este mesmo evento na quitina.

A termogravimetria indica a diminuição de estabilidade térmica da quitina depois de carboximetilada. A redução de estabilidade térmica foi avaliada pela diminuição no valor da temperatura inicial de decomposição (redução de 60°C). Essa diminuição de estabilidade térmica pela introdução de cargas na estrutura do polissacarídeo ocorreu também com a goma guar, como foi anteriormente mostrada. De acordo com Villetti e col. [2002], em geral, a introdução de grupos carregados diminui a estabilidade térmica de polissacarídeos neutros.



4.6. Testes Farmacológicos



4.6. TESTES FARMACOLÓGICOS

4.6.1. Efeito de preparações de goma guar em cavidades articulares de ratos

Primeiramente investigou-se o efeito da administração *per se* de soluções da goma guar não purificada e purificada pelo método físico+Fehling (GGFISFEH) na cavidade articular de ratos Wistar. O efeito da administração foi avaliado pela incapacitação articular medido pelo tempo de suspensão da pata (TSP) e pelo influxo celular. A incapacitação articular foi determinada pelo valor máximo entre a 3^a e 4^a horas.

A Figura 67 mostra o efeito da administração de soluções de goma guar não purificada (GGNP) e purificada (GGFISFEH) no tempo de suspensão da pata.

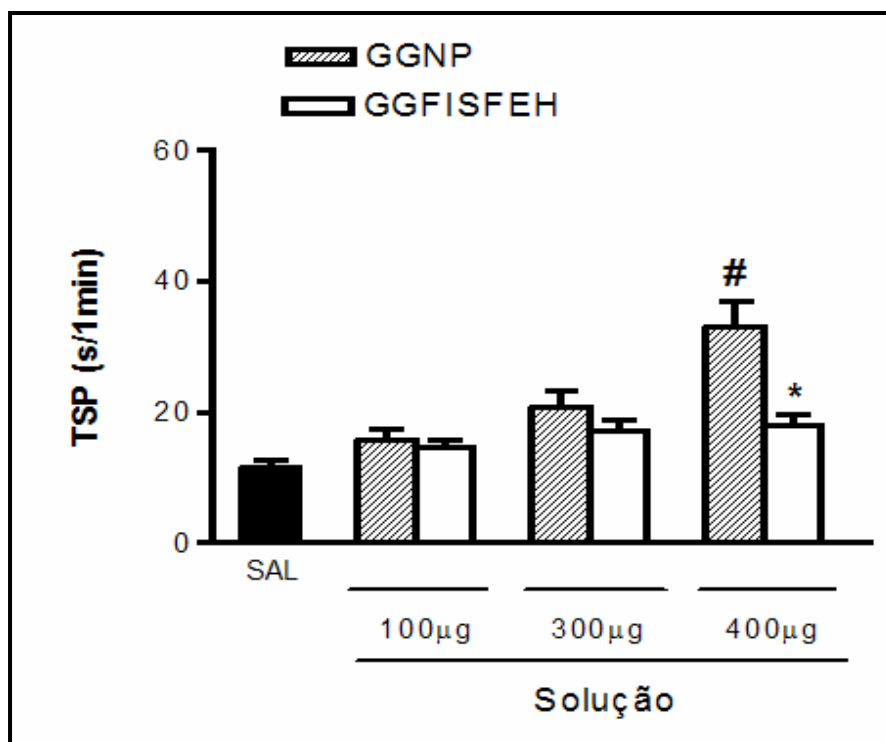


FIGURA 67 - Efeito da administração intra-articular de soluções de GG sobre a incapacitação articular em joelhos de ratos. [#]p<0,001 em relação a salina; ^{*}p<0,01; ^{**}p<0,001 em relação a GGNP, na mesma dose.

A administração de soluções de GGNP provocou incapacitação articular dose-dependente, máxima entre a terceira e quarta hora. Entretanto, soluções de goma guar purificada (GGFISFEH) não provocaram incapacitação articular quando comparadas à de animais controle (animais que se receberam apenas solução salina intra-articular). Valores de TSP para soluções de GGNP diferem significativamente ($p < 0,01$) daqueles obtidos pela solução de GGFISFEH para a dose de 400 μg intra-articular.

A Figura 68 mostra o efeito da administração de soluções de goma guar não purificada (GGNP) e purificada (GGFISFEH) no influxo celular. A contagem total de leucócitos no exsudato articular foi realizada 6 horas após administração intra-articular.

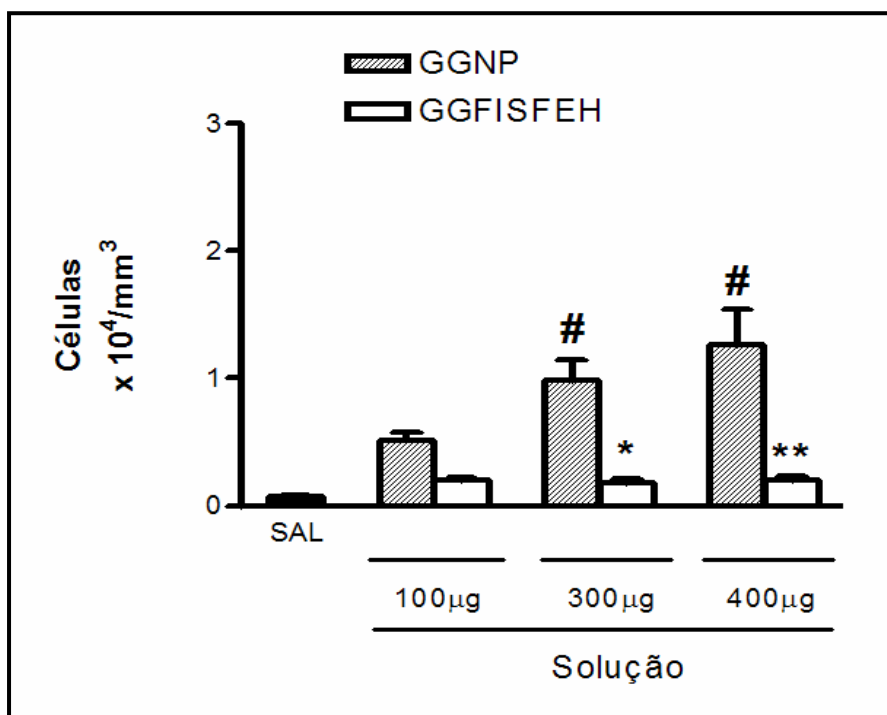


FIGURA 68 - Efeito da administração intra-articular de soluções de GG sobre a celularidade em joelhos de ratos. # $p < 0,001$ em relação a salina; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ em relação a GGNP, na mesma dose.

De maneira similar, a administração intra-articular de soluções de goma guar não purificada (GGNP) provocou influxo celular dose-dependente, um efeito não apresentado por soluções de goma guar purificada (GGFISFEH).

Investigou-se também o efeito da administração *per se* dos géis de goma guar não purificada (GelGGNP) e purificada pelo método físico+Fehling (GelGGFISFEH) na cavidade articular de ratos Wistar. O efeito desta administração foi avaliado pela incapacitação articular medido pelo tempo de suspensão da pata (TSP) e pelo influxo celular. A incapacitação articular foi determinada pelo valor máximo entre a 3ª e 4ª horas.

A Figura 69 mostra o efeito da administração de soluções de goma guar não purificada (GGNP) e purificada (GGFISFEH) e dos géis GelGGNP e GelGGFISFEH no tempo de suspensão da pata.

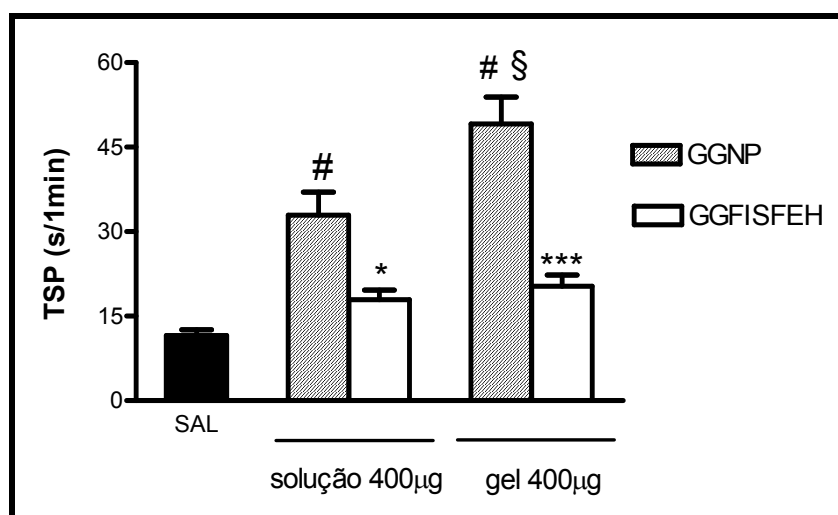


FIGURA 69 - Efeito da administração intra-articular de preparações (solução e gel) de GG sobre a incapacitação articular em joelhos de ratos. # $p < 0,001$ em relação a salina; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ em relação a GGNP, na mesma dose; § $p < 0,001$ em relação a GGNP 400µg em solução.

A incapacitação articular foi maior em animais que receberam goma guar não purificada na forma de gel (GelGGNP), os quais apresentaram valores de TSP significativamente superiores ($p < 0,001$) aos apresentados pela goma guar

não purificada na forma de solução (GGNP) (GelGGNP: $49,13 \pm 4,72s$ e GGNP: $32,95 \pm 4,05s$).

A Figura 70 mostra o efeito da administração de soluções de goma guar não purificada (GGNP) e purificada (GGFISFEH) e dos géis GelGGNP e GelGGFISFEH no influxo celular. A contagem total de leucócitos no exsudato articular foi realizada 6 horas após administração intra-articular.

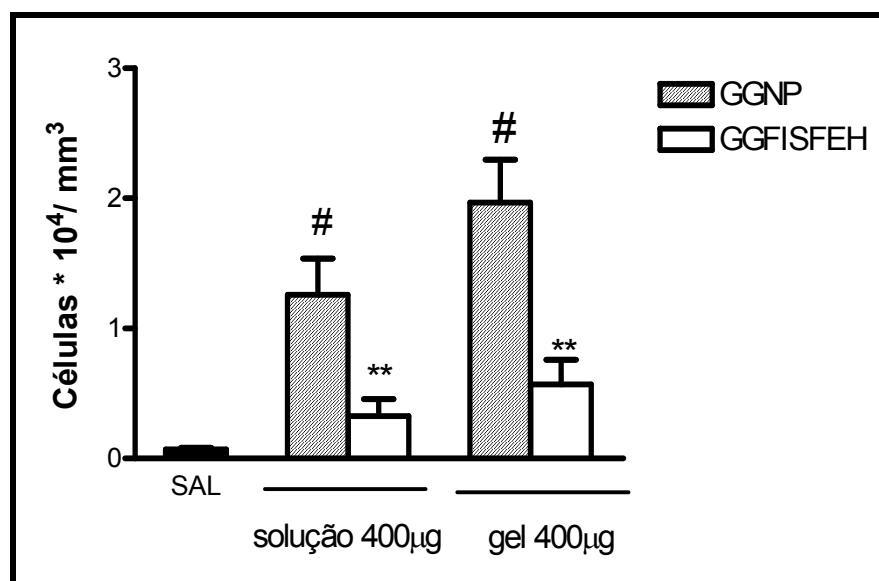


FIGURA 70 - Efeito da administração intra-articular de preparações de GG sobre a celularidade em joelhos de ratos. # $p < 0,001$ em relação a salina; ** $p < 0,001$ em relação a GGNP, na mesma dose.

O influxo celular foi maior em cavidades articulares que receberam goma guar não purificada na forma de gel (GGNP: $1,969 \pm 0,331 \times 10^4$ células/mm³) do que a goma não purificada em solução.

A inocuidade da goma guar em cavidade articular de ratos é dependente de sua pureza, ou seja, da isenção de contaminantes, em especial, protéicos (Figuras 67-70). A goma guar não purificada produz incapacitação articular e influxo celular de maneira dose-dependente. Para a GG não purificada, a forma reticulada (gel) tende a produzir efeitos inflamatórios mais intensos. A retirada de contaminantes, pela associação de um método físico com o de Fehling,

previne esses fenômenos. Para o tratamento intra-articular na osteoartrite (item 4.6.2), utilizou-se a guar purificada por esses métodos (GGFISFEH).

4.6.2. Efeito da administração intra-articular terapêutica de goma guar (gel e solução) e do Hilano G-F 20 sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior

Na prática clínica, o Hilano G-F 20 é utilizado como administrações semanais, em pacientes portadores de osteoartrite, principalmente de joelhos, que apresentem mínimo ou nenhum derrame articular. No presente estudo, administrou-se diariamente o gel de goma guar purificada (GGFISFEH), a partir do 4º dia após a transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Nessa estratégia, ocorreu aumento da incapacitação articular, quando comparada à de animais do grupo OA não tratados. Considerando que as injeções diárias a partir de 3 dias de indução do modelo de OA, por trauma local ou por aumento de pressão intra-articular, pudessem estar promovendo esse incremento na incapacitação articular, decidiu-se fazer uma administração única da goma guar e observar o efeito nos dias subsequentes.

A Figura 71 mostra a redução da dor articular obtida pela administração ao 4º dia após a TLCA de goma guar purificada pelos métodos físico seguido de Fehling (GGFISFEH), em gel ou solução, assim como de Hilano G-F 20, na dose de 100 µg intra-articular. Enquanto que o efeito de GGFISFEH em solução e Hilano G-F 20 foram observados a partir do quarto dia, o efeito do GelGGFISFEH foi a partir do quinto dia.

Na Figura 71, o grupo OA foi submetido à transecção do LCA e o grupo falso-operado (SHAM) foi submetido à artrotomia (operação cirúrgica para a abertura de uma articulação), sem transecção do LCA.

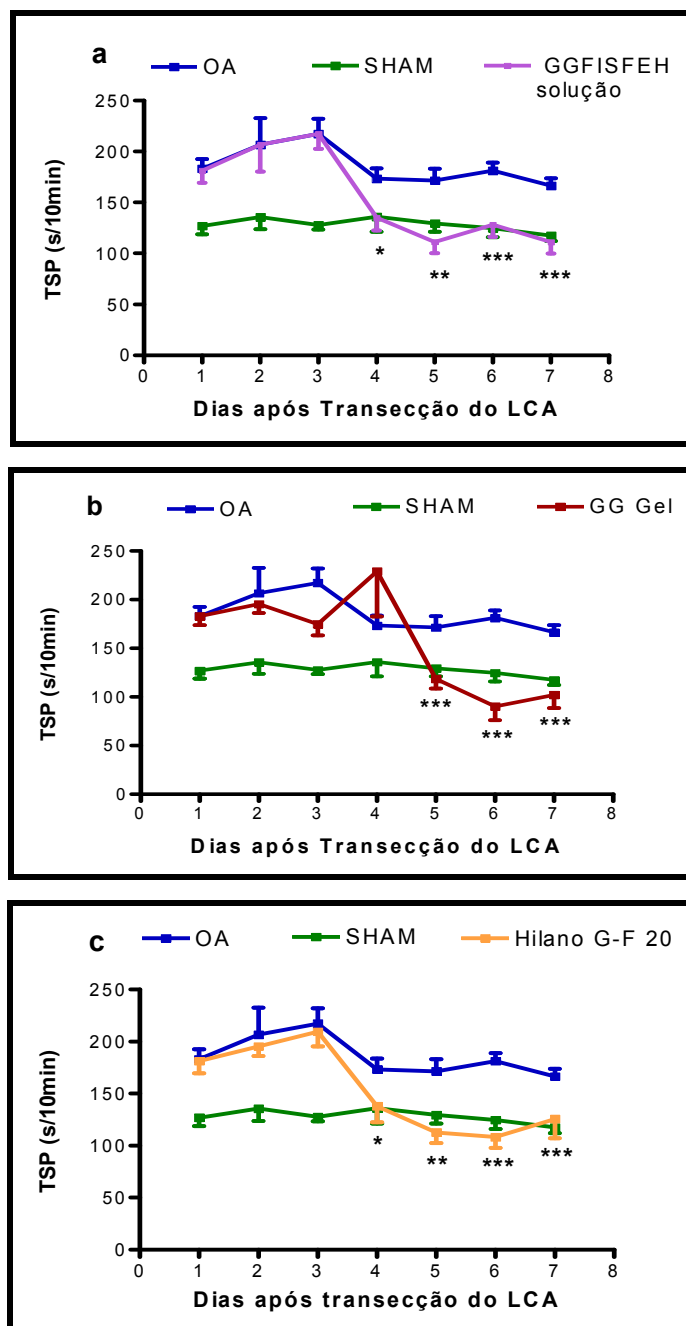


FIGURA 71 - Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução (a) ou reticulada (gel) (b) e Hilano G-F 20 (c) em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA) - curso temporal. * $p < 0,05$; * $p < 0,01$; * $p < 0,001$ em relação a OA; # $p < 0,001$ em relação a SHAM.**

A partir da curva temporal para cada grupo experimental, procedeu-se ao cálculo da área sob a curva (AUC), no intervalo compreendido entre o 4º e o 7º dia após a cirurgia articular. A goma guar em gel (GelGGFISFEH) ou solução

(GGFISFEH) e Hilano G-F 20 reduziram em 34,2%, 32,3%, e 34,2%, respectivamente, a área sob a curva (AUC) para grupo submetido à transecção do LCA (OA) (Figura 72).

Na Figura 72, o grupo falso-operado (SHAM) foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Grupo NT recebeu salina i.a. A incapacitação articular foi avaliada diariamente pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP) em segundos, até sete dias após a transecção do LCA.

Interessante salientar que a inibição da incapacitação articular obtida pelo gel ou pela solução de goma guar foram absolutamente semelhantes ao resultado obtido com o Hilano G-F 20.

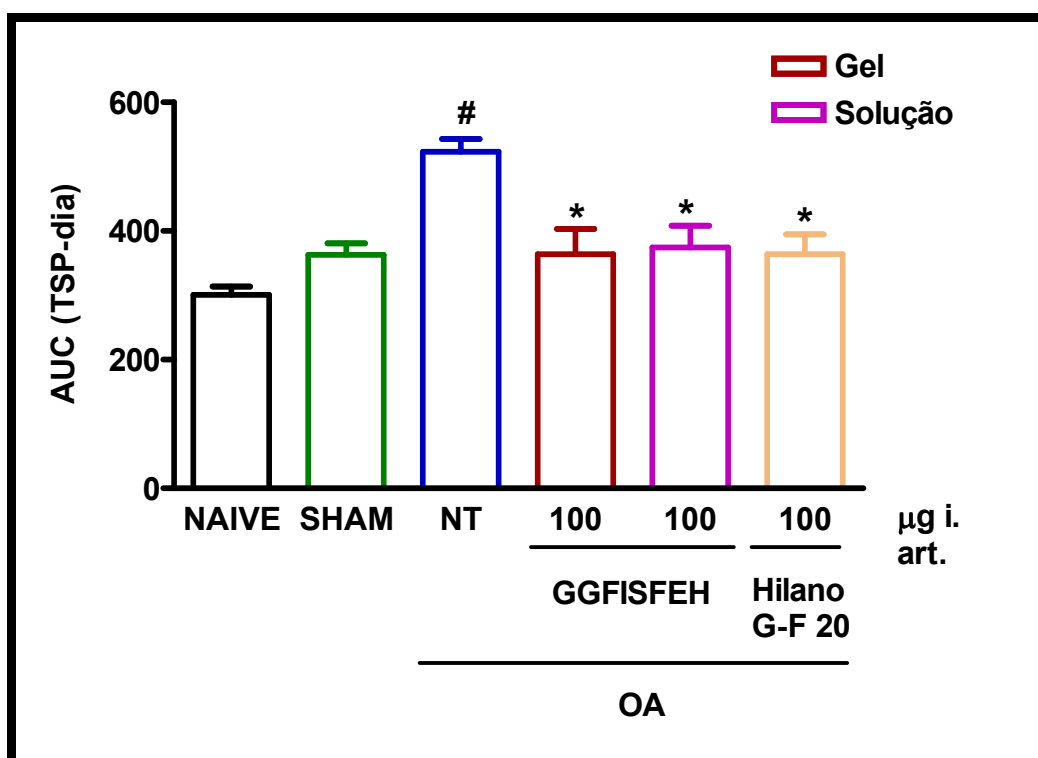


FIGURA 72 - Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução ou reticulada (gel) e Hilano G-F 20 sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção fazem Ligamento Cruzado Anterior (LCA). * $p < 0,001$ em relação a NT; # $p < 0,001$ em relação a SHAM.

Observou-se que animais OA tratados terapêuticamente com Hilano G-F 20 intra-articular apresentaram redução significativa no TSP, imediatamente após a administração, alcançado valores semelhantes aos encontrados para animais falso-operado (SHAM). É importante ressaltar que a analgesia pode ser obtida por 72 horas após uma única administração.

Embora o efeito analgésico das preparações de ácido hialurônico tenha sido relatado em estudos clínicos com humanos, pouco é conhecido acerca de seu mecanismo de ação. Segundo a hipótese da viscosuplementação [Balazs e Denlinger, 1993], o restabelecimento da viscoelasticidade do fluido sinovial reduziria o atrito entre as estruturas articulares durante o movimento. Uma vez que o atrito excessivo seria prejudicial à integridade da articulação, provocando a degeneração articular acompanhada de sintomas como dor e disfunção, a viscosuplementação, por reduzir tal atrito, contribuiria para a diminuição dos sintomas de OA. Diante dessa hipótese, é coerente esperar uma redução da incapacitação articular imediatamente após a administração de Hilano G-F 20. Entretanto, os resultados de analgesia persistente não são convenientemente explicados pela hipótese da viscosuplementação. Embora o *clearance* de ácido hialurônico em articulações de ratos não tenha sido ainda determinado, dados a partir de coelhos sugerem uma meia vida inferior a vinte e quatro horas para juntas saudáveis [Lindenhayn e col., 1997], podendo, porém, ser abreviada na OA face à vasodilatação e ao aumento de permeabilidade vascular que ocorrem em artrites.

Observou-se que a solução de guar GGFISFEH promoveu, semelhantemente ao Hilano G-F 20, redução da incapacitação articular avaliada imediatamente após a administração. O efeito prolongado da guar em solução foi observado por 72 horas após a administração. Para o GelGGFISFEH observou-se a redução da incapacitação articular entre 24 e 72 horas após a administração.

À semelhança com o discutido para o Hilano G-F 20, os resultados obtidos não são coerentemente explicados pela hipótese da viscosuplementação de Balazs e Denlinger (1993), já que a viscosidade determinada para soluções de goma guar GGFISFEH está em ordem de grandeza inferior àquela determinada

para seu gel (GelGGFISFEH) ou Hilano G-F 20 e também o GelGGFISFEH tem viscoelasticidade inferior à do Hilano G-F 20.

O registro do elevado *clearance* do ácido hialurônico em joelhos de coelhos osteoartríticos [Lindenhayn e col., 1997] pode ser inferido para joelhos de ratos, permitindo supor que a permanência da GG nas cavidades seja abreviada suficientemente para promover analgesia por lubrificação das estruturas articulares. A analgesia promovida pela GG em gel manifestou-se tardiamente, fato também incoerente para a hipótese de um elevado *clearance* dos polissacarídeos na articulação de ratos.

Há um relato na literatura de atividade analgésica para mananas. Foi demonstrada a redução da hiperalgesia térmica em ratos por uma D-manana O-acetilada extraída do corpo de frutificação do fungo *Dictophora indusiata* [Ukai e col., 1983]. Entretanto, os resultados de analgesia promovida por galactomananas como a goma guar é, ao nosso conhecimento, a primeira demonstração de efeito analgésico para esse polissacarídeo.

O mecanismo de ação da analgesia promovida pela GG em ratos submetidos à transecção do LCA é, possivelmente, farmacológico. A determinação desse mecanismo de ação demanda uma criteriosa investigação, a qual será objetivo de continuidade deste trabalho.

A partir dos resultados obtidos com a incapacitação articular, pode-se sugerir que preparações de GG parecem ser promissores substitutos para o ácido hialurônico na terapia da OA. Para conclusão dessa proposição, o efeito de polissacarídeos de GG sobre a lesão da cartilagem necessita ser avaliado.

4.6.3. Efeito da administração intra-articular terapêutica de goma guar sem modificação (GGFISFEH) e modificadas (GGOXID e GGSULF) sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior.

Investigou-se, também, o efeito da administração intra-articular de soluções da goma guar (GGFISFEH) e desta goma modificada pelas reações de

oxidação (GGOXID) e sulfatação (GGSULF) no tratamento terapêutico de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos Wistar.

O efeito da administração intra-articular de 100ug de goma guar sem modificação (GGFISFEH), sulfatada (GGSU) ou carboxilada (GGOX) no quarto dia após TLCA foi avaliado pela incapacitação articular medido pelo tempo de suspensão da pata (TSP) (Figura 73). Grupo com osteoartrite não-tratado (NT) recebeu veículo (salina i. art.). Os dados são expressos como a área (AUC) sob o TSP *versus* tempo após cirurgia articular, entre o quarto e o sétimo dias.

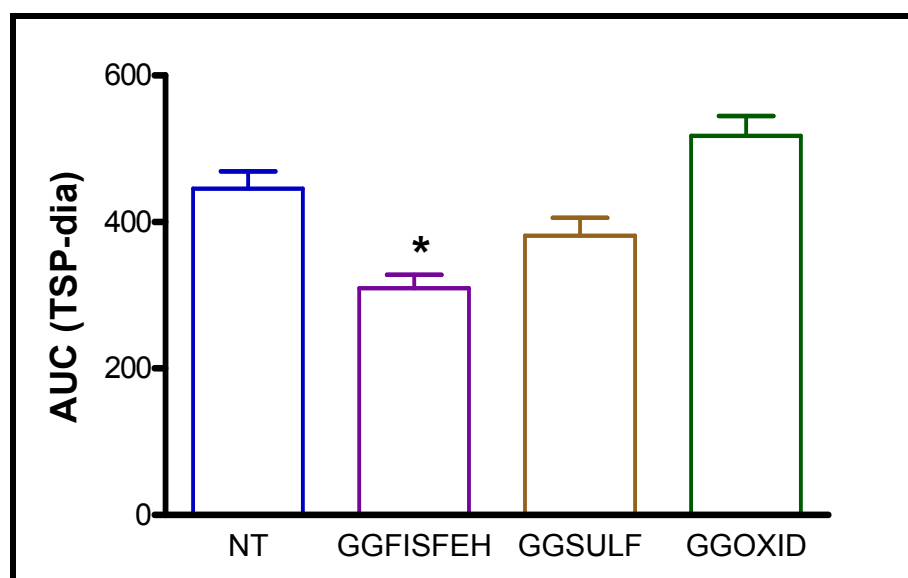


FIGURA 73 - Efeito terapêutico local de preparações quimicamente modificadas de goma guar sobre a dor articular, na fase inicial da OA por TLCA em ratos. * $p < 0,01$ vs NT.

Neste teste avaliou-se o impacto de alterações estruturais, que confeririam cargas negativas à estrutura da goma guar sobre a atividade analgésica na osteoartrite por TLCA em ratos.

Foi demonstrado anteriormente que o polissacarídeo de goma guar exercia atividade analgésica independente da viscosidade da preparação.

Observa-se que com a modificação (Figura 73), a GGFISFEH perde sua

atividade analgésica (Figura 73), fortalecendo a hipótese de que a ligação da goma guar eletricamente neutra a um possível receptor, seja o responsável pela a atividade analgésica deste polissacarídeo.



5. Conclusões



5. CONCLUSÕES

- O método mais eficiente na remoção de proteínas da amostra comercial de goma guar foi o método conjunto físico+Fehling, apresentando uma total remoção de proteínas e uma redução no teor de monossacarídeos contaminantes.
- O método de reticulação da goma guar apresentou eficiência para a obtenção de um gel fluido deste polissacarídeo, que pode ter sua viscosidade controlada durante sua obtenção, pela interrupção da reação por colocação do sistema em diálise.
- O método de oxidação e sulfatação utilizados para goma guar foram eficientes para a introdução de grupos carboxílico e sulfato, respectivamente.
- O método de carboximetilação da quitina apresentou eficiência na modificação da estrutura deste polissacarídeo, sendo que tanto o grau de substituição, quanto rendimento da reação, pode ser manipulado, variando-se alguns parâmetros nas condições de reação de carboximetilação.
- A presença de contaminantes agregados à estrutura da goma guar, em especial proteínas, resulta em inflamação das articulações e dor quando administrada nas articulações de ratos Wistar.
- Com a purificação por físico+Fehling, a goma guar administrada em solução na articulação de ratos Wistar não causa nem inflamação e nem dores significativas.
- A goma purificada por físico/Fehling, tanto em solução, quanto no estado reticulado, tem potencial para ser utilizada no tratamento da osteoartrite, já que estes materiais apresentaram analgesia (diminuição da dor) em ratos Wistar acometidos de osteoartrite semelhante ao que apresentou o Hilano G-20.

- A viscosidade não deve ser a única responsável pela redução da dor em tratamento de osteoartrite por viscosuplementação, já que GGFISFEH tanto em gel como em solução tiveram efeito de analgesia semelhante.
- A goma guar carboxilada (GGOXID) e a goma guar sulfatada (GGSULF) não reduziram a dor em modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos Wistar, indicando que a introdução de grupos carregados na estrutura da guar não melhorou sua ação terapêutica, pelo contrário, anulou a ação da galactomanana neutra.
- Foi desenvolvido um polissacarídeo com base na goma guar, com ação terapêutica em osteoartrite induzida por TLCA.
- O efeito do agente viscosuplementador não está relacionado com a viscosidade deste.



6. Referências Bibliográficas



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P.; Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry*, 1992, **10**: 3307.

AHUJA, M.; RAÍ, A. K.; Adsorption studies with some chelating ion exchange resins derived from guaran, *Carbohydrate Polymers*, 1997, **33**: 57.

ALBAN, S.; FRANZ, G.; Characterization of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate. *Thrombosis Research*, 2000, **99**: 377.

ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G.; Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure–activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymers*, 2002, **47**: 267.

ANDRADE, C. T.; AZERO, E.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M. P.; Solution properties of the galactomannas extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, **26**: 181.

APPUKUTTAN, P. S.; SUROLIA, A.; BACHHAWAT, B. K.; Isolation of 2 galactose-binding proteins from *ricinus-communis* by affinity chromatography, *Indian Journal Biochemistry and Biophysics*, 1977, **14**: 382.

AZERO, E.; ANDRADE, C.; Testing procedures for galactomannan purification, *Polymer Testing*, 2002, **21**:551.

BALAZS, E.; DENLINGER, J.; Viscosupplementation - a new concept in the treatment of osteoarthritis, *Journal of Rheumatology*, 1993, **20** (suppl 39):3.

BANK, R.A.; SOUNDRY, M.; MAROUDAS, A.; MIZRAHI, J.; TEKOPPELE, J.M.; The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic

cartilage is highly correlated with collagen degradation. *Arthritis and Rheumatism*, 2000, **43**: 2202.

BARAI, B.; SINGHAL, R.; KULKARNI, P.; Optimization of a process for preparing carboxymethyl cellulose from water hyacinth (*Eichornia crassipes*), *Carbohydrate Polymers*, 1997, **32**: 229

BARBUCCI, R.; LAMPONI, S.; MAGNANI, A.; RENIER, D.; The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. *Biomaterials*, 1998, **19**: 801.

BAUMANN, H.; FAUST, V.; Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. *Carbohydrate Research*, 2001, **331**: 43.

BERGER J.; REIST, M.; MAYER, J. M; FELT, O.; GURN, R.; Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57 2004a, **57**:19.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M; FELT, O.; GURN, R.; Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004b, **57**:35.

BHATTACHARYYA, D.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI P. R.; A comparative account of conditions for synthesis of sodium carboxymethyl starch from corn and amaranth starch, *Carbohydrate Polymers*, 1995, **27**: 247.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N.; Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking, *Biomaterials*, 2001;**22**:763.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G.; New method for quantitative-determination of uronic acids, *Analytical Biochemistry*, 1973, **54**: 484.

BRAY, B.; The role of hyaluronan in the pulmonary alveolus, *Journal Theoretical Biological*, 2001, **210**: 121.

BRUMMER, Y.; CUI, W.; WANG, Q.; Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum, *Food Hydrocolloids*, 2003, **17**: 229.

BUCKWALTER, J. A.; MARTIN, J. A.; Osteoarthritis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, **58**:150.

BURDICK, J.; LABERGE, M.; LICKFIELD, G.; Biological lubricant composition and method of applying lubricant composition, US Patent 6.800.298, 2004.

BURRUANO, B. T.; SCHNAARE, R. L.; MALAMUD, D. Synthetic cervical mucus formulation. *Contraception*, 2002, **66**:137.

CARVALHO, R.; CHONG, K. H.; VOLESKY, B.; *Biotechnology Letters*, 1994, **16**: 875.

CHAMPE, P. E.; HARVEY, R.; *Bioquímica Ilustrada*, 2ª edição, Editora Artes Médicas, 1997

CHENG, Y.; BROWN, K.; PRUD'HOMME, R.; Characterization and intermolecular interactions of hydroxypropyl guar solutions, *Biomacromolecules*, 2002, **3**: 456.

CHENG, Y.; PRUD'HOMME, R.; CHIK, J.; RAU, D.; Measurement of forces between galactomannan polymer chains: Effect of hydrogen bonding, *Macromolecules*, 2002, **35**: 10155.

CLOURASIA, M.; JAIN, S.; Polysaccharides for colon targeted drug delivery, *Drug Delivery*, 2004, **11**: 129.

CONTRERAS, R.; KAMERLING, J.; BREG, J.; VLIEGENTHART, J.; ¹H and ¹³C NMR spectroscopy of synthetic monosulphated methyl- α -D-galactopyranosides. *Carbohydrate Research*, 1998, **179**: 411.

COSTA, S. M.; RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; Monitoração do processo de purificação de gomas naturais: Goma do cajueiro, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Abr/Jun, 49, 1996.

COWMAN, M.; FEDER-DAVIS, J.; HITTNER, D.; ¹³C NMR Studies of Hyaluronan. 2. Dependence of conformational dynamics on chain length and solvent, *Macromolecules*, 2001, **34**: 110.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C.; ALENCAR, J. W.; PESSOA, J. C.; Quitosana – a fibra do futuro, Ed. PADETEC (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ), Fortaleza, 1999.

CUNHA, P.L.; MACIEL, J.; SIERAKOWSKI, M.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J. P. A.; Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent, *Journal of Brazilian Chemical Society* (artigo aceito).

DE NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H.; DIJK, J.; SMIT, J.; TEMPO-Mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on the dimensions of the obtained polyelectrolyte chains, *Macromolecules*, 1996, **29**, 6541.

DE NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H.; High selective TEMPO mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharide, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1994, **113**: 165.

DE NOOY, A.E. J.; RORI, V.; MASCI, G.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V.; Synthesis and preliminary characterisation of charged derivatives and hydrogels from scleroglucan, *Carbohydrate Research*, 2000, **324**, 116.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A.; Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advanced Carbohydrate Chemical Biochemistry*, 1975, **31**: 241.

DEBON, S; TESTER, R.; In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides, *Food Chemistry*, 2001, **73**: 401.

DECARVALHO, R.; CHONG, K. H.; VOLESKY, B.; Effects of leached alginate on metal biosorption, *Biotechnology Letters*, 1994, **16**: 875.

DIAZ, V.B.; FUENTS, E.P.; MARTINEZ, O.E. Chondroitin sulfate (Overview). In: SALAMONE, J.C. (Ed.). *Polymeric materials encyclopedia*. Boca Raton: CRC, v.2, 1996.

EDWARDS, J. C. W. The synovium. In: HOCHBERG, M.C.; SILMAN, A.J.; SMOLEN, J.S; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H. *Rheumatology*. Volume 2. 3^a edition. London: Mosby, 2003.

EGE S. A. Organic Chemistry, 2^oed, Lexington, 1989.

EVANICH, J. D.; EVANICH, C.J.; WRIGHT, M. B.; RYDLEWICZ, J. A. Efficacy of intraarticular hyaluronic acid injections in knee osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2001, **390**: 173.

FERRY, J. D., Ilustration of viscoelastic behaviour of polymeric systems. In: FERRY, J. D. *Viscoelastic properties of polymers*. 3^a ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., p.33 -55, 1980.

FREILE-PELEGRIN, Y.; ROBLEDO, D.; Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan, Mexico, *Journal of Applied Phycology*, 1997, **9**: 533.

FREITAS, R.; MARTIN, S.; DE PAULA, R.; FEITOSA, J. P.A.; SIERAKOWSKI, M. R.; Effect of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of an oxidized galactoxyloglucan from *Hymenaea courbaril* (Jatobá) seeds, *Thermochimica Acta*, 2004, **409**: 41.

GERWIN, N.; HOPS, C.; LUCKE, A.; Intraarticular drug delivery in osteoarthritis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, **58**: 226.

GHOSH, P.; GUIDOLIN, D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Seminars Arthritis and Rheumatism*, 2002, **32**, 10.

GITTINGS, M.; IPELETTI, L., TRAPPE, V; WEITZ, D., IN, M.; MARQUES, C.; Structure of guar in solutions of H₂O and D₂O: An ultra-small-angle light-scattering study, *Journal of Physical Chemistry B*, 2000, **104**: 4381.

GLIKO-KABIR, I.; PENHASI, A.; RUBINSTEIN, A.; Characterization of crosslinked guar by thermal analysis, *Carbohydrate Research*, 1999, **316**: 6.

GLIKO-KABIR, I.; YAGEN, B.; BALUOM, M.; RUBINSTEIN, A.; Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery I. Preparation and physicochemical characterization, *Journal of Controlled Release*, 2000, **63**: 129

GLIKO-KABIR, I; YAGEN, B; PENHASI, A.; RUBINSTEIN A.; Low swelling, crosslinked guar and its potential use as colon-specific drug carrier, *Pharmaceutical Research*, 1998:**15**, 1019.

GOLDING, D.; *Reumatologia em Medicina e Reabilitação*. Editora Atheneu, 1996.

GRASDALEN, H.; PAINTER, T.; N. M. R. studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans, *Carbohydrate Research*, 1980, **81**: 59

HAMDI, G.; PONCHEL, G.; Enzymatic Degradation of epichlorohydrin crosslinked starch microspheres by α -amylase, *Pharmaceutical Research*, 1999, **16**: 6.

HANNAN, N.; GHOSH, P.; BELLENGER, C. TAYLOR, T., Systemic administration of glycosaminoglycan polysulphate (Arteparon) provides partial protection of articular cartilage from damage produced by meniscectomy in the canine. *Journal of Orthopaedic Research*, 1987, **5**: 47.

HASCAL, V.; LAURENT, T.; Hyaluronan: Structure and Physical Properties. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan>>. Acesso em: 26 jun.2006

HEATLEY, F.; SCOTT, F.; A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan, *Biochemical Journal*, 1988, **254**: 489.

HENNINK, W. E., VAN NOSTRUM, C.F.; Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**: 13.

HOCHBERG, M. C.; Role of intra-articular hyaluronic acid preparations in medical management of osteoarthritis of the knee, *Seminars Arthritis and Rheumatism*, 2000, **30**: 2.

HOFFMAN, A.; Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002; **54**: 3.

HOLDSWORTH, S. D.; Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. *Journal of Texture Studies*, 1971, **2**: 393.

HOLMES, M.; BAYLISS, M. E. MUIR, H.; Hyaluronic-acid in human articular-cartilage - age-related-changes in content and size, *Biochemical Journal*, 1988, **250**: 435.

IBAÑEZ, M.; FERRERO, C.; Extraction and characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC seeds, *Food Research International*, 2003, **36**: 455.

JAYAKRISHNAN, A.; JAMEELA, SR.; Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices, *Biomaterials*, 1996, **17**:471.

JONES, J.; STOODLEY, R. Fractionation using copper complexes. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1965, **5**: 36.

KAKEHI, K.; KINOSHITA, M.; YASUEDA, S.; Hyaluronic acid: separation and biological implications, *Journal of Chromatography B*, 2003, **797**: 347.

KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A.; TEMPO-mediated oxidation of chitin, regenerated chitin and N-acetylated chitosan, *Carbohydrate Polymers* 2003, **51**, 69.

KAWAHARA, J.; OHMORI T.; ONKUBO T.; HATTORI S.; KAWAMURA M.; The structure of glutaraldehyde in aqueous solution determined by ultraviolet absorption and light scattering, *Analytical Biochemistry*, 1992, **201**:94.

KIM, B.H. .; KIM, D.; JUNG, Y.; KIM, H.; CHO, D.; Swelling behavior and mechanical strength of crosslinked dextran hydrogel, *Macromolecular Research*, 2003, **11**: 291.

KIRWAN, J.; Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee?, *The knee*, 2001, **8**:93.

KNUDSON, C.; KNUDSON, W.; Cartilage proteoglycans, *Cell & Developmental Biology*, 2001, **12**: 69.

KONISHI, M.;TABATA, Y.;KARIYA, M.; SUZUKI, A.; MANDAI, M.; NANBU, K.; TAKAKURA, K.; FUJII, S.; *In vivo* anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel, *Journal Of Controlled Release*, 2003, **92**:301.

KUETMER, K.; THONAR, E.; AYDELOTTE, M.; Articular cartilage - structure and chondrocrte metabolism. In:Muir H, Hirohata K, Shichikawa K, eds. *Mechanistas of Articular Cartilage Damage and Repair in Osteoarthritis*. Toronto, Canada: Hogrefe & Huber Publishers, 1990.

KUMAR, M. R.; A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, 2000, **46**:1.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M.; Princípios de Bioquímica, 2ª edição, São Paulo, Sarvier Editora, 2000.

LINDENHAYN, K.; HEILMANN, H. H.; NIEDERHAUSEN, T.; WALTHER, H. U.; POHLENZ, K. Elimination of tritium-labelled hyaluronic acid from normal and osteoarthritic rabbit knee joints. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1997, **35**: 355.

LOPEZ, M. J.; KUNZ, D.; VANDERBY Jr., R.; HEISEY, D.; BOGDANSKE, J.; MARKEL, M. M. A comparison of joint stability between anterior cruciate intact and deficient knees: a new canine model of anterior cruciate ligament disruption. *Journal of Orthopaedic Research*, 2003, **21**: 222.

LPCH - Lucile Packard Children's Hospital. Pediatric Arthritis & Other Rheumatic Diseases. Disponível em:

<<http://www.lpch.org/DiseaseHealthInfo/HealthLibrary/arthritis/joint.html>>.

Acesso em: 01 jul.2006

MÄHNER, C.; LECHMER, M.; NORDMEIER, E.; Synthesis and characterisation of dextran and pullulan sulphate. *Carbohydrate Research*, 2001, **331**: 203.

MARK, H.; OVERBEIGER, C.; OTHMAR, D.; SEABORG, G.; Rheologica Acta-Encyclopedia of Chemical Technology, 3ª edição, vol. 12, John Wiley & Sons In, 1980.

MC CARTY, D.; *Sinovial Fluid*, in "Arthritis and allied conditions – a textbook of rheumatology", volume 1, Mc Carty, D e Koopman, W., eds., 12ª edição, Editora Lea & Febiger, 1993.

MC CLEMENTS, J. Food Biopolymers and Colloids Research Laboratory. University of Massachusetts Amherst. Disponível em: <http://www.unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Rheology.html>> Acesso em : 06/02/2005.

MEER, G.; MEER, W. A. & TINKER, J. Water-Soluble Gums: Their past, present, and future. *Food Technology*, 1975, **29**: 22.

MEYER, K.; PALMER, J. W.; The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 1934, **107**: 629.

MITCHELL, J. R. Rheological techniques. In: GRUENWEDEL, D. W.; WHITAKEN, J. R. Food analysis: principles and techniques [S.I.]: Marcel-Dekker, Inc., p.151-220, 1984.

MORRIS, V.J. Food gels - roles played by polysaccharides. Chemistry and Industry, London, v. 4, p- 159-164, 1985.

MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E.; Structure/function studies of anticoagulant sulfated polysaccharides using NMR. *Journal of Biotechnology*, 2000, **77**: 123.

MURTHY, S.; HIREMATH, S.; PARANJOTHY, K.; Evaluation of carboxymethyl guar films for the formulation of transdermal therapeutic systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, **272**: 11.

MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; COSANI, A.; TIERBOJEVICH, M.; 6-Oxyctins, novel hyaluronan-like regiospecifically carboxylated chitin, *Carbohydrate Polymers*, 1999, **39**, 361.

MUZZARELLI, R.; MUZZARELLI, B.; Structural and functional versatility of chitins, In: Dumitriu, S. (Ed.). *Polysaccharides*. Marcel Dekker, Inc., 1998.

NETO, J. F. M.; Osteoartrite. Disponível em:

< <http://www.msdrasil.com/msdbrazil/patients/biblioteca/artigos/osteoartrite/artigo2.html> > Acesso em: 28 jun.2006

NEUKOM, H. Galactomannans: Properties and Applications. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1989, **22**: 41.

O'NEILL, A.N.; Sulphated derivatives of laminarin, *Canadian Journal Chemistry*, 1955, **33**: 1097.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S.; Analgesic effects of chitin and chitosan, *Carbohydrate Polymer*, 2002, **49**: 249.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO I.; COIMBRA, T.; GORIN, P.; SIERAKOWSKI, M.; *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain), *Antiviral Research*, 2003, **60**: 201.

PASQUALI RONCHETTI, I.; GUERRA, D.; TAPARELLI, F.; BORALDI, F.; BERGAMINI, G.; MORI, G.; ZIZZI, F.; FRIZZIERO, L. Morphological analysis of knee synovial membrane biopsies from a randomized controlled clinical study comparing the effects of sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate (Depomedrol) in osteoarthritis, *Rheumatology*, 2001, **40**: 158.

PAULINO, A.; SIMIONATO, J.; GARCIA, J.; NOZAKI, J.; Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides, *Carbohydrate Polymers*, 2006, **64**: 98.

PELLETIER, J. M.; Pathophysiology of osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2004, **12** (suppl 1): 31.

PELLETIER, S.; HUBERT, P.; PAYAN, E.; MARCHAL, P.; CHOPLIN, L. E DELLACHERIE, E.; Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: Rheological properties, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, **54**: 102.

PEPPAS, N.; BURESA, P.; LEOBANDUNGA, W.; ICHIKAWA H.; Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, **50**: 27.

PEREZ, D.; MONTANARI, S.; VIGNON, M.; TEMPO-Mediated oxidation of cellulose III, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 1417.

PIPITONE, V.R. Chondroprotection with chondroitin sulfate. *Drugs Experimental and Clinical Research*, 1991, **17**: 3.

POOLE, A. R.; Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, **96**: 2859.

POZO, M.; BALAZS, E. E BELMONTE, C.; Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative, *Experimental Brain Research*. 1997, **116**:3.

PRABHANJAN, H.; GHARIA, M.; SRIVASTAVA, H.; Guar gumderivates. Part I: Preparation and properties, *Carbohydrate Polymers*, 1989, **11**: 279.

PRIETO, J.; PULIDO, M.; ZAPICO, J.; MOLINA, A.; GIMENO, M.; CORONEL, P.; ALVAREZ, A.; Comparative study of hyaluronic derivatives: rheological behaviour, mechanical and chemical degradation, *International Journal of Biological Macromolecules*, **35**: 63.

PTCL- Physical & Theoretical Chemistry Laboratory. Safety (MSDS) data for glutaric dialdehyde. Disponível em: <http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/GL/glutaric_dialdehyde.html>. Acesso em: 09 jul.2006

RAKHMANBERDYEVA, R. K.; RAKHIMOV, D. A.; VAKHABOV, A. A.; KHUSHBAKTOVA, Z. A.; SYROV, V. N.; Galactomannan from *Gleditsia macracantha* seeds and its biological activity, *Chemistry of Natural Compounds*, 2005, **41**: 11.

RASHID, A.; MACKIE, W.; COLQUHOUN, I.; LAMBA, D.; Novel Synthesis of monosulphated methyl α -D-galactopyranosides, *Canadian Journal of Chemistry*, 1990, **68**: 1122.

RAYMENT, P.; ROSS-MURPHY, S.; ELLIS, P.; Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures — I. Steady shear measurements, *Carbohydrate Polymers*, 1995, **28**: 121.

RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 1993, jan/mar, 31.

ROSIAK, J. M.; YOSHEL, F.; Hydrogels and their medical applications, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1999, **B151**: 56.

RUJIRAVANIT, R.; KRUYKITANON, S.; JAMIESON, AM.; TOKURA, S.; Preparation of crosslinked chitosan/silk fibroin blend films for drug delivery system, *Macromolecular Bioscience*, 2003, **3**: 604.

SARGENTELLI, H. V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C.; Aspectos do Metabolismo do Cobre no Homem, *Química Nova*, 1996, **19**: 290.

SCOTT, D.; COLEMAN, P. J.; MASON, R. M.; LEVICK, J.; Action of polysaccharides of similar average mass but differing molecular volume and charge on fluid drainage through sinovial interstitium in rabbit knees, *Journal of Physiology*, 2000, **528**: 509.

SEAMAN, J.; in: Handbook of Water-Soluble Gums and Resins, R. Davidson, ed., McGraw-Hill Book Company, 1980.

SEOG, J.; DEAN, A.; PLAAS, A.; WONG-PALMS, S.; GRODZINSKY, A. E. ORTIZ, C.; Direct measurement of glycosaminoglycan intermolecular interactions via High Resolution Force Spectroscopy, *Macromolecules*, 2002, **35**: 5601.

SIERAKOWSKI, M.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M.; Specific modifications of galactomannans, *Carbohydrate Polymers*, 2000, **42**: 51.

SILVA, D.A.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A.; DE BRITO, A.C.F.; MACIEL, J.S.; PAULA, H.C.B.; Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide *Carbohydrate Polymer*, 2004, **58**: 163.

SILVER, F.H.; BRADICA, G.; TRIA, A.; Viscoelastic behavior of osteoarthritic cartilage, *Connective Tissue Research*, 2001, **42**: 223.

SOUZA, M. V. N.; Utilização do TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) na oxidação de álcoois primários e secundários, *Química Nova*, 2004, **27**: 287.

STANLEY, W.; FRANCONI, C.; LOSSOW, W.; *Anatomia e Fisiologia Humana*, 5ª edição, Editora Guanabara, 1990.

STOOP, R.; BUMA, P.; van der KRAAN, P. M.; HOLLANDER, A.P.; BILLINGHURST, R.C.; MEIJERS, T.H.M.; POOLE, A.R.; van den BERG, W.B.; Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001, **9**: 308.

SUH, J.; MATTHEW, H.; Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, 2000, **21**: 2589.

TAGER, A.; Rubber-like state of polymers. In: Physical chemistry of polymers, Mir Publishers, Moscow, 2ª ed., Cap. 7, p. 175-206, 1980.

TAKIGAMI, S.; TAKIGAMI, M.; PHILLIPS, G.; Effect of preparation method on the hydration characteristics of hylan and comparison with another highly cross-linked polysaccharide, gum-arabic, *Carbohydrate Polymers*, 1995, **26**: 11.

TAYAL, A.; PAI, V.; KHAN, S.; Rheology and microstructural changes during enzymatic degradation of a guar-borax hydrogel, *Macromolecules*, 1999, **32**: 5567.

THE ARTHRITIS SOCIETY. Osteoarthritis. Disponível em: <
<http://www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/osteoarthritis/default.asp?s=1>
>. Acesso em: 26 jun. 2006

TIJSEN C. J., KOLK H. J., STAMHUIS E .J., BEENAKERS A. A. C. M., An experimental study on the carboxymethylation of granular potato starch in non-aqueous media, *Carbohydrate Polymers*, 2001, **45**: 219.

TIJSEN, C. J.; SCHERPENKATE H. J.; STANHUS E. J.; BEENACKERS A. A. C. M.; Optimisation of the process conditions for the modification of starch, *Chemical Engineering Science*, 1999, **54**: 2765.

TOKURA, S.; NISHI, N.; TSUTSUMI, A.; SOMORIN,O.; Studies on chitin. 8. Some properties of water-soluble chitin derivatives, *Polymer Journal*, 1983, **15**: 485.

TONUSSI, C.; FERREIRA, S.; Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics, *Pain*, 1992, **48**: 421.

TURVEY, J. R.; Sulfates of the simple sugars, *Advanced Carbohydrate Chemistry*, 1965, **20**: 183.

UKAI, S.; KIHO, T.; HARA, C.; KURUMA, I.; TANAKA, Y. Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 1983, **12**: 983.

VARMA, A.; KOKANE, S.; PATHAK, G.; PRADHAN, S.; Thermal behavior of galactomannan guar gum and its periodate oxidation products, *Carbohydrate Polymers*, 1997, **32**: 111.

VERRAEEST, D. L.; PETERS, J. A.; KUZEE, H. C.; BATELAAN, J. G.; VAN BEKKUM, H.; Carboxymethylation of inulin, *Carbohydrate Research*, 1995, **271**: 101.

VILLETI, M.; CRESPO, J.; SOLDI, M.; PIRES, A.; BORSALI, R. E SOLDI, V.; Thermal degradation of natural polymers, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2002, **67**: 295.

VINOGRADOV, G. V. E.; MALKIN, A. Y.; Basic concepts of rheology. In: Rheology of polymers. Mir Publishers, Moscow, Cap 1, Item 1.5, p. 36-39, 1980.

WANG , Q.; ELLIS, P.; ROSS-MURPHY, S.; Dissolution kinetics of guar gum powders. I. Methods for commercial polydisperse samples, *Carbohydrate Polymers*, 2002, **49**: 131.

WANG, I.; WANG, J.; CHIANG, Y.; Insolubilization of sodium chondroitin sulfate by forming a semi-interpenetrating polymer network with acrylic acid: A potential carrier of colon-specific drug delivery, *Journal of Applied Polymer Science*, 2002, **85**: 114.

WARD, P.; THIBEAULT, S.; GRAY, S.; Hyaluronic acid: Its role in voice, *Journal of Voice*, 2002, **16**: 303.

WEISSMAN, B.; MEYER, K.; The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *Journal of American Chemical Society*, 1954, **76**: 1753.

WHISTLER, R. L. & HYMOWITZ, T. Guar: Agronomy, Production, Industrial Use and Nutrition. Indiana: Purdue University Press, 1979.

WIEN TJES, R.; DUIT S, M.; JONGSCHAAP, R.; MELLEMA, J.; Linear rheology of guar gum solutions, *Macromolecules*, 2000, **33**: 9594.

WINKELHAKE, J. L.; Will complex carbohydrate ligands of vascular selectins be the next generation of non-steroidal anti-inflammatory drugs? *Glycoconjugate Journal*, 1991, **8**: 381.

WOBIG, M.; BACH, G.; BEKS, P.; DICKHUT, A.; RUNZHEIMER, J.; SCHWIEGER, G.; VETTER, G.; BALAZS, E. The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan. *Clinical Therapeutics*, 1999, **21**: 1549.

YANG, J.; DU, Y.; WEN, Y.; LI, T.; HU, L.; Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents, *Carbohydrate Polymers*, 2003, **52**: 397.

ZHAO, M.; LI, J.; MANO, E.; SONG, Z.; TSCHAEN, D. M.; GRABOWSKI, E. J. J.; REIDER, P. J.; Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach, *Journal of Organic Chemistry*, 1999, **64**: 2564.

ZHAO, X.; KATO, K.; FUKUMOTO, Y.; NAKAMAE, K.; Synthesis of bioadhesive hydrogels from chitin derivatives, *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 2001, **21**:227.



7. Trabalhos Futuros



TRABALHOS FUTUROS

- Testar a goma guar purificada pelo método físico (GGFIS) em ratos Wistar, verificando tanto o efeito *per se* desta goma no espaço intra-articular quanto o efeito terapêutico em osteoartrite induzida por TLCA.
- Testar a quitina carboximetilada no modelo de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos Wistar.
- Avaliar a ação terapêutica da goma guar na osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior, a fim de entender o mecanismo de ação de analgesia deste polissacarídeo.



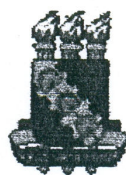
8. Anexos



ANEXO

ANEXO 1 - Declaração de aprovação junto ao CEPA-UFC.

ANEXO 2 – Lista de publicações



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
CEP: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 288-8338 Fax: (85) 288-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 03/03, sobre o projeto intitulado **“Modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos efeitos de fármacos antiinflamatórios”**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em reunião realizada em 27 de agosto de 2003.

Fortaleza, 03 de setembro de 2003

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como Gisela Costa Camarão.

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

Trabalhos em congressos

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade. Efeito da viscosidade e da modificação estrutural da goma guar sobre a sua ação em joelho com osteoartrite. In: 8º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, Águas de Lindóia. 2005.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade. Efeito de um polissacarídeo de goma guar (GG) na hiperalgesia articular em um modelo experimental de osteoartrite (OA) em ratos. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE REUMATOLOGIA, São Paulo. 2004.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C da. Viscosupplementation in the osteoarthritic knee with guar gum. In: 5TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES, 2004, São Pedro -SP.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; CASTRO, Rondinelle R; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade; ROCHA, Francisco Airton C da. Derivado de goma guar a ser aplicado em viscosuplementação. In: 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, Belo Horizonte. 2003.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade. Efeito de um polissacarídeo de goma guar (GG) na hiperalgesia articular em um modelo experimental de osteoartrite (OA) em ratos. In: XXXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, Águas de Lindóia. 2004.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade. Efeito do polissacarídeo de goma guar sobre a deambulação e o influxo celular em cavidade articular de ratos. In: XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA, Águas de Lindóia. 2003.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; FEITOSA, Judith P A; ROCHA, Francisco Airton C da; PAULA, Regina C M de. Derivado da goma guar como substituto do líquido sinovial na

viscossuplementação de articulação de joelho. In: 25ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Poços de Caldas, 2002.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade. Efeito de um polissacarídeo de alto peso molecular na artrite por Zymosan (AZy). In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, Águas de Lindóia, 2002.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade. Aplicação de derivado da goma guar na viscossuplementação da articulação de joelho. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, Natal, 2002.

Artigos completos em periódicos

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade; PAULA, Regina C M de; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C da. Low viscosity hydrogel of guar gum: Preparation and physicochemical characterization. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, **37**: 99-104.

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; MACIEL, Jeanny da Silva; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade; SIERAKOWSKI, Maria Rita; PAULA, Regina C M de. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. Journal of Brazilian Chemical Society 2006 (Aceito).

CASTRO, Rondinelle R; CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade; ROCHA, Francisco Airton C da. Antinociceptive activity of a polysaccharide in experimental osteoarthritis is independent on the gel state. Osteoarthritis and Cartilage, 2006 (Submetido).

Patente

CUNHA, Pablyana Leila Rodrigues da; CASTRO, Rondinelle R; ROCHA, Francisco Airton C

da; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade. Hidrogeis fluido de goma guar purificada e desproteínada como agente viscoelástico aplicado na viscosuplementação de articulações com osteoartrite. 2005.

Prêmios

Prêmio Luiz Vertzman da Sociedade Brasileira de Reumatologia - 2004