



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LABORATÓRIO DE POLÍMEROS

FRANCISCO DE ARAÚJO MAGALHÃES

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS SUPORTES POROSOS
(SCAFFOLDS) A BASE DE GÉIS DE GELATINA/ GOMA DO CAJUEIRO
(ANACARDIUM OCCIDENTALE) OXIDADA**

FORTALEZA

2013

FRANCISCO DE ARAÚJO MAGALHÃES

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS SUPORTES POROSOS
(SCAFFOLDS) A BASE DE GÉIS DE GELATINA/ GOMA DO CAJUEIRO
(ANACARDIUM OCCIDENTALE) OXIDADA**

**Dissertação submetida à coordenação
do Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em
Química.**

**Orientadora: Prof^a. Dra. Jeanny da Silva
Maciel.**

FORTALEZA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M166p Magalhães, Francisco de Araújo.

Preparação e caracterização de potenciais suportes porosos (scaffolds) a base de géis de Gelatina/Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) oxidada / Francisco de Araújo Magalhães. – 2013.

57 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.

Orientação: Profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel.

1. Goma do cajueiro oxidada. 2. Gelatina. 3. Suportes porosos. 4. Scaffolds. I. Título.

CDD 540

Esta dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Inorgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Francisco de Araújo Magalhães

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 29/07/2013

EXAMINADORES:

Profª. Dra. Jeanny da Silva Maciel
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Haroldo Cesar Beserra de Paula
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profª. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte – IFRN

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela maravilhosa oportunidade de ter uma vida e vivê-la na companhia de pessoas tão maravilhosas como as que tenho perto de mim.

Ao meu pai, Antonio e minha mãe Rosilene por toda paciência e amor.

Aos meus irmãos Jean e Felipe pelos momentos de felicidade e pelo companheirismo em todas as horas.

À minha orientadora Jeanny da Silva Maciel, pela dedicação, pela paciência e principalmente pela amizade. Pelas análises de ressonância magnética nuclear que ela realizou mesmo quando estava muito ocupada com outras coisas, doando muito de seu tempo. Pelo apoio em todas as minhas decisões e pelos conselhos que com muita lucidez me foram dados.

Às professoras Judith Feitosa, Regina Célia, Pablyana Cunha e Durcilene Alves pela ajuda, contribuição e solução de dúvidas sobre detalhes técnicos nos trabalhos.

Aos meus amigos pessoais Guilherme Veras, Eliseu Canuto, Fabrício Siqueira, Ramiro Magalhães, Wesley Matos, Emerson de Sousa, Clara Myrla, Aliny Abreu pelas horas de descontração

Aos meus amigos do laboratório de Polímeros Natália Pires, Venícios Sombra, Lorena Oliveira, Iolanda Frota, Jamily Cavalcante.

À Elis Cristina pelas análises de infravermelho tão prontamente realizadas.

Ao Laboratório de Vegetais de Defesa

Ao CENAUREM pela análise de ressonância magnética nuclear.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se aos pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde nem conhecem vitória, nem derrota" (Theodore Roosevelt)

RESUMO

Todos os anos muitos pacientes sofrem a perda ou a insuficiência de um órgão ou tecido como resultado de acidentes ou doenças. Muitos estudos têm sido desenvolvidos para o reparo desses órgãos ou tecidos, utilizando conhecimentos da área de Engenharia de Tecidos. Esta se utiliza de suportes porosos (*scaffolds*) como ambiente para crescimento de células e tecidos. Suportes porosos de gelatina têm sido produzidos para a regeneração de cartilagem e tecidos ósseos. Hidrogéis de gelatina obtidos sem um agente reticulante dissolvem-se rapidamente a temperatura do corpo humano e isso limita muito suas aplicações. O problema é que a maioria dos agentes reticulantes é tóxico. Polissacarídeos oxidados têm sido investigados como agentes reticulantes muito menos tóxicos. Oxidação de polissacarídeos com periodato de sódio é uma técnica simples que introduz múltiplos grupos funcionais aldeídicos, tornando os polissacarídeos capazes de atuar como um reticulador macromolecular para polímeros contendo grupos amino, como é o caso da gelatina. A goma do cajueiro (GC) é extraída de árvores do nordeste brasileiro e foi caracterizada como um heteropolissacarídeo contendo β -D-galactose (72-73%), α -D-glucose (11-14%), arabinose (4,6-5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glucurônico (4,7-6,3%) em porcentagem de massa. Este trabalho objetiva a oxidação de GC por periodato de sódio para a produção de um polialdeído (GCO) que irá interagir com Gelatina para a produção de um hidrogel de GCO/GE que por seguinte será liofilizado para a obtenção de uma estrutura porosa que será usada para liberar BSA. Foram realizadas oxidações nas porcentagens de 17, 46 e 71% que foram nomeadas de GCO2, GCO5 e GCO8, respectivamente. Nos espectros de Infravermelho dos derivados oxidados GCO5 e GCO8 foi observada a aparição de uma nova banda, em relação à GC e GCO2, em 1735 cm^{-1} atribuída a vibração de estiramento da ligação C=O de aldeído, o que evidencia a oxidação. No espectro de ressonância magnética nuclear ocorre o aparecimento de sinais em δ 5,6 e δ 5,7 correspondentes a um hemiacetal intra-residual formado entre um grupo aldeído e grupos hidroxilas vizinhos e também uma diminuição da intensidade do sinal de CH₃ da ramnose (δ 1,3) e um desdobramento deste sinal, sugerindo que a oxidação pode ter acontecido, também, nesta unidade monossacarídica. Os cromatogramas de GPC para GC e os derivados oxidados mostram que a massa molar de pico (M_{pk}) diminui com o aumento do grau de oxidação de GC. Através dos ensaios reológicos foi observado que com o aumento da temperatura da reação o tempo de crossover (tempo de gel) diminui indicando que o gel forma mais rapidamente a temperaturas mais altas. Da mesma forma comparando-se diferentes graus de oxidação, quanto maior o grau de oxidação mais rapidamente G' cruza G''. Suportes porosos a partir de géis de GCO/GE foram obtidos pelo método de congelamento e secagem por liofilização (*freeze-drying*). Foram obtidas micrografias da superfície porosa dos suportes e a média do diâmetro de poros observados diminui com o aumento do grau de

oxidação de GCO. GCO2/GE com a maior média de $201 \pm 66 \mu\text{m}$ seguido de GCO5/GE $150 \pm 49 \mu\text{m}$ e GCO8/GE $94 \pm 22 \mu\text{m}$. Em concordância com o diâmetro de poros obtidos por MEV, os géis de GCO2/GE apresentaram a maior média de porosidade, $53,00 \pm 0,19\%$ seguido de GCO5/GE $39,02 \pm 0,39\%$ e GCO8/GE $21,24 \pm 2,38\%$ que foi medida pelo método de intrusão de etanol. O intumescimento para os suportes de GCO/GE foi GCO2/GE > GCO5/GE > GCO8/GE. No acompanhamento da liberação em dias, os géis que intumesceram mais liberaram maior quantidade de BSA. GCO2/GE liberou 35,7% e depois dissolveu. GCO8/GE liberou 82% de BSA até o 13º dia (GCO5/GE não foi utilizada neste ensaio).

Palavras-chave: Goma do cajueiro oxidada, Gelatina, suportes porosos, *scaffolds*.

ABSTRACT

Every single year, many patients suffer a loss or a failure in an organ or a tissue, due to a result of a certain disease or an injury. Many studies have been developing ways to repair organs or tissues, using the knowledge of Tissue Engineering. This particular methodology makes the usage of porous supports (scaffolds) as an environmental structure for the growth in cells and tissues, thus, the Gelatin scaffolds duly produced, are for the regeneration of cartilage and bone tissues. The Gelatin hydrogels obtained without a crosslinker would dissolve the temperature rapidly in the human body and this will greatly limit its applications. The difficulty is the fact that the crosslinkers are toxic. The oxidized polysaccharides duly investigated are crosslinkers and less toxic. The Oxidation of the polysaccharides with sodium periodates is a simple technique, which introduces multiple functional groups, such as the aldehyde making the polysaccharides capable of acting as a crosslinker for the macromolecular polymers containing amino groups, as the gelatin. The cashew gum (CG) is extracted from trees in the northeastern Brazil and it was characterized as a heteropolysaccharide containing the β -D-galactose (72-73%), α -D-glucose (11-14%), arabinose (4.6 -5%), rhamnose (3.2 to 4%) and the glucuronic acid (4.7 to 6.3%) by a mass percentage. This study aims the CG oxidation through a sodium periodate, in order to produce a polyaldehyde (CGO) that will interact with the gelatin to produce a hydrogel CGO/GE and be lyophilized for obtaining a porous structure, which is used to release the BSA, therefore, oxidations in percentages of 17, 46 and 71%, named CGO2, CGO5 and CGO8 were implemented. The IR spectra from the following oxidized derivates, CGO5 and CGO8, were observed and a different aspect in a new band with reference to the CG and CGO2 at 1735 cm^{-1} ascribed to the stretching vibration of the C=O bond in the aldehydes, which showed the oxidation. This study also shows the nuclear magnetic resonance spectra appearances of the signals δ 5.6 and δ 5.7, corresponding to a residual intra-hemiacetal formed between an aldehyde group and a neighboring hydroxyl group, as well as a decrease in the signal strength of the CH3 inside the rhamnose (δ 1.3) and the offshoot from this particular signal, suggesting that an oxidation has occurred. The GPC chromatograms of the CG and the oxidized derivates, show that the molecular weight peak (M_{pk}) decreases with the increasing degrees in oxidation of the CG. Through the rheological tests, we observed that the increasing reaction in the temperature, decreases the time in the crossover, thus, indicating that the gel was formed rapidly at higher temperatures. Likewise, comparing different degrees of oxidation, the greater the degree of oxidation is, the faster the G' crosses G'' . Porous gels from the CGO/GE were duly obtained through the freezing method and drying by lyophilization (freeze-drying). The micrographs on the surface were obtained from the porous average and the medium pore diameter decreases with the increase observed in the degree of the oxidation for the CGO, therefore, the CGO2/GE with the highest average of $201 \pm 66\text{ mM}$ is followed by the CGO5/GE $150 \pm 49\text{ mM}$ and the CGO8/GE 94 ± 22

microns. Hence, based in the agreement with the pore diameter obtained by the SEM, the gels of the CGO2/GE showed the highest average porosity, $53.00 \pm 0.19\%$ CGO5/GE followed by $39.02 \pm 0.39\%$ and the CGO8/GE $21.24 \pm 2.38\%$. The swelling for the CGO/GE was CGO2/GE > CGO5/GE > CGO8/GE. We noticed that during the days of the swollen gels, a higher amount of the BSA released from the said gels. The CGO2/GE released 35.7% and then dissolved. The CGO8/GE released 82% of the BSA until the 13th day.

Keywords: Cashew gum oxidized, Gelatin, *scaffolds*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos principais aminoácidos da gelatina.....	17
Figura 2 - Tripla hélice de colágeno.....	17
Figura 3 – Padrões de oxidação de polissacarídeos ilustrados pela reação com a unidade β -D-galp: (a) dupla oxidação entre C(2) e C(3) e entre C(3) e C(4), respectivamente com a liberação de C(3) como ácido fórmico, (b) unidades ligadas (1 \rightarrow 4) onde a clivagem ocorre entre C(2) e C(3), (c) unidades ligadas (1 \rightarrow 3) que são resistentes à oxidação. Baseado em KRISTIANSEN, POTTHAST E CHRISTENSEN (2010).....	19
Figura 4 - Mecanismo de quebra de dióis vicinais (VOLLHARDT E SCHORE, 2004).....	20
Figura 5 – Formação de Base de Schiff a partir de uma amina e um aldeído (VOLLHARDT E SCHORE, 2004).....	21
Figura 6 – Reticulação via base de Schiff entre GE e o polissacarídeo oxidado (YU E XIAO, 2008).....	21
Figura 7 – Estrutura dos aminoácidos de gelatina com grupos amino livres para a formação de Base de Schiff (SCHACHT E COL., 1997).....	22
Figura 8. (A) Unidades monossacarídicas da composição da goma do cajueiro do nordeste. (B) Representação da estrutura do polissacarídeo extraído do exsudato do cajueiro. (R = ramnose ou arabinose) (CUNHA E COL. (2007).....	25
Figura 9 – Albumina Sérica Bovina (BSA) (estrutura cristalina).....	27
Figura 10 – Espectros de infravermelho de GC e seus derivados oxidados GCO ₂ , GCO ₅ e GCO ₈	36
Figura 11 – Espectro de RMN de ¹ H de GC e dos derivados oxidados.....	38
Figura 12 - Formação de um hemiacetal intra-residual baseado em BRUNEEL E SCHACHT (1993).....	38
Figura 13 – Cromatograma de soluções aquosas 0,1% m/v de GC e seus derivados oxidados GCO ₂ , GCO ₅ e GCO ₈	39
Figura 14 – Espectro de infravermelho de gelatina.....	40
Figura 15 – Variação de G' e G'' com o tempo para: (a) GC/GE e (b) GCO ₂ /GE.....	42
Figura 16 – Em (a) comportamento típico de um processo de geleificação de GCO/GE com GCO ₅ e T = 40 °C. ($\Delta G'/\Delta t$) é a inclinação da reta de G' sobre o tempo t. Em (b) o tratamento de Arrhenius da taxa de geleificação ($\Delta G'/\Delta t$) contra 1/T para géis GCO/GE com diferentes graus de oxidação.....	42

Figura 17 – Fotografias digitais dos géis secos GCO8/GE (a, b, c) e de GE somente (d, e, f): (a) e (d) superfície superior; (b) e (e) superfície lateral; (c) e (f) superfície inferior.....	44
Figura 18 – Micrografias MEV das superfícies dos géis de GCO/GE de diferentes graus de oxidação: (A)GCO2/GE; (B) GCO5/GE; (C) GCO8/GE; (D) seção lateral de GCO5/GE.....	45
Figura 19 – Média do diâmetro de poros para géis de diferentes graus de oxidação de GCO.....	46
Figura 20 – Porosidade dos géis de GCO/GE de diferentes graus de oxidação de GCO: GCO2, GCO5 e GCO8.....	46
Figura 21 – Ensaio de intumescimento dos géis GC/GE e GCO/GE: (a) até tempo t = 300 minutos e (b) até t = 14 dias.....	47
Figura 22 – Espectros de infravermelho dos géis de GE, GCO2/GE, GCO5/GE e GCO8/GE.....	49
Figura 23 – Liberação de BSA em tampão pH 7,4 a partir de géis GCO2/GE e GCO8/GE: (a) até 5h e (b) até 13 dias, à 37 °C e 50 rpm.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados reacionais da goma do cajueiro com periodato de sódio à temperatura ambiente.....	30
Tabela 2 – Caracterização de GC modificada por oxidação com NaIO ₄	39
Tabela 3 - Atribuições das absorções no espectro na região do infravermelho.....	40
Tabela 4 – Tempo de CROSSOVER para os sistemas GCO/GE a diferentes temperaturas.....	43
Tabela 5 – Raio e altura média dos géis secos.....	44
Tabela 6 – Intumescimento para os géis de GCO/GE e GC/GE em 5h e no 1º, 8º e 14º dias.....	48
Tabela 7 – Massa residual dos géis de GCO/GE após 14 dias de intumescimento.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
BSA	Albumina Sérica Bovina
DP	Desvio Padrão
E_a	Energia de ativação
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GC	Goma do Cajueiro
GCO	Goma do Cajueiro Oxidada
GCO2	Goma do Cajueiro Oxidada 20 %
GCO5	Goma do Cajueiro Oxidada 50 %
GCO8	Goma do Cajueiro Oxidada 80 %
GCO/GE	Gel de Goma do Cajueiro Oxidada com Gelatina
GE	Gelatina
Gli	Glicina
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
HPN	Rede Polimérica Híbrida (Hybrid Polymeric Network)
M_e	Massa de etanol
M_{pk}	Massa molar de pico
M_s	Massa seca
U_m	Massa úmida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de próton
UFC	Universidade Federal do Ceará
V_e	Volume de eluição
V_p	Volume de poros
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Gelatina	15
1.2	Reação de oxidação	17
1.3	Hidrogéis e a reação de formação de Base de Schiff	19
1.4	Método de preparação de um suporte poroso por separação de fases seguido por congelamento e liofilização (<i>freeze-drying</i>)	22
1.5	Goma do cajueiro	23
1.6	Albumina Sérica Bovina (BSA)	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	METODOLOGIA	28
3.1	Materiais	28
3.2	Reação de oxidação da Goma do Cajueiro com periodato de sódio (NaIO₄)	28
3.2.1	<i>Reação de oxidação</i>	28
3.2.2	<i>Determinação do grau de oxidação</i>	29
3.2.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	30
3.2.4	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</i>	30
3.2.5	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	30
3.3	Preparação dos géis de GCO/GE	31
3.4	Caracterização dos géis de GCO/GE	31
3.4.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV</i>	31
3.4.2	<i>Porosidade</i>	31
3.4.3	<i>Ensaio de intumescimento</i>	32
3.5	Ensaio de liberação de BSA	32
3.6	Ensaio reológicos	33

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Caracterização da Goma do Cajueiro oxidada	34
4.1.1	<i>Reação de oxidação</i>	34
4.1.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	34
4.1.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</i>	36
4.1.4	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	38
4.2	Caracterização de Gelatina e dos géis de GCO/GE	39
4.2.1	<i>Infravermelho de Gelatina</i>	39
4.2.2	<i>Ensaio reológicos</i>	40
4.2.3	<i>Morfologia dos géis de GCO/GE</i>	42
4.2.4	<i>Porosidade</i>	45
4.2.5	<i>Ensaio de Intumescimento</i>	46
4.2.6	<i>Infravermelho dos géis de GCO/GE</i>	48
4.3	Liberção de BSA	49
5	CONCLUSÕES	51
6	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Todos os anos muitos pacientes sofrem a perda ou a insuficiência de um órgão ou tecido como resultado de acidentes ou doenças. Muitos estudos têm sido desenvolvidos para o reparo desses órgãos ou tecidos, utilizando conhecimentos da área de Engenharia de Tecidos. Ao final do ano de 2011, no Brasil, a fila de espera para transplante de órgãos era de 27827 pacientes, o que reforça a necessidade de estudo nessa área (ABTO, 2012). A Engenharia de Tecidos aplica os princípios e tecnologias das ciências da vida para construir um tecido biológico e reparar ou reconstruir a estrutura de tecidos e órgãos mantendo ou melhorando sua função (WU E COL., 2010). Para criar um tecido substitutivo vivo, um número pequeno de células pode idealmente ser colhido do paciente, usando uma técnica de biopsia, e cultivado em laboratório. Estas células podem ser expandidas em um suporte poroso (*scaffold*) natural na presença de fatores de crescimento e diferenciação (HENCH E COL., 2005). Na Engenharia de Tecidos os suportes porosos tem uma importante função desde que eles promovam o crescimento de células e tecidos (WU E COL., 2010).

Um suporte poroso ideal deve ser atóxico, biocompatível, possuir propriedades mecânicas adequadas, taxa de biodegradação igual a de regeneração do tecido e que os produtos dessa biodegradação não causem efeitos indesejados ao organismo (WU E COL., 2010).

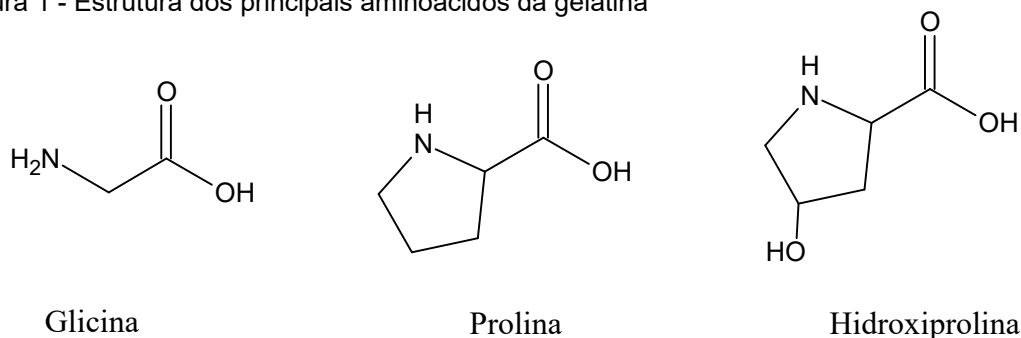
Suportes porosos de gelatina têm sido produzidos para emprego na regeneração de vários tipos de tecidos como, por exemplo, de cartilagem (TAN E COL., 2009), cartilagem articular (LIEN, KO E HUANG, 2010) e tecidos ósseos na reconstrução oral (MIRANDA E COL., 2011).

1.1 GELATINA

Gelatina (GE) é um polímero natural obtido pela hidrólise parcial do colágeno e é comumente utilizada para aplicações farmacêuticas e biomédicas por causa de sua biodegradabilidade e biocompatibilidade em meio fisiológico (SAKAI E COL., 2009). O colágeno e a gelatina contêm seqüências de $(\text{Gli-X-Y})_n$, em que n é aproximadamente 330 e X e Y, aproximadamente 30%, são Prolina e Hidroxiprolina, o restante são unidades de outros aminoácidos (PRYSTUPA E

DONALD, 1996). As estruturas dos principais aminoácidos podem ser vistas na Figura 1.

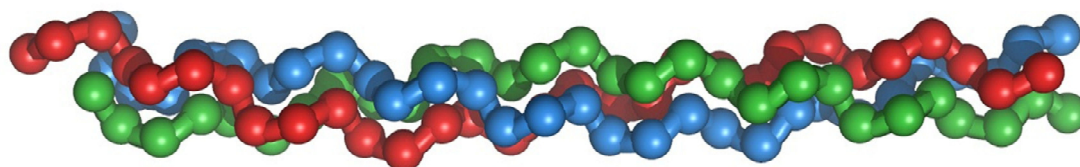
Figura 1 - Estrutura dos principais aminoácidos da gelatina



Fonte: Wikipédia - Aminoácidos, 2012.

A unidade fundamental do colágeno é chamada de tropocolágeno, formada de três moléculas polipeptídicas, arranjadas em forma de hélice (SEGTMAN E ISAKSSON, 2004). O colágeno apresenta propriedades que dão resistência e/ou elasticidade às estruturas em que ocorre, tem composição molecular relativamente simples e é insolúvel em água devido à alta quantidade de aminoácidos hidrofóbicos presentes tanto no interior como na superfície de sua estrutura. A hélice do colágeno é uma estrutura secundária única e característica desta proteína, ela é orientada à esquerda e formada pela repetição da seqüência tripeptídica, contendo três unidades por volta, que interagem por ligações de hidrogênio. A sua resistência mecânica é aumentada pelo enovelamento helicoidal de múltiplos segmentos em uma tripla-hélice (Figura 2) (estrutura terciária), similar a cordões enrolados entre si para formar uma corda mais resistente (LEHNINGER, NELSON, COX, 2000 E GUO E COL., 2003).

Figura 2 – Tripla hélice de colágeno



Fonte: Wikipédia – Colágeno, 2012.

A desnaturação (perda total da sua estrutura tridimensional) do colágeno para obtenção da gelatina normalmente é feita a partir do colágeno de pele ou osso

de boi e porco (ROKHADE, PATIL E AMINABHAVI, 2006). O grau de conversão do colágeno em gelatina está relacionado tanto ao pré-tratamento e processo de extração à quente em água, quanto ao pH, temperatura e tempo de extração. Dois tipos de gelatina são obtidos dependendo do processo de pré-tratamento e são conhecidos comercialmente como: gelatina do tipo A, normalmente preparada por tratamento ácido de pele de porco (1 a 2 dias), e o tipo B por tratamento de ossos ou pele de boi com hidróxido de cálcio por 1 a 3 meses. Durante a extração, ocorre hidrólise de asparagina a ácido asparagínico (ou aspártico) e de glutamina a ácido glutâmico. Isso ocorre em maior extensão sob condições alcalinas do que em condições ácidas. Dessa forma, o conteúdo de aminoácidos ácidos é maior no tipo B que no A, resultando em um baixo ponto isoelétrico normalmente pH 4,5 para o tipo B e pH 7,8 para A (GÓMEZ-GUILLÉN E COL., 2011 E HARRINGTON E MORRIS, 2009).

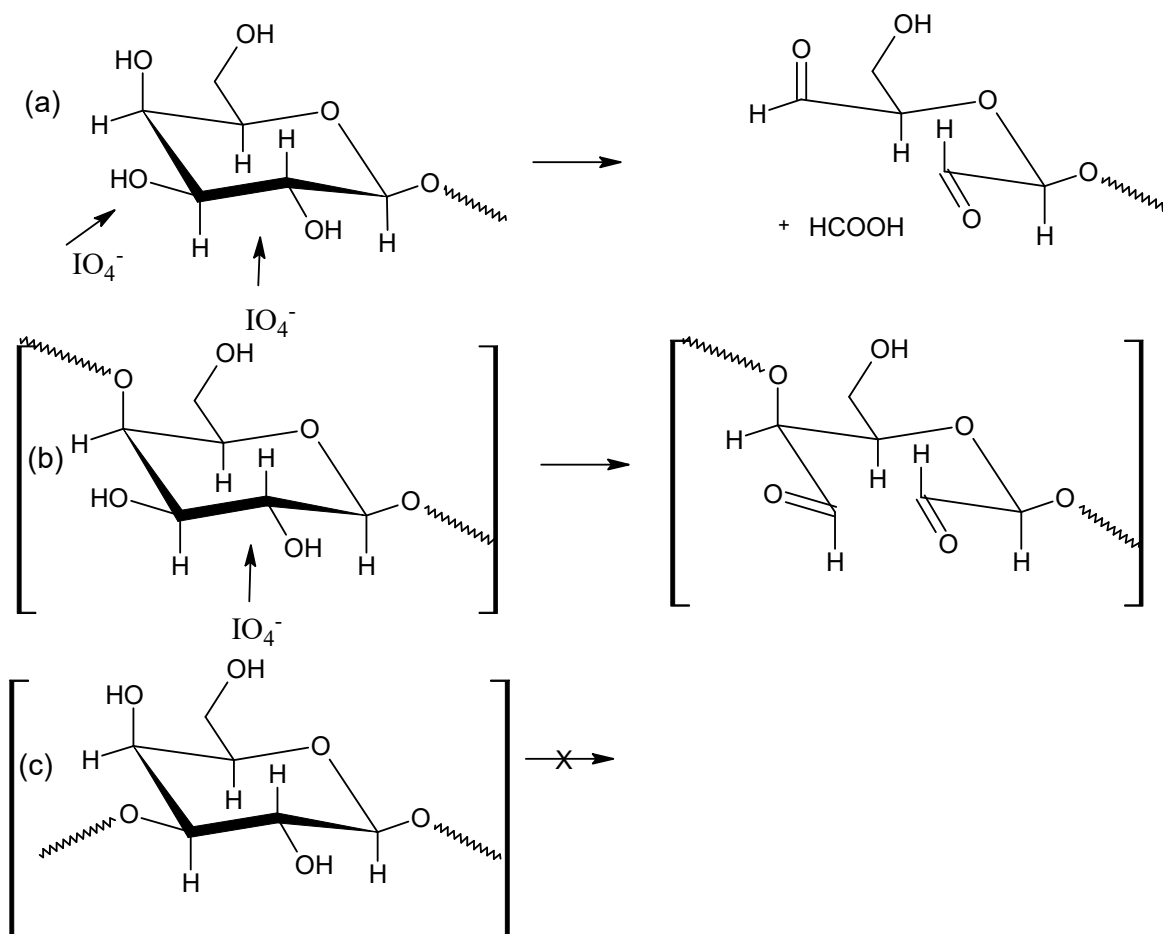
Hidrogéis de gelatina obtidos via geleificação termicamente induzida dissolvem-se rapidamente a temperatura do corpo humano e isso limita muito suas aplicações. Uma variedade de agentes reticulantes como glutaraldeído e carbodiimidaz tem sido investigada para evitar a dissolução (LEE E MOONEY, 2001). Suportes porosos de gelatina têm sido produzidos por reticulação com glutaraldeído (WU E COL., 2010), com genipina (LIEN, KO E HUANG, 2010), por adição de quitosana e glutaraldeído (MIRANDA E COL., 2011) e com ácido hialurônico reticulado com hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (ZHANG E COL., 2011). No entanto, a toxicidade desses agentes reticulantes é o maior obstáculo no uso desses hidrogéis como biomateriais. Reagentes com menor potencial tóxico como os mono, di e polissacarídeos oxidados (glucose, frutose, sucrose e dextrana) têm sido investigados como agentes reticulantes (CORTESI, NASTRUZZI E DAVIS, 1998, DRAYE E COL., 1998).

1.2 REAÇÃO DE OXIDAÇÃO

Oxidação de polissacarídeos com periodato de sódio é uma técnica simples que introduz múltiplos grupos funcionais aldeídicos, tornando os polissacarídeos capazes de atuar como um reticulador macromolecular para polímeros contendo grupos amino, como é o caso da gelatina (DRAYE E COL., 1998, JIA E COL., 2004).

Periodato oxida seletivamente as cadeias laterais do polissacarídeo, se a cadeia principal não possuir nenhuma hidroxila vicinal. Assim, quando na cadeia principal as unidades dos monossacarídeos são ligadas (1→3) a oxidação com periodato leva a introdução de grupamentos aldeídos nas cadeias laterais, sem degradação da cadeia principal. A Figura 3 mostra diferentes padrões de oxidação. Observa-se que a única unidade não-oxidada é a (c) devido às ligações glicosídicas nas posições 1 e 3 que não apresentam hidroxilas vicinais.

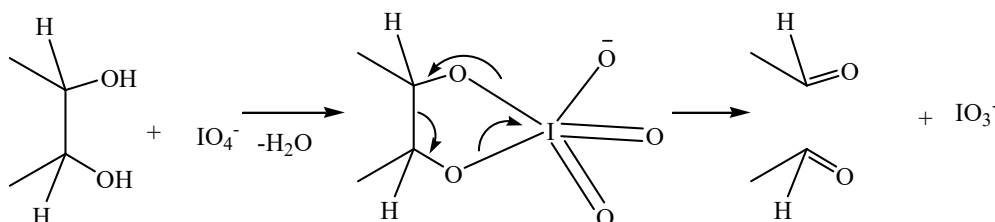
Figura 3 – Padrões de oxidação de polissacarídeos ilustrados pela reação com a unidade β -D-galp: (a) dupla oxidação entre C(2) e C(3) e entre C(3) e C(4), respectivamente com a liberação de C(3) como ácido fórmico, (b) unidades ligadas (1→4) onde a clivagem ocorre entre C(2) e C(3), (c) unidades ligadas (1→3) que são resistentes à oxidação. Baseado em KRISTIANSEN, POTTHAST E CHRISTENSEN (2010).



Fonte: Adaptado de KRISTIANSEN, POTTHAST E CHRISTENSEN (2010).

O íon IO_4^- degrada oxidativamente dióis vicinais a compostos carbonilados. A transformação ocorre por meio de um éster periodato cíclico, que se decompõe para dar dois grupos carbonila (VOLLHARDT E SCHORE, 2004). A Figura 4 mostra o mecanismo de oxidação com o íon periodato.

Figura 4 - Mecanismo de quebra de dióis vicinais (VOLLHARDT E SCHORE, 2004).



Fonte: VOLLHARDT E SCHORE (2004)

Polissacarídeos como a goma do cajueiro (DE PAULA, HEATLEY E BUDD, 1998) e escleroglucana (CHRISTENSEN, AASPRONG E STOKKE, 2001) apresentam hidroxilas vicinais nas cadeias laterais em suas estruturas. As ligações C(2) – C(3) e C(3) – C(4) do anel de glucose pode ser acessada por oxidação com periodato (AALMO E PAINTER, 1981).

Há a possibilidade de oxidação em uma unidade já oxidada, o que leva a uma dupla oxidação, e é por isso que em muitos casos o grau de oxidação teórico não é igual ao real (KRISTIANSEN, POTTHAST E CHRISTENSEN, 2010).

A análise do consumo de periodato possibilita a determinação da extensão de unidades oxidadas. O controle da estequiometria periodato/polissacarídeo pode produzir materiais com diferentes graus de oxidação.

A oxidação com periodato de sódio da goma arábica foi proposta recentemente na preparação de um carreador de fármaco, o qual interage diretamente com este através da formação da base de Schiff, reação entre os grupamentos amino do fármaco e os grupos aldeído da goma. Diferentes perfis de liberação do fármaco são obtidos e podem ser controlados pelo grau de oxidação da goma (NISHI E JAYAKRISHNAN, 2004, NISHI E JAYAKRISHNAN, 2007).

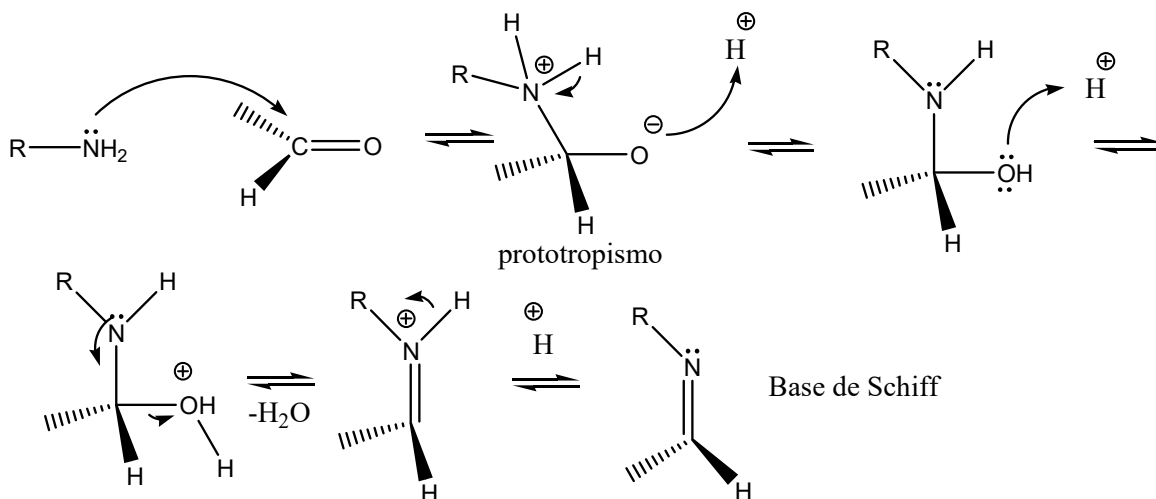
1.3 HIDROGÉIS E A REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BASE DE SCHIFF

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais capazes de absorver água ou fluidos biológicos, sem dissolver, como resultado de uma reticulação (Peppas e col., 2000).

Hidrogéis do tipo HPN (*hybrid polymeric network – redes poliméricas híbridas*) são obtidos quando grupos funcionais presentes nos dois polímeros reagem formando pontos de reticulação sem a necessidade da adição de um agente reticulante como, por exemplo, a formação de Base de Schiff entre um grupo amino e um grupo aldeído (Bae e Kim, 1993).

Em contato com aminas, os aldeídos formam hemiaminais, os análogos nitrogenados dos hemiacetais. Os hemiaminais de aminas primárias perdem água facilmente para formar uma ligação dupla carbono-nitrogênio. Esta função é chamada de imina (Base de Schiff) (VOLLHARDT E SCHORE, 2004). A Figura 5 mostra a formação de uma Base de Schiff a partir de uma amina e um aldeído.

Figura 5 – Formação de Base de Schiff a partir de uma amina e um aldeído (VOLLHARDT E SCHORE, 2004).



Fonte: VOLLHARDT E SCHORE (2004)

Quando um polissacarídeo oxidado, ou seja, aldeído funcionalizado, interage com gelatina, formam-se hidrogéis com pontos de reticulação via base de Schiff (YU E XIAO, 2008). A Figura 6 representa um esquema da interação dos grupos amino de gelatina com os aldeídos de um polissacarídeo oxidado.

Recentemente hidrogéis preparados pela interação da gelatina com a goma oxidada Konjac foram testados quanto à capacidade de liberação de ketoprofeno *in vitro*, e mostrou que a taxa de liberação pode ser controlada por variação da razão goma oxidada/gelatina, o que segundo os autores (YU E XIAO, 2008) oferece uma nova possibilidade para preparação de matrizes à base de gelatina, quando comparadas à preparação tradicional com aplicação de reticulantes de baixa massa molar. Os hidrogéis de dextrana oxidada com gelatina têm sido investigados como um curativo para liberação de fatores de regeneração de tecidos (SCHACHT E COL., 1997; FANG, TAKAHASHI E NISHINARI 2005).

Hidrogel é um material adequado para a manufatura de um suporte poroso, pois sua estrutura é similar à matriz extracelular de muitos tecidos e pode ainda ser utilizado para a liberação de moléculas bioativas de forma minimamente invasiva (DRURY E MOONEY, 2003). A obtenção de um material poroso, necessário para a produção do suporte normalmente é feita pelo método de congelamento seguido por liofilização do hidrogel (*freeze-drying*) (WHANG, THOMAS E HEALY, 1995). Hidrogéis de polímeros naturais têm sido produzidos como, por exemplo, de hidroxiapatita/quitosana-gelatina (HAN E COL., 2010), sulfato de condroitina (DAWLEE E COL., 2005), esquizofilano (FANG, TAKAHASHI E NISHINARI, 2005) e de gelatina (WU E COL., 2010).

1.4 MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM SUPORTE POROSO POR SEPARAÇÃO DE FASES SEGUIDO POR CONGELAMENTO E LIOFILIZAÇÃO (FREEZE DRYING)

Muitas técnicas de produção de suportes porosos a partir de biomateriais têm sido estudadas. Entre elas estão: fabricação de sólido em forma livre (CALVERT, O'KELLY E SOUVIGNIER 1998), moldagem causada por solubilização de particulados (CHEN E BADYLAK, 2001), separação de fases/emulsão congelada e em seguida liofilizada para manufatura de suportes porosos (WHANG, THOMAS E HEALY, 1995).

Dentre essas técnicas, uma bastante atrativa é a separação de fases. Esta se baseia no fato de que um sistema homogêneo de multicomponentes como uma emulsão polímero-água, pode se tornar termodinamicamente instável e separar de acordo com a situação de mais baixa energia livre. O sistema é então congelado

formando uma fase mais rica em polímero e a outra em solvente. Depois que o solvente é removido (via liofilização), o espaço originalmente ocupado por este se torna poro, dessa forma um suporte poroso é formado (LIU, XIA E CZERNUSZKA, 2007). Em geral a técnica se utiliza de solventes orgânicos para criar poros no interior do suporte, a remoção do solvente se torna um problema e se torna uma potencial fonte de toxicidade para as células. Um solvente atóxico como a água evita o uso de solventes tóxicos na fabricação de suportes, sendo portanto mais adequado.

No caso de goma do cajueiro (GC) a reação é de formação de uma base de Schiff entre o grupo amino da GE e o grupo aldeído da goma do cajueiro oxidada (GCO). Forma-se um hidrogel que é solidificado por congelamento, deixando moléculas de água na forma de cristais de gelo no interior da rede polimérica formada. Quando o hidrogel é liofilizado, os cristais de gelo sublimam formando uma estrutura de suporte porosa.

1.5 GOMA DO CAJUEIRO

A goma do cajueiro (GC) é um polissacarídeo exsudato da árvore cajueiro (*Anacardium occidentale*), que é considerada uma planta de porte alto (6 a 12 metros). Foi utilizada para florestamento e há registro de uso como árvore ornamental e para sombreamento. É originária da América Tropical e suas explorações comerciais restringiram-se à Índia, Brasil, Moçambique, Quênia e Tanzânia. O cultivo de caju ocupa uma área de 551842 ha e aproximadamente 98% desta área encontra-se no nordeste, abrangendo os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (PESSOA, LEITE E PIMENTEL, 1995).

O principal produto do cajueiro é a sua castanha, mas existe potencial para a exploração da goma exsudada do cajueiro (DE PAULA, HEATLEY E BUDD 1998). A média de produção de goma/árvore/ano é 700 g (BANDEIRA, 1991), com um potencial de produção anual da goma de até 38 mil toneladas.

O Grupo de Polímeros – UFC tem estudado essa goma desde 1993 (RODRIGUES, DE PAULA E COSTA, 1993). A goma extraída de árvores do nordeste brasileiro foi caracterizada como um heteropolissacarídeo contendo β -D-galactose (72-73%), α -D-glucose (11-14%), arabinose (4,6-5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glucurônico (4,7-6,3%) em porcentagem de massa (DE PAULA, HEATLEY

A pesquisa dentro do grupo de polímeros – UFC e colaborações com outros grupos de pesquisa no Brasil permitiram outras propostas de trabalho com a goma do cajueiro: modificação por carboximetilação com ácido monocloroacético como agente esterificante (SILVA E COL., 2004) e oxidação utilizando TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) como agente oxidante (CUNHA E COL., 2007); copolimerização via enxertia com acrilamida (SILVA, DE PAULA E FEITOSA (2007); interações com quitosana em estudos de cinética de intumescimento (PAULA, GOMES E DE PAULA, 2002), na liberação de fármacos (MACIEL E COL., 2006; MAGALHÃES JR E COL., 2009) e de larvicidas (PAULA, DE PAULA E BEZERRA, 2006), estudo da degradação térmica de complexos polieletrólíticos (MACIEL E COL., 2005), estudo da formação de filmes finos (MACIEL E COL., 2007), modificações na goma do cajueiro e interação com gelatina para produção de microesferas (MOURA NETO, E.) e preparação de hidrogéis superabsorventes para o condicionamento do solo (GUILHERME E COL.,2005; SILVA, 2006).

Devido a sua estrutura, a GC apresenta potencial para preparação de um polialdeído, o qual manterá a estrutura da cadeia principal.

A liberação de substâncias através de biomateriais vem sendo bastante estudada. A albumina sérica bovina (BSA) está entre estas substâncias já que é uma molécula bastante estável e possui um alto peso molecular.

1.6 ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

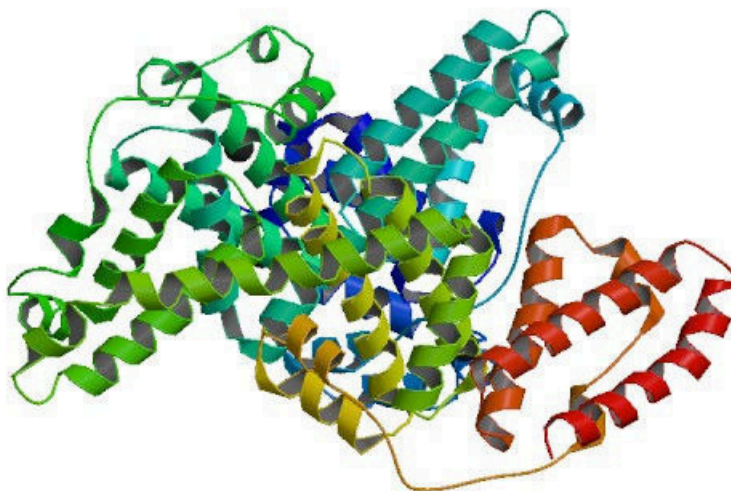
A Albumina Sérica Bovina (BSA) (Figura 9) é a proteína mais abundante e corresponde a 60% no plasma sanguíneo, serve como depósito, assim como transporte de proteína para numerosos componentes, como cadeia longa de ácidos graxos, ligados por alta afinidade à proteína. A estrutura secundária da albumina bovina contém muitos resíduos de cistina e estes são helicoidais em grande parte da cadeia. Apresenta fácil isolamento em grandes quantidades, favorecendo sua alta estabilidade e solubilidade. É a principal proteína que contribui para a pressão coloidal osmótica do sangue e também para o transporte de proteínas para numerosos compostos endógenos e exógenos (TATTINI, PARRA E PITOMBO, 2006).

A maioria das proteínas apresenta absorção no UV em torno de 280 nm devido à presença dos resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina, que são

aminoácidos aromáticos. A BSA apresenta 27 resíduos de fenilalanina, 20 de tirosina e 2 de triptofano (RONGXIN E COL., 2008)

BSA é normalmente utilizada como molécula modelo na cinética de liberação de fármacos em hidrogéis, por ser uma molécula estável e possuir um alto peso molecular (NADDAF E COL., 2010).

Figura 9 – Albumina Sérica Bovina (BSA) (estrutura cristalina).



Fonte: Wikipédia – BSA, 2012.

A abordagem desse trabalho está relacionada com a oxidação de GC por periodato de sódio para a produção de um polialdeído (Goma do cajueiro oxidada – GCO) que interage com um polímero abundante em grupos amino, como é o caso da Gelatina, produzindo um hidrogel de GCO/GE que após liofilizado leva a obtenção de uma estrutura porosa que é usada para liberar BSA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Preparar e caracterizar suportes porosos a base de géis de gelatina/goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) oxidada.

2.2. Objetivos específicos

- a) Modificar a goma do cajueiro (GC) por oxidação com periodato de sódio (NaIO_4) via quebra oxidativa de dióis vicinais em diferentes razões de periodato.
- b) Caracterizar os derivados oxidados obtidos por meio de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia de permeação em gel (GPC).
- c) Sintetizar suportes porosos a partir de géis de gelatina/goma do cajueiro oxidada (GE/GCO) com GCO de diferentes graus de oxidação aplicando o método de congelamento seguido por liofilização.
- d) Acompanhar o processo de formação do gel de GE/GCO por reologia variando a temperatura.
- e) Caracterizar os suportes porosos obtidos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), ensaio de intumescimento, porosidade por infiltração de etanol.
- f) Realizar a liberação de BSA através de suportes porosos de diferentes graus de oxidação de GCO.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

O exsudato bruto do cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi fornecido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Ceará, em 2004. A goma do cajueiro (GC) foi obtida isolando o exsudato pelo método descrito por RODRIGUES, DE PAULA E COSTA (1993). A gelatina de pele suína tipo A e Bloom 300 e Soro albumina Bovina (BSA) são oriundas da Sigma-Aldrich, periodato de sódio (NaIO_4) e todos os outros reagentes da Vetec. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos sem purificação adicional.

3.2 REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO COM PERIODATO DE SÓDIO (NaIO_4)

3.2.1 REAÇÃO DE OXIDAÇÃO

Segundo GOMEZ, RINAUDO E VILLAR (2007) com modificações goma do cajueiro isolada foi dissolvida em água, (3 g/162 g/mol que correspondem a $1,85 \times 10^{-2}$ mol de unidades glicosídicas) e deixada sob agitação por 24 h, após completa dissolução, volumes distintos de solução de NaIO_4 0,5 mol/L (7,4, 18,5 e 29,6 mL) foram adicionados lentamente com o objetivo de obter derivados oxidados de goma do cajueiro nos graus de 20, 50 e 80% nomeados como GCO2, GCO5 e GCO8, respectivamente. A mistura reacional foi deixada por 24 h à temperatura ambiente e no escuro. Ao final desse tempo uma alíquota de 3 mL foi retirada para determinação do grau de oxidação e em seguida adicionado etilenoglicol ao restante da mistura para parar a reação.

As soluções de GCO obtidas foram dialisadas contra água destilada em membrana de celulose até que a condutividade da água de diálise fosse igual a da água destilada e posteriormente as soluções foram liofilizadas. Os dados reacionais da oxidação de GC com NaIO_4 podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados reacionais da goma do cajueiro com periodato de sódio à temperatura ambiente.

Amostra	NaIO ₄ adicionado (mol)	NaIO ₄ consumido (mol)	% de unidades monossacarídicas oxidadas	rendimento final da reação (% em massa)
GCO2	3,7x10 ⁻³	3,2x10 ⁻³	17	84 ± 1,2
GCO5	9,3x10 ⁻³	8,5x10 ⁻³	46	84 ± 1,4
GCO8	1,5x10 ⁻²	1,3x10 ⁻²	71	83 ± 0,6

3.2.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO

O grau de oxidação da goma do cajueiro foi determinado por espectroscopia de absorção na região do UV-VIS, como descrito por GOMEZ, RINAUDO E VILLAR (2007). Utiliza-se um indicador preparado com volumes iguais de soluções de KI 20% m/v e amido 1% m/v dissolvidos em tampão fosfato pH=7,4 (0,077 mol/L). Dilui-se 1,0 mL da solução reacional (alíquota), retirada antes da introdução de etilenoglicol, para 100 mL com água destilada. Dessa retira-se 1,0 mL, mistura-se com 1,5 mL do indicador e completa-se o volume para 10 mL com água destilada.

Indicador: I⁻ + amido

Indicador + alíquota: IO₄⁻ + 2I⁻ + 2H⁺ → IO₃⁻ + I₂ + H₂O

IO₃⁻ + 5I⁻ + 6H⁺ → 3I₂ + 3H₂O

I₂ + I⁻ → I₃⁻

I₃⁻ + amido → [amido-I₃⁻] complexo

O complexo formado foi analisado em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu em 486 nm. A diferença entre a quantidade inicial e final de periodato corresponde à quantidade de grupos hidroxilas transformados em grupamento aldeído (GOMEZ, RINAUDO E VILLAR, 2007).

A curva padrão do íon periodato foi utilizada para calcular a concentração de NaIO₄ não consumido durante a oxidação, soluções de concentração de 1,6x10⁻⁵, 2,0 x10⁻⁵, 2,4 x10⁻⁵, 2,8 x10⁻⁵ e 3,1x10⁻⁵ mol/L, foram utilizadas para preparar a curva padrão, obtendo uma relação linear, r² = 0,999 e a equação 1:

$$\text{ABS} = -0,07912 + 2,6 \times 10^4 \times [\text{IO}_4^-] \quad \text{Equação 1}$$

em que ABS é a absorbância medida em $\lambda = 486 \text{ nm}$ e [IO₄⁻] é a concentração do íon periodato em mol/L.

3.2.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro modelo 8300 da Shimadzu entre 400 e 4000 cm^{-1} .

3.2.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

O espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (Broad Band) de soluções das amostras ($\sim 2,5\%$ m/v) em D_2O foi obtido em equipamento Bruker Modelo Avance DRX500, com controle de temperatura, a 70°C .

3.2.5 CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC)

O volume de eluição (V_e) foi determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC) em cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-6A, coluna PolySep-GCF-P linear 7,8 x 300 mm, com fase móvel de NaNO_3 0,1 mol/L, fluxo de 0,5 mL/min e o volume de amostra foi de 50 μL . As amostras foram preparadas na concentração de 0,1% m/v e filtradas em membrana MILLIPORE 0,45 μm . As massas molares foram estimadas pela curva padrão de pululana que foi obtida com massas molares no intervalo de $5,9 \times 10^3$ a $7,8 \times 10^5$ g/mol.

3.3 PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE GCO/GE

Foram preparadas soluções aquosas GCO2, GCO5 e GCO8 na concentração de 5% (m/v) e deixadas sob agitação durante 24 h. Solução de gelatina (GE) 5% (m/v) usando tampão fosfato pH 7,4 como solvente foi preparada intumescendo primeiramente o sólido por 5 min à temperatura ambiente e, então, levada para agitação a 50° C por 30 min. As soluções de GE e de GCO permaneceram a 50° C e em seguida foram misturadas pipetando-se 1 mL de GE sobre 1 mL de GCO em um frasco cilíndrico de 2,5 cm de diâmetro. Os frascos foram deixados à temperatura ambiente por 1 h e, em seguida mantidos a -80 °C em um Ultra freezer da Nuair por 24 h e por fim a mistura foi liofilizada no frasco cilíndrico.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE GCO/GE

3.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

Os géis secos obtidos foram cobertos com platina e suas superfícies foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura XL30 – Phillips.

3.4.2 POROSIDADE

O volume dos géis secos (V_s) foi obtido a partir dos dados de comprimento, largura e altura medidos com paquímetro digital de 0 a 150 mm - Digital caliper marca COSA. O volume dos poros V_p foi calculado pelo método de infiltração do etanol (Tan e col., 2009). Os géis secos foram pesados (M_s) e em seguida foram mergulhados em etanol por 15 min. a temperatura ambiente de 25°C. O sistema foi mantido por 15 min em dessecador sob pressão reduzida para remover bolhas de ar. Na sequência as superfícies foram secas em papel de filtro e os géis pesados imediatamente (M_e). V_p foi definido como $(M_e - M_s)/\rho_e$ (equação 2), em que ρ_e (0,803 g.mL⁻¹) representa a densidade do etanol a temperatura ambiente de 25°C. A porosidade foi calculada de acordo com $P = V_p/V_s \times 100\%$ (equação 3) (Tan e col., 2009).

$$Vp = \frac{(Me - Ms)}{\rho e} \quad \text{Equação 2}$$

$$P = \frac{Vp}{Vs} \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

3.4.3 ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO

Foram realizados ensaios de intumescimento dos géis em tampão fosfato pH 7,4 e temperatura ambiente. Os géis secos e pesados (M_s) foram imersos em solução tampão pH 7,4 e, na primeira hora, foram retirados em intervalos de 20 min, as superfícies dos géis intumescidos foram secas com papel de filtro e a sua massa medida (M_u). Na segunda hora, o intervalo aplicado foi de 30 min e depois de 60 min até a quinta hora, durante o primeiro dia. O acompanhamento continuou sendo feito por 14 dias, a cada dia foi realizada uma pesagem. A porcentagem de intumescimento foi obtida pela equação 4:

$$\text{Intumescimento \%} = [(M_u - M_s)/M_s] \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

3.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE BSA

Os géis para liberação de BSA foram preparados utilizando o mesmo procedimento do item 3.3, com a diferença que BSA foi dissolvido na solução de GE para obter a concentração de 20 g/L.

Os géis foram imersos em 30 mL de tampão fosfato pH 7,4 à temperatura constante de 37 °C sob agitação de 50 rpm. Alíquotas de 3 mL foram retiradas para análise em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu a 280 nm em intervalos de 30 min até as duas primeiras horas, seguido por intervalos de 60 min até a quinta hora durante o primeiro dia. Durante treze dias foi retirada uma alíquota por dia. A concentração de BSA foi encontrada a partir da equação 5:

$$\text{ABS} = 0,00977 + 578,793[\text{BSA}] \quad \text{Equação 5}$$

$$r^2 = 0,999$$

em que ABS é a absorbância, [BSA] é a concentração de BSA em g/mL e r^2 o coeficiente de correlação linear.

3.6 ENSAIOS REOLÓGICOS

Os ensaios reológicos foram realizados para os géis como descrito no ítem 3.3. No entanto, os ensaios reológicos foram feitos 5 min após a mistura das soluções em reômetro AR 550 da TA Instruments com geometria cone-placa (diâmetro 40 mm) à frequência de 6 Pa e 0,1 Hz (dados estes previamente escolhidos através de testes em rampa de tensão e rampa frequência).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO OXIDADA

4.1.1 REAÇÃO DE OXIDAÇÃO

Periodato de sódio cliva especificamente glicóis vicinais para formar derivados dialdeídicos. Cada α -glicol consome uma molécula de periodato (MAIA E COL., 2005; WENG, CHEN E CHEN, 2005; TIZIANI, SUSSICH E CÉSARO, 2003). Como pode ser visto na Tabela 1 (vide página 29), a razão entre o quanto foi consumido e o quanto foi adicionado revela que foi consumido 86, 91 e 87 % para GCO2, GCO5 e GCO8, respectivamente. Os resultados mostram que houve um aumento do consumo e depois uma diminuição. Foi encontrado para o consumo de periodato na oxidação de alginato de sódio que quanto maior a quantidade de periodato utilizada menor o consumo (GOMEZ, RINAUDO E VILLAR, 2007). O rendimento final da reação foi de $84 \pm 1\%$, que é maior quando comparado à oxidação de goma konjac que teve o rendimento de 72% (YU E XIAO, 2008) e menor quando comparado a oxidação de GC com o reagente TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) que foi de 96% (CUNHA E COL., 2007).

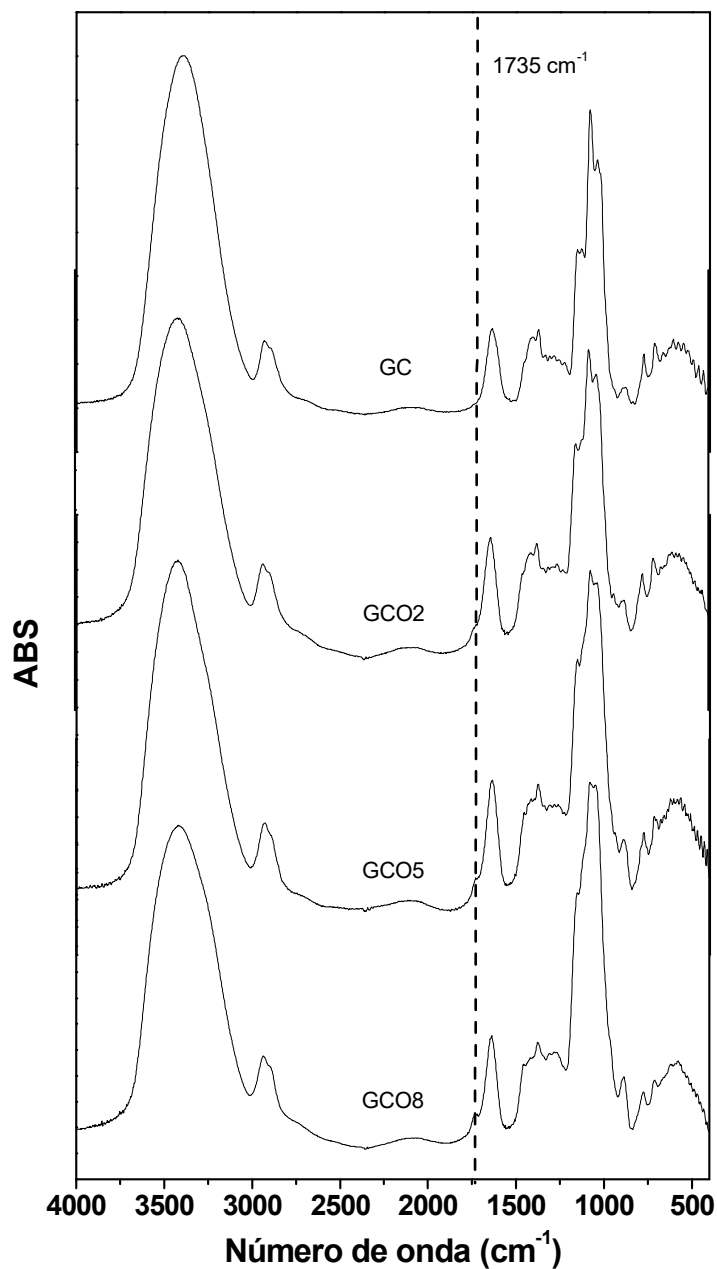
4.1.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

Os espectros da goma do cajueiro e dos derivados oxidados com periodato de sódio (GCO) são mostrados na Figura 10. O espectro de GC e dos derivados GCO apresentam bandas muito similares como a de 3700 a 3000 cm^{-1} (vibração de estiramento O-H), em 2900 cm^{-1} (atribuída à vibração de estiramento simétrico e assimétrico de C-H), 1415 cm^{-1} (estiramento O-H) e 1200 - 800 cm^{-1} (vibrações de estiramento C-O e C-C do hexapiranosil). A absorção em 1649 cm^{-1} é devida a vibração de O-H de moléculas de água da umidade do polissacarídeo (BUENO, 1990). As bandas em 1150 , 1080 e 1030 cm^{-1} são referentes ao estiramento de C-O-C e deformação dos grupos O-H das unidades glicosídicas.

Nos espectros dos derivados oxidados GCO5 e GCO8 é observado o aparecimento de uma nova banda, em relação à GC e GCO2, em 1735 cm^{-1}

atribuída a vibração de estiramento da ligação C=O de aldeído, o que evidencia a oxidação (WU E COL., 2012, FUJISAWA E COL., 2011).

Figura 10 – Espectros de infravermelho de GC e seus derivados oxidados GCO2, GCO5 e GCO8.



4.1.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

No espectro de ressonância magnética nuclear de próton ^1H da GC (Figura 11), os sinais em δ 4,87; δ 4,69; e δ 4,5 são atribuídos a H-1 da galactose (1 \rightarrow 3) segundo DE PAULA, HEATLEY E BUDD (1998). Os sinais de anoméricos da glucose e ramnose foram observados em δ 4,95 e δ 4,81; respectivamente. Observa-se que os derivados oxidados também apresentam esses sinais, com apenas uma diferença de intensidade relativa aos sinais das unidades de galactose (1 \rightarrow 3), o que mostra que a cadeia principal não sofre degradação com a oxidação.

Os sinais em δ 5,6 e δ 5,7 correspondem a um hemiacetal intra-residual formado entre um grupo aldeído e grupos hidroxilas vizinhos (como exemplificado na Figura 12). Novos sinais de deslocamento químico na região maior que δ 5,0 (característicos de prótons anoméricos) foram observados na oxidação de alginato de sódio com periodato de sódio (GOMEZ, RINAUDO E VILLAR, 2007). Pode-se observar no espectro de RMN ^1H dos derivados oxidados em relação ao de GC, uma diminuição da intensidade do sinal de CH_3 da ramnose (δ 1,3) e um desdobramento deste sinal, sugerindo que a oxidação pode ter acontecido, também, neste monossacarídeo.

Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H de GC e dos derivados oxidados

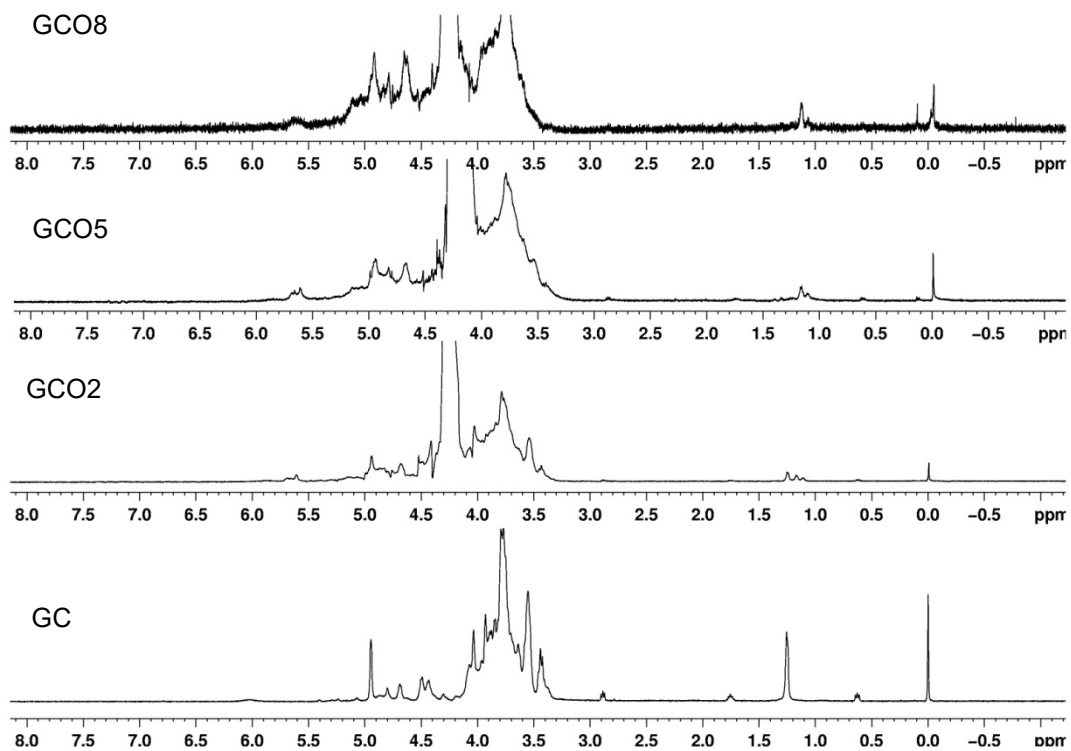
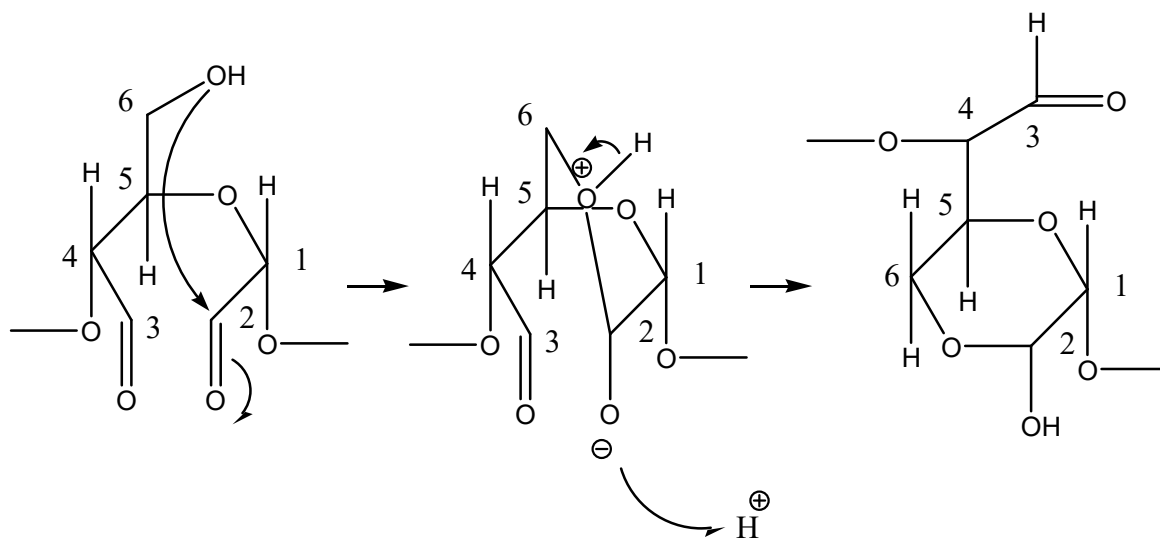


Figura 12 - Formação de um hemiacetal intra-residual baseado em BRUNEEL E SCHACHT (1993).



Fonte: BRUNEEL E SCHACHT (1993)

4.1.4 CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

A Figura 13 mostra os cromatogramas de GPC para a GC e os derivados oxidados GCO2, GCO5 e GCO8. Os valores obtidos para o volume de eluição V_e e de massa molar de pico (M_{pk}) encontram-se na Tabela 2.

Figura 13 – Cromatograma de soluções aquosas 0,1% m/v de GC e seus derivados oxidados GCO2, GCO5 e GCO8.

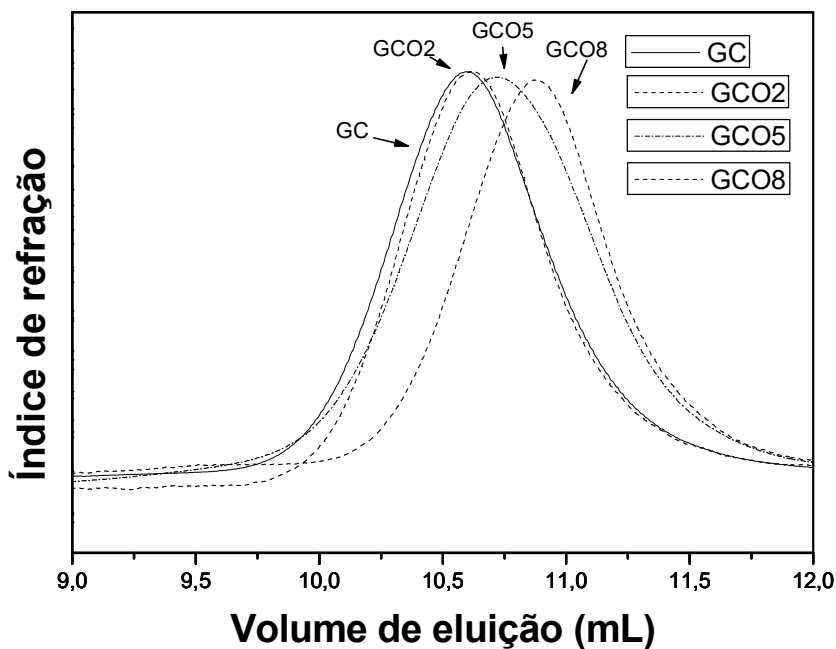


Tabela 2 – Caracterização de GC modificada por oxidação com NaIO_4 .

Amostra	V_e (mL)	M_{pk} (g/mol)
GC	10,59	$1,98 \times 10^4$
GCO2	10,61	$1,89 \times 10^4$
GCO5	10,71	$1,50 \times 10^4$
GCO8	10,87	$1,03 \times 10^4$

A massa molar de pico (M_{pk}) diminui com o aumento do grau de oxidação de GC. Este fato pode ser atribuído à degradação do polissacarídeo, causada pela oxidação que depende diretamente da quantidade de periodato de sódio em solução. Resultados semelhantes foram encontrados para oxidação de alginato de sódio (GOMEZ, RINAUDO E VILLAR, 2007) e de dextrana (MAIA E COL., 2005).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE GELATINA E DOS GÉIS DE GCO/GE

4.2.1 INFRAVERMELHO DE GELATINA

No espectro de Gelatina as absorções observadas (Figura 14) foram comparadas às atribuídas segundo WANG E COL. (2007) e BACHMANN, GOMES E ZECELL (2005) para o colágeno e resumidas na Tabela 3. MUYONGA, COLE E DUODU (2004) afirmam que após a desnaturação (gelatina) observa-se uma redução na intensidade dos picos das amidas A, I, II e III em relação ao colágeno.

Figura 14 – Espectro de infravermelho de gelatina

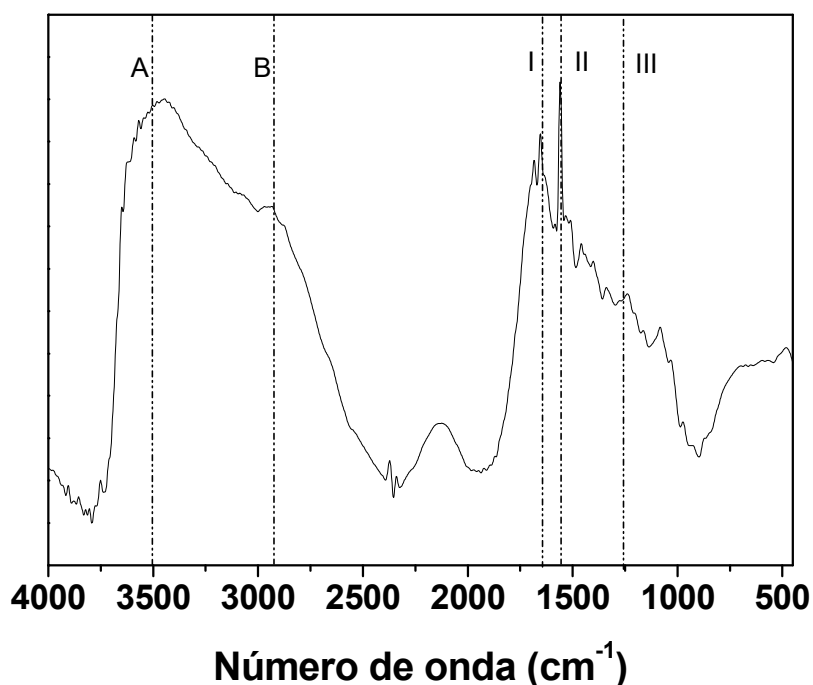


Tabela 3 - Atribuições das absorções no espectro na região do infravermelho.

Região	Número de Onda (cm ⁻¹)		Atribuição
	Colágeno	Gelatina	
Amida A	3425	3439	Estiramento N–H, acoplado com LH*
Amida B	2935	2927	Estiramento assimétrico de CH ₂
Amida I	1658	1651	Estiramento C=O/ligação de H acoplado com COO ⁻

Amida II	1552	1556	Deformação N–H acoplada com estiramento C–N
–	1454	1456	Deformação C–H (CH ₂)
–	1406	1408	Estiramento COO ⁻
–	1338	1332	Deformação C–H (CH ₂)
Amida III	1281 - 1240	1263	Deformação N–H acoplada com estiramento C–N
–	1083	1082	Estiramento C–O
–	568	596	Estiramento do esqueleto

– Não há nome comum para região espectral.

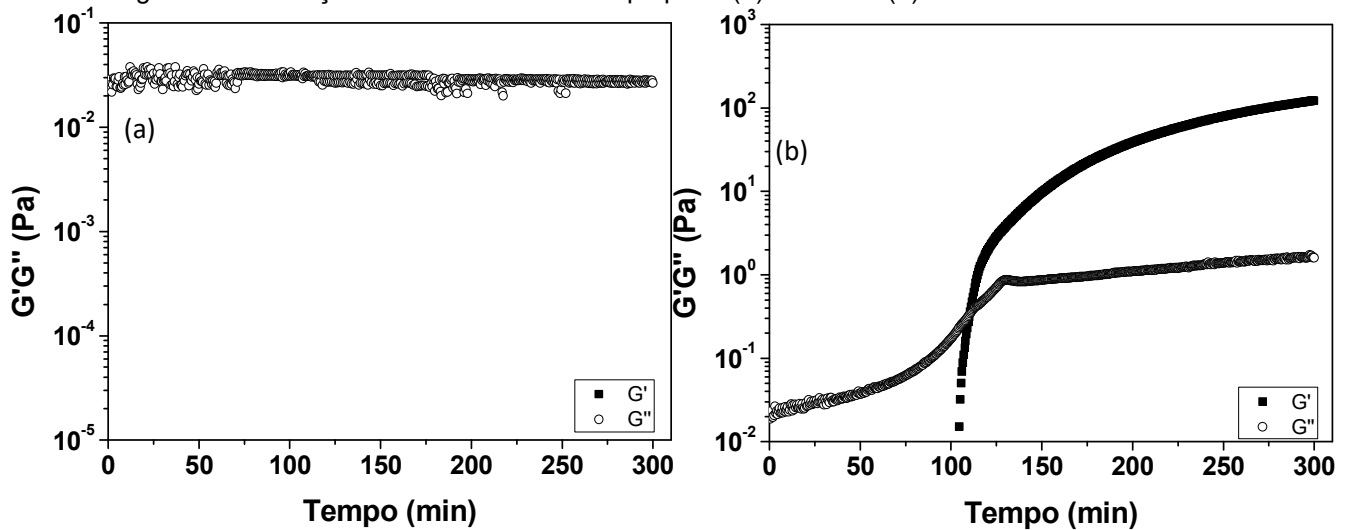
*LH = Ligação de hidrogênio

4.2.2 ENSAIOS REOLÓGICOS

Com o intuito de verificar a influência da oxidação de Goma do Cajueiro na formação dos géis de GCO/GE, foi realizado um ensaio reológico com um gel de Goma do Cajueiro não modificada com GE e outro de GCO₂/GE. A Figura 15 mostra a variação do módulo de armazenamento G' e do módulo de perda G'' com o tempo.

Para GC não modificada observa-se que G'' é maior durante todo o intervalo de 5 h, ou seja, o gel formado é um líquido viscoso. Por outro lado para GCO₂/GE os valores de G' são maiores que G'' em t = 110 min e ao final de 5 h forma um gel bastante firme (para o tratamento logarítmico G' não aparece quando seus valores são negativos). Esse resultado pode ser explicado pela formação de Base de Schiff entre os grupos amino de GE e os grupos aldeídicos presentes em GCO e ausentes em GC.

Figura 15 – Variação de G' e G'' com o tempo para: (a) GC/GE e (b) GCO2/GE.



A Figura 16 mostra o comportamento da geleificação de géis GCO/GE a $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$. De uma maneira geral o módulo de perda G'' aumenta junto com o módulo de armazenamento G' em todos os ensaios. A posição na qual G' cruza G'' é conhecida como “crossover”. De acordo com a Tabela 4 com o aumento da temperatura o tempo de “crossover” diminui indicando que o gel é formado mais rapidamente a temperaturas mais altas. Da mesma forma comparando-se diferentes graus de oxidação, quanto maior o grau de oxidação mais rapidamente G' cruza G'' , pois existem mais grupos aldeídicos para formar base de Schiff. Os valores de E_a , a energia de ativação, para os géis GCO/GE diminuem com o aumento do grau de oxidação de GCO, indicando que a reação é mais favorável para géis com maior grau de oxidação de GCO.

Figura 16 – Em (a) comportamento típico de um processo de geleificação de GCO/GE com GCO5 e $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$. $(\Delta G'/\Delta t)$ é a inclinação da reta de G' sobre o tempo t . Em (b) o tratamento de Arrhenius da taxa de geleificação $(\Delta G'/\Delta t)$ contra $1/T$ para géis GCO/GE com diferentes graus de oxidação.

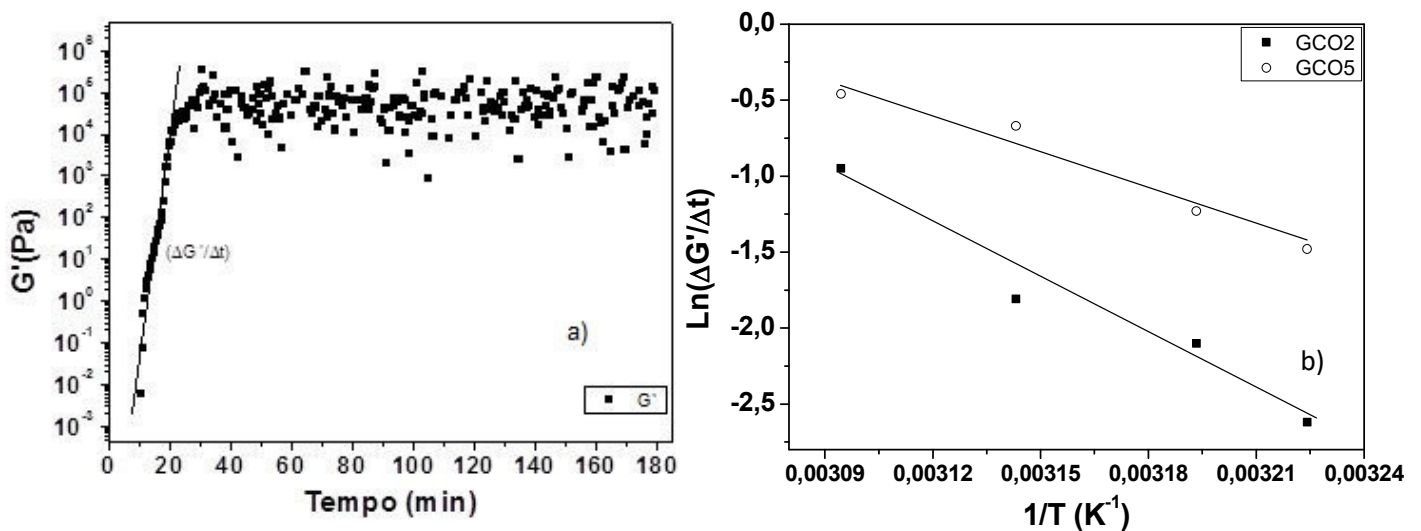


Tabela 4 – Tempo de “CROSSOVER” para os sistemas GCO/GE a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	GCO2/GE	GCO5/GE	GCO8/GE
	Tempo (min)	Tempo (min)	Tempo (min)
37	91,7	14,9	4,7
40	75,4	12,0	0,4
45	40,4	7,2	-*
50	23,0	3,7	-
Ea (kJ.mol ⁻¹)	99,98	71,07	-*

* Para os ensaios acima de 45 °C para GCO8/GE não foi possível verificar um tempo de crossover, pois este acontece muito rápido, antes que o aparelho possa detectar. Não foi possível calcular a Ea para o sistema GCO8/GE seria necessária a utilização da geometria placa-paralela, porque os géis são muito rígidos.

4.2.3 MORFOLOGIA DOS GÉIS DE GCO/GE

Suportes porosos a partir de géis de GCO/GE foram obtidos pelo método de congelamento e secagem por liofilização (*freeze-drying*). Para efeito de comparação um gel de gelatina foi preparado nas mesmas condições de GCO/GE, o qual foi denominado como branco. Fotografias digitais são mostradas na Figura 17. A lateral e a superfície inferior tomaram a forma do tubo cilíndrico e pode ser observada a coloração amarelada em GCO/GE que é relativa a formação de Base de Schiff já que em géis preparados com somente GE não se apresenta esta coloração. O diâmetro médio dos géis foi de 2,3 cm e altura de 0,3 cm. A Tabela 5 sumariza os raios e alturas médias, os quais foram utilizados para o cálculo de porosidade discutida no ítem 4.2.4.

Figura 17 – Fotografias digitais dos géis secos GCO8/GE (a, b, c) e de GE somente (d, e, f): (a) e (d) superfície superior; (b) e (e) superfície lateral; (c) e (f) superfície inferior.

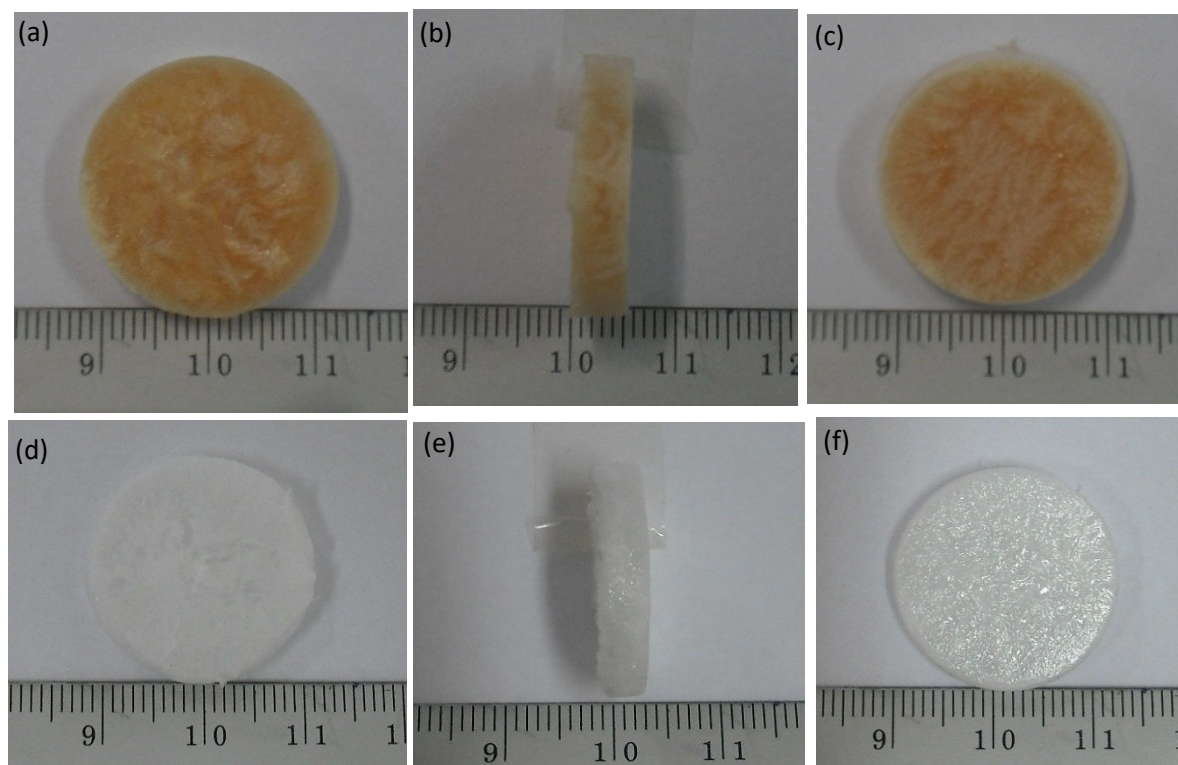


Tabela 5 – Raio e altura média dos géis secos.

Géis	Raio (cm)	Altura (cm)
GCO2/GE	$1,14 \pm 0,011$	$0,33 \pm 0,02$
GCO5/GE	$1,12 \pm 0,019$	$0,31 \pm 0,02$
GCO8/GE	$1,14 \pm 0,002$	$0,30 \pm 0,02$

A Figura 18 mostra as micrografias MEV dos géis secos de GCO/GE, em que a estrutura porosa dos géis pode ser claramente observada. Os poros possuem distribuição aleatória. A média do diâmetro de poros (Figura 19) diminui com o aumento do grau de oxidação de GCO. GCO2/GE com a maior média de 201 ± 66 μm seguido de GCO5/GE 150 ± 49 μm e GCO8/GE 94 ± 22 μm . Comportamento semelhante em que mais pontos de reticulação diminuem a média do diâmetro de poros foi observado em suportes de Gelatina com quitosana reticulados com genipina (SAREM E COL. 2013). O diâmetro de poros tem importante influência na adesão e crescimento de células nos suportes porosos aplicados para regeneração de tecidos. O'BRIEN E COL. (2005) estudaram o efeito do diâmetro de poros de

suportes porosos de colágeno e glicosaminoglicana e verificaram que a adesão de células no intervalo de diâmetro de poros de 95-150 μm diminuía para células que possuem aplicação ortopédica.

Figura 18 – Micrografias MEV das superfícies dos géis de GCO/GE de diferentes graus de oxidação: (A) GCO2/GE; (B) GCO5/GE; (C) GCO8/GE; (D) seção lateral de GCO5/GE.

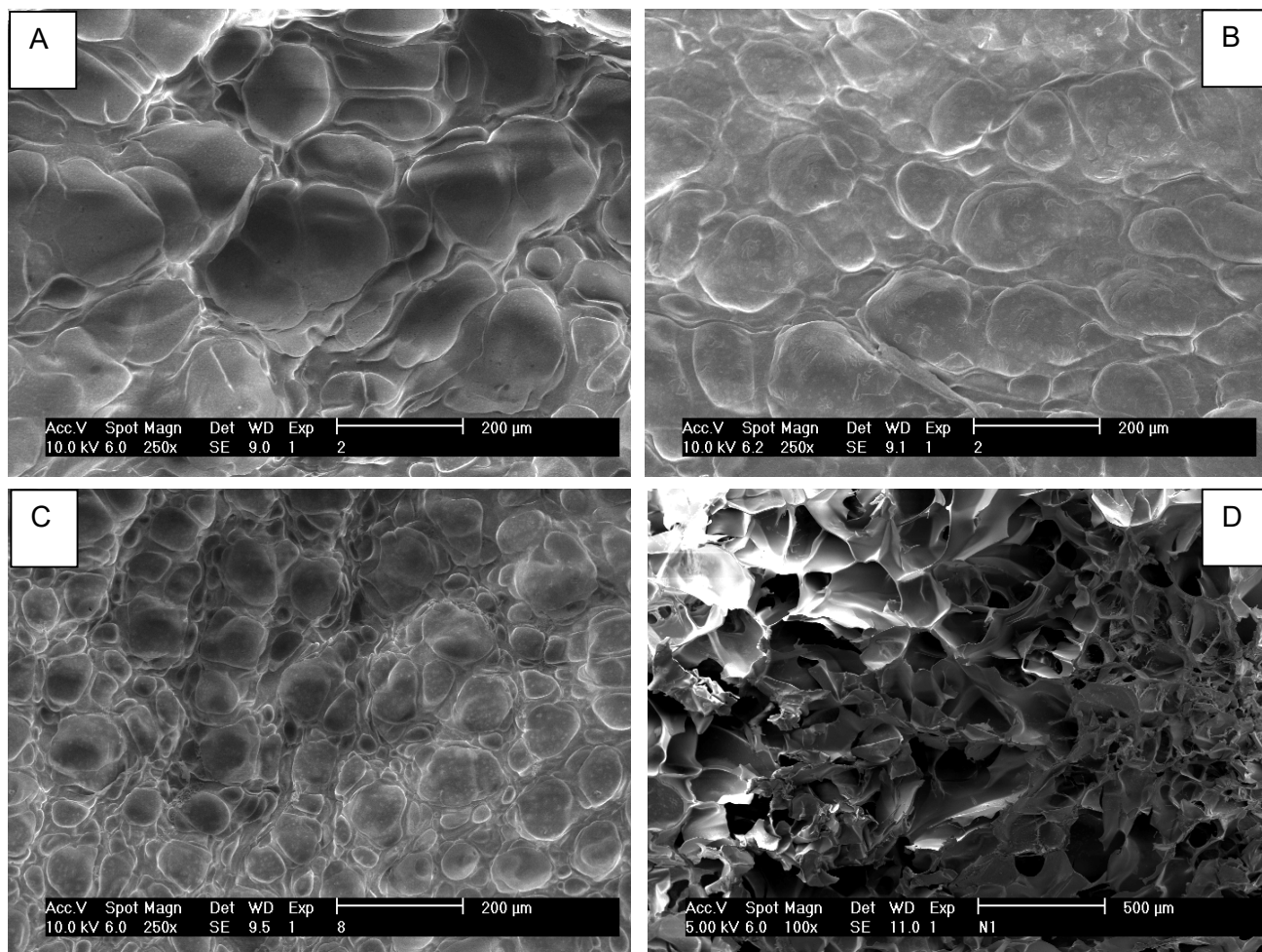
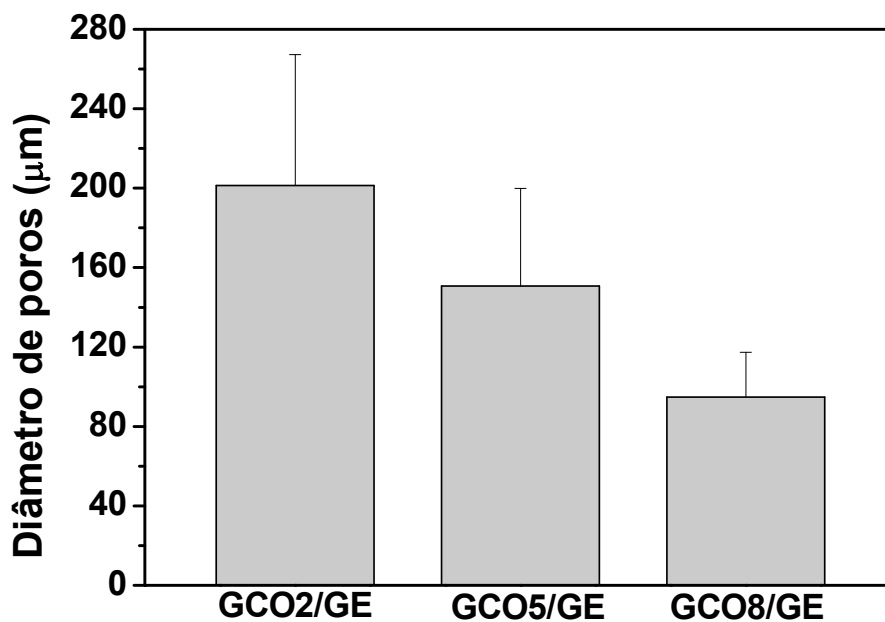


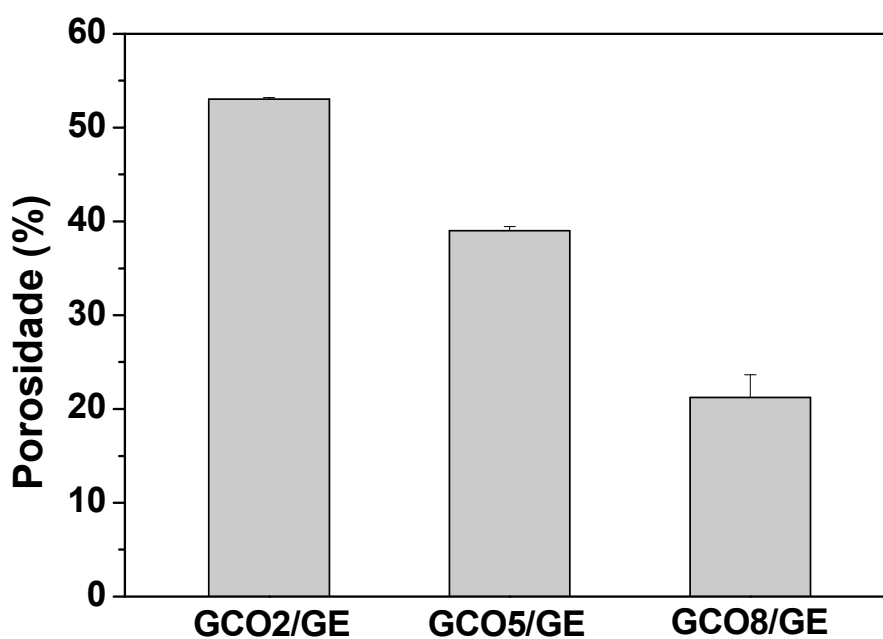
Figura 19 – Média do diâmetro de poros para géis de diferentes graus de oxidação de GCO.



4.2.4 POROSIDADE

A Figura 20 mostra a porosidade dos géis GCO/GE. Em concordância com o resultado de diâmetro de poros obtidos por MEV, os géis de GCO2/GE apresentaram a maior média de porosidade, $53,00 \pm 0,19\%$ seguido de GCO5/GE $39,02 \pm 0,39\%$ e GCO8/GE $21,24 \pm 2,38\%$.

Figura 20 – Porosidade dos géis de GCO/GE de diferentes graus de oxidação de GCO: GCO2, GCO5 e GCO8.

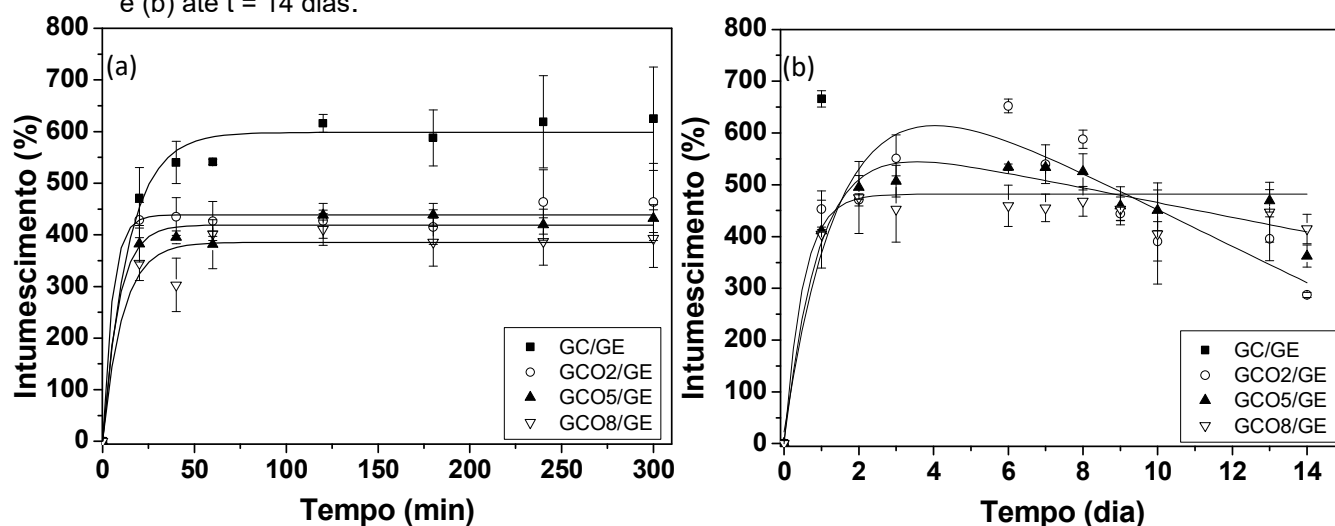


A porosidade para suportes de colágeno-quitosana foi de 60% (FERNANDES E COL., 2011), para suportes de gelatina/quitosana/ácido hialurônico incorporado com microesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) de 90% (TAN E COL., 2009) e para suportes de gelatina com quitosana reticulados com genipina de 88% (SAREM E COL. 2013).

4.2.5 ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO

O processo de intumescimento deve-se primariamente a penetração de água na matriz polimérica por capilaridade e difusão. A água interage com os grupos hidrofílicos, como hidroxilas, carboxilatos e amino, por ligação de hidrogênio (FLORY, 1953). O perfil de intumescimento é interessante desde que revela o comportamento do material em meio aquoso e a penetração de água para o interior do suporte. Essa propriedade é importante desde que pode prevenir a perda de fluidos e de nutrientes corporais, quando aplicado como suporte poroso. A Figura 21 apresenta o intumescimento dos géis de GCO/GE de diferentes graus de oxidação e de um gel de GC não modificada com GE.

Figura 21 – Ensaio de intumescimento dos géis GC/GE e GCO/GE: (a) até tempo $t = 300$ minutos e (b) até $t = 14$ dias.



Pode-se notar que durante o período do primeiro dia o gel de GC/GE teve o maior intumescimento e que dissolveu no segundo dia. Do primeiro dia até o oitavo, o intumescimento é praticamente constante para os géis GCO/GE. No décimo

quarto dia há uma inversão total do perfil de intumescimento com GCO8/GE > GCO5/GE > GCO2/GE. Esse resultado foi atribuído à solubilização dos géis GCO2 e GCO5. A Tabela 5 sumariza alguns dos valores de intumescimento.

Tabela 6 – Intumescimento para os géis de GCO/GE e GC/GE em 5h e no 1º, 8º e 14º dias.

Géis	5h	1ºdia	8ºdia	14º dia
GC/GE	625 ± 100	666 ± 16	*-	-
GCO2/GE	464 ± 75	453 ± 35	588 ± 18	287 ± 5
GCO5/GE	432 ± 27	411 ± 2	525 ± 35	362 ± 21
GCO8/GE	393 ± 56	405 ± 66	468 ± 29	415 ± 28

*O gel GC/GE dissolveu no 2º dia.

Supõe-se que a água foi principalmente armazenada nos espaços dos poros nos géis. O gel com GCO de menor grau de oxidação (GCO2) possui uma maior porosidade e largos diâmetros de poro, o que oferece maior espaço para o armazenamento de água e, portanto o intumescimento é maior. O experimento mostra que o intumescimento está diretamente relacionado com a porosidade dos géis que pode ser ajustada pelo grau de oxidação da GCO utilizada.

Os géis foram liofilizados e suas massas finais foram medidas. Os resultados encontram-se na Tabela 7 abaixo:

Tabela 7 – Massa residual dos géis de GCO/GE após 14 dias de intumescimento

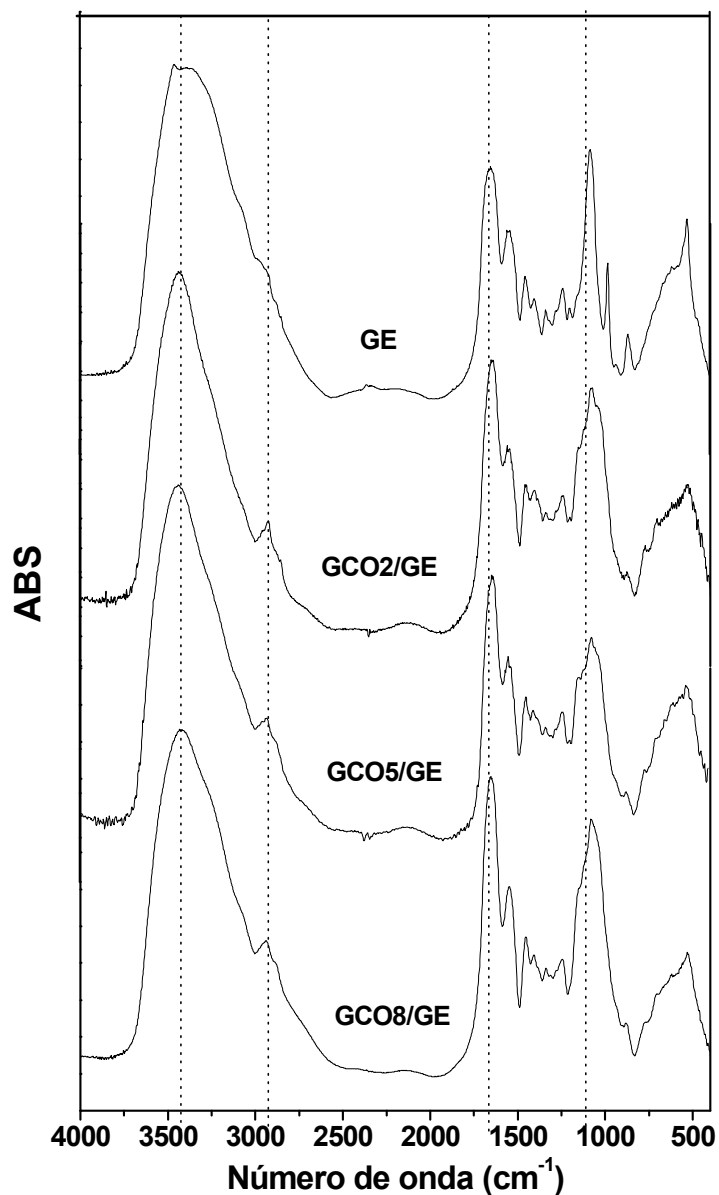
	GCO2/GE	GCO5/GE	GCO8/GE
Massa residual ± DP (%)	71,3 ± 1,6	78,2 ± 0,4	82,2 ± 0,2

GCO8/GE foi o que menos dissolveu, pois possui maior número de grupos aldeídicos e, portanto mais pontos de reticulação. Resultados semelhantes de intumescimento foram encontrados para hidrogéis de goma konjac oxidada (YU E XIAO, 2008) e suportes de gelatina reticulada com glutaraldeído, em que neste quanto maior a quantidade de agente reticulante menor o intumescimento (WU E COL., 2010).

4.2.6 INFRAVERMELHO DOS GÉIS DE GCO/GE

Os espectros de infravermelho para os géis de GE (sem adição de GC ou GCO), GCO2/GE, GCO5/GE e GCO8/GE são mostrados na Figura 22. Observa-se no intervalo de 3700 a 3000 cm^{-1} a diferença entre a forma das bandas que no gel de GE é mais parecida com o sinal de vibração de estiramento N-H e nos géis mais próxima ao sinal característico de vibração de estiramento O-H, a banda em 2900 cm^{-1} (atribuída à vibração de estiramento simétrico e assimétrico de C-H) é menos intensa no gel de GE que nos géis de GCO/GE. A banda em 1085 no gel de GE é devido a presença de fosfato proveniente do tampão fosfato (vibração de deformação axial de P=O) e nos géis de GCO/GE as bandas em 1150, 1080 e 1030 cm^{-1} referentes ao estiramento de C-O-C e deformação dos grupos O-H das unidades glicosídicas. A absorção dos grupos C=N (Base de Schiff) não foi observada em 1615-1700 cm^{-1} , pois foi sobreposta pela absorção em 1649 cm^{-1} devido à vibração de O-H de moléculas de água da umidade do polissacarídeo (BUENO, 1990).

Figura 22 – Espectros de infravermelho dos géis de GE, GCO2/GE, GCO5/GE e GCO8/GE.

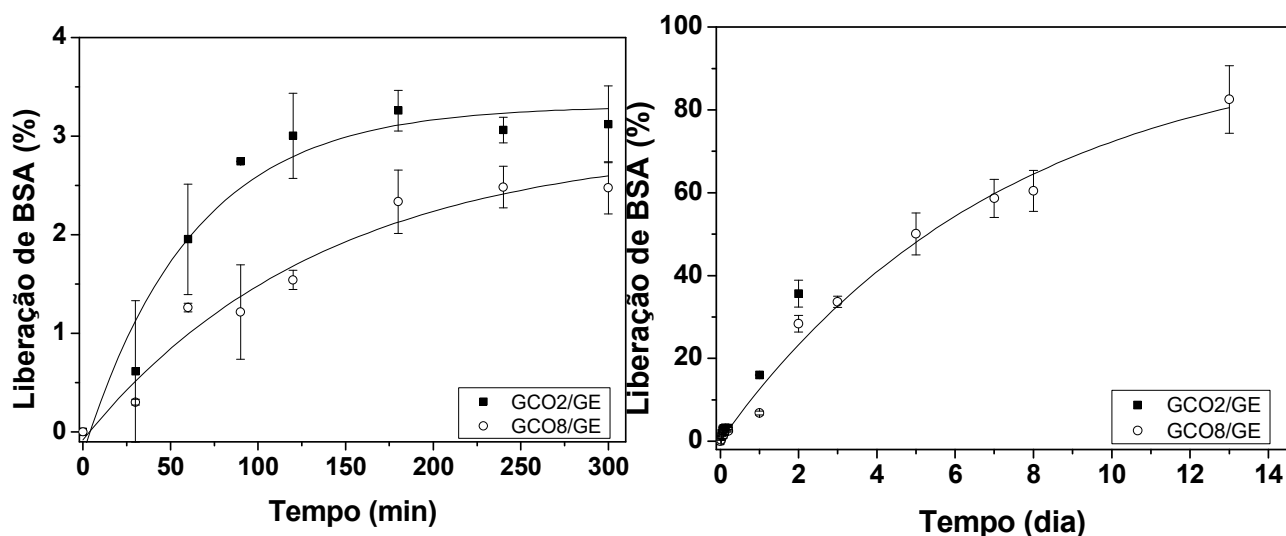


4.3 LIBERAÇÃO DE BSA

A liberação de BSA em tampão pH 7,4 é mostrada na Figura 23. Em (a) a liberação é mostrada nas primeiras 5 h e em (b) até 13 dias.

Observa-se que com o aumento do grau de oxidação de GCO a quantidade de BSA liberada diminui. GCO2/GE liberou 3,1% e GCO8/GE 2,5% até 5 h.

Figura 23 – Liberação de BSA em tampão pH 7,4 a partir de géis GCO2/GE e GCO8/GE: (a) até 5h e (b) até 13 dias, à 37 °C e 50 rpm.



No acompanhamento da liberação em dias, os géis que intumesceram mais liberaram maior quantidade de BSA. GCO2/GE liberou 35,7% no 2º dia e no 3º dia a solução estava turva indicando a dissolução de GCO2/GE. Não foi mais possível acompanhar a liberação de BSA a partir deste gel por espectroscopia de UV-vis, pois os valores de absorbância não se encontravam dentro da faixa linear da lei de Beer. GCO8/GE liberou 82% de BSA até o 13º dia. Resultados semelhantes de liberação de fatores de crescimento epidérmicos foram obtidos para filmes de gelatina e dextrana dialdeídica, mostrando que quanto menor o grau de oxidação do polissacarídeo oxidado utilizado como polialdeído maior a quantidade liberada (DRAYE E COL., 1998).

5 CONCLUSÕES

Goma do cajueiro foi modificada por oxidação com periodato de sódio em diferentes graus de oxidação.

As análises empregadas na caracterização dos derivados oxidados confirmaram a oxidação.

Géis de GCO/GE com GCO de diferentes graus de oxidação foram sintetizados via reação de Base de Schiff.

Os géis obtidos apresentaram diâmetro médio em torno de 2,3 cm e altura 0,3 cm. Observou-se que com o aumento do grau de oxidação de GCO diminuem o grau de intumescimento dos géis, a porosidade e a média dos diâmetros dos poros obtidos por MEV, para os géis GCO2/GE, GCO5/GE e GCO8/GE, respectivamente. O gel GCO8/GE liberou até o 13º dia 82% do BSA incorporado e GCO2/GE liberou 35,7% no 2º dia e no 3º dissolveu.

Estes resultados indicam que o aumento do grau de oxidação de GCO favorece a formação de uma estrutura com maiores pontos de reticulação. A formação de uma rede tridimensional mais reticulada é importante para a estabilidade em meio aquoso, no entanto, para produção de suportes porosos a partir de géis de GCO/GE adequados para crescimento celular é necessário o equilíbrio entre a porosidade e a estabilidade quanto à solubilização em meio fisiológico. Conclui-se que os suportes porosos a base de gelatina e goma do cajueiro oxidado apresentam potencial para aplicação como biomateriais devido à possibilidade de modular as propriedades desses materiais pelo grau de oxidação da GC.

6 REFERÊNCIAS

Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Lista de espera de 2011. Disponível em: <<http://www.abto.org.br>> Acessado em 18/03/12 às 14:40h.

AALMO, K. M., PAINTER, T. J. Periodate-oxidation of methyl glycopyranosides - rate coefficients and relative stabilities of intermediate hemiacetals. **Carbohydrate Research**, 89, 1, 73, 1981.

BACHMANN, L.; GOMES, A. S. L.; ZECELL, D. M. Collagen absorption bands in heated and rehydrated dentine. **Spectrochimica Acta Part A**, 62, 1045–1049, 2005.

BANDEIRA, C.T., Relatório Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **EMBRAPA-CNPq**, 6,1, 1991.

BAE, Y. H., KIM, S. W. Hydrogel delivery systems based on polymer blend, block co-polymers or interpenetrating networks. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 11, 109, 1993.

BRUNEEL, D., SCHACHT, E., Chemical modification of pululan .1. periodate-oxidation. **Polymer**, 34, 12, 2628, 1993.

BUENO, W. A. **Manual de Espectroscopia Vibracional**. São Paulo: McGraw-Hill, 1990.

CALVERT, P., O'KELLY, J. SOUVIGNIER, C. SFF of organic-inorganic hybrid materials, **Materials Science and Engineering**, C6: 167–107, 1998.

CORTESI, R.; NASTRUZZI, C.; DAVIS, S.S. Sugar cross-linked gelatin for controlled release: microspheres and disks. **Biomaterials**, 19, 1641–1649, 1998.

CHEN, M.K.; BADYLAK, S.F. Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold, **Journal of Surgical Research**, 99, 352–358, 2001.

CHRISTENSEN, B. E., AASPRONG, E., STOKKE, B. T. Gelation of periodate oxidised scleroglucan (scleraldehyde). **Carbohydrate Polymers**, 46, 3, 241, 2001.

CUNHA, P. L. R., MACIEL, J. S., SIERAKOWSKI, M. R., DE PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18, 1, 85, 2007.

DAWLEE, S.; SUGANDHI, A.; BALAKRISHNAN, B.; LABARRE, D.; JAYAKRISHNAN, A. Oxidized Chondroitin Sulfate-Cross-Linked Gelatin Matrixes: A New Class of Hydrogels. **Biomacromolecules**, 6, 2040-2048, 2005.

DE PAULA, R.C.M.; RODRIGUES, J.F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, 26,177-181, 1995.

DE PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Composition of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, 45, 27-35, 1998.

DRAYE, J.P.; DELAHEY, B.; VOORDE, A.V.; BULCKE, A.V.D.; BOGDANOV, B.; SCHACHT, E. In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films. **Biomaterials**, 19, 99-107, 1998.

DRURY, J.L.; MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, 24, 4337-4351, 2003.

FANG, Y.; TAKAHASHI, R.; NISHINARI, K. Protein/Polysaccharide Cogel Formation Based on Gelatin and Chemically Modified Schizophyllan. **Biomacromolecules**, 6, 3202-3208, 2005.

FERNANDES, L. L.; RESENDE, C. X. TAVARES, D. S.; SOARES G. A. Cytocompatibility of Chitosan and Collagen-Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. **Polímeros**, 21, 1, 1-6, 2011.

FLORY, P. J., In: **Principles of Polymer Chemistry**. Corner University Press, New York, 1953.

FUJISAWA, S.; OKITA, Y.; FUKUZUMI, H.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Preparation and characterization of TEMPO-oxidized cellulose nanofibril films with free carboxyl groups. **Carbohydrate Polymers**, 84, 579-583, 2011.

GOMEZ, C.G.; RINAUDO, M.; VILLAR, M.A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. **Carbohydrate Polymers**, 67, 296-304, 2007.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, 25, 1813-1827, 2011.

GUILHERME, M. R., REIS, A. V., TAKAHASHI, S. H., RUBIRA, A. F., FEITOSA, J. P. A., MUNIZ, E. C. Synthesis of a novel superabsorbent hydrogel by copolymerization of acrylamide and cashew gum modified with glycidyl methacrylate. **Carbohydrate Polymers**, 61, 4, 464, 2005.

GUO, L.; COLBY, R. H.; LUSIGNAN, C. P.; WHITESIDES, T. H. Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. **Macromolecules**, 36, 26, 9999, 2003.

HAN, N.; SHI, R.; YANG, R.; ZHANG, X.; ZHAO, J. Porous hydroxyapatite/chitosan-gelatin composite scaffold, contains hydroxyapatite, chitosan and gelatin in predetermined weight ratio. Patent CN101703806-A, 2010.

HARRINGTON, J. C.; MORRIS, E. R. An unusual manifestation of phase separation in mixtures of disordered gelatin with konjac glucomannan. **Food Hydrocolloids**, 23, 460-467, 2009.

HENCH, L.L.; PEREIRA, M.M.; ORÉFICE, R.L.; JONES, J.R. Em: **Biomateriais**. Editores ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, S.H., Editora Cultura Médica, p 481-506, 2005.

JIA, X.; BURDICK, J.A.; KOBLE, J.; CLIFTON, R.J.; ROSOWSKI, J.J.; ZEITELS, S.M.; LANGER, R. Synthesis and Characterization of in Situ Cross-Linkable Hyaluronic Acid-Based Hydrogels with Potential Application for Vocal Fold Regeneration. **Macromolecules**, 37, 3239-3248, 2004.

KRISTIANSEN, K. A.; POTTHAST, A.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydrate Research**, 345, 1264–1271, 2010.

LEE, J.; KIM, S. Preparation of macroporous hydroxyapatite ceramics **Proceeding of the 5th World Biomaterials Congress**, 53. 1996.

LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering. **Chemical Reviews**, 101, 1869–1879, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, ed 2, 79-146, 2000.

LIEN, S.M.; KO, L.Y.; HUANG, T.J. Effect of crosslinking temperature on compression strength of gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. **Materials Science and Engineer C**, 30, 631–635, 2010.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Review Paper**, 87, 1051-1064, 2007.

MACIEL, J. S., SILVA, D. A., PAULA, H. C. B., DE PAULA, R. C. M. Chitosan/carboxymethyl cashew gum polyelectrolyte complex: synthesis and thermal stability. **European Polymer Journal**, 41, 2726, 2005.

MACIEL, J. S., PAULA, H. C. B., MIRANDA, M. A. R., SASAKI, J. M., DE PAULA, R. C. M. Reacetylated chitosan/cashew gum gel: Preliminary study for potential utilization as drug release matrix. **Journal of Applied Polymer Science**, 99, 1, 326, 2006.

MACIEL, J. S., KOSAKA, P. M., DE PAULA, R. C.M., FEITOSA, J. P.A., PETRI, D. F.S. Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers or amino-terminated surfaces and the immobilization of Concanavalin A on them. **Carbohydrate Polymers**, 69, 522, 2007.

MAGALHÃES JR., G. A., SANTOS, C. M. W., SILVA, D. A., MACIEL, J. S., FEITOSA, J. P. A., PAULA, H. C. B., DE PAULA, R. C. M. Microspheres of chitosan/carboxymethyl cashew gum (CH/CMCG): effect of chitosan molar mass and CMCG degree of substitution on the swelling and BSA release. **Carbohydrate Polymers**, 77, 2, 217-222, 2009.

MAIA, J.; FERREIRA L.; CARVALHO, R.; RAMOS, M. A.; GIL, M. H. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. **Polymer**, 46, 9604, 2005.

MIRANDA, S.C.C.C.; SILVA, G.A.B.; HELL, R.C.R.; MARTINS, M.D.; ALVES, J.B.; GOES, A.M. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. **Archives of Oral Biology**, 56, 1-15, 2011.

MOURA NETO, E. Desenvolvimento de novos materiais à base de goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*): derivados e microesferas com gelatina. Dissertação apresentada em 2008.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, 86, 325-332, 2004.

NADDAF, A.A.; TSIBRANSKA, I.; BART, H, -J. Kinetics of BSA release from poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. **Chemical Engineering and Processing**, 49, 581–588, 2010.

NISHI, K. K., JAYAKRISHNAN, A. Preparation and in vitro evaluation of primaquine-conjugated gum arabic microspheres. **Biomacromolecules**, 5, 1489, 2004.

NISHI, K. K., JAYAKRISHNAN, A. Self-gelling primaquine-gum arabic conjugate: an injectable controlled delivery system for primaquine. **Biomacromolecules**, 8, 84, 2007.

O'BRIEN, F. J.; HARLEY, B.A.; YANNAS, I.V.; GIBSON, L.J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**, 26, 433–441, 2005.

PAULA, H. C. B., GOMES, F. J. S., DE PAULA, R. C. M. Swelling studies of chitosan/cashew nut gum physical gels. **Carbohydrate Polymers**, 48, 313, 2002.

PAULA, H. C. B., DE PAULA, R. C. M., BEZERRA, S. K. F., Swelling and release kinetics of larvicide-containing chitosan/cashew gum beads. **Journal of Applied Polymer Science**, 102, 395, 2006.

PEPPAS, N. A.; HUANG, Y.; TORRES-LUGO, M.; WARD, J. H.; ZHANG, J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in Medicine and Biology. **Annual Reviews Biomedical Engineer**, 2, 9–29, 2000.

PESSOA, P. F. A. P., LEITE, L. A. S., PIMENTEL, C. R. M., Situação atual e perspectiva da agroindústria do caju. In: Araujo, J. P., Silva, P. P. (Org.) **Cajacultura: modernas técnicas de produção**, Fortaleza, EMBRAPA-CNPAT, 23-42, 1995.

PRYSTUPA, D. A., DONALD, A. M. Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. **Polymer Gels and Networks**, 4, 2, 87, 1996.

RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais e comparação através de goma de cajueiro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1, 31-36, 1993.

ROKHADE, A. P.; PATIL, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. **Carbohydrate Polymers**, 67, 605, 2006.

RONGXIN, S.; WEI, Q.; ZHIMIN, H.; YUBIN, Z.; FENGMIN, J. Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process. **Food Hydrocolloids**, 22, 995–1005, 2008.

SAKAI, S.; HIROSE, K.; TAGUSHI, K.; OGUSHI, Y.; KAWAKAMI, K. An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, 30, 3371-3377, 2009.

SAREM, M.; MOZTARZADEH, F.; MOZAFARI, M. How can genipin assist gelatin/carbohydrate chitosan scaffolds to act as replacements of load-bearing soft tissues? **Carbohydrate Polymers**, 93, 635– 643, 2013.

SCHACHT, E., BOGDANOV, B., VANDENBULCKE, A., DEROOZE, N. Hydrogels prepared by crosslinking of gelatin with dextran dialdehyde. **Reactive and Functional Polymers**, 33, 109, 1997.

SEGTMAN, V. H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, 18, 1–11, 2004.

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 Polymers**, 58, 2, 163, 2004.

SILVA, D. A. **Hidrogéis e copolímeros de Goma do Cajueiro e Poliácridamida**. Tese apresentada ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC 2006.

SILVA, D. A., DE PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A. Graft copolymerisation of acrylamide onto cashew gum. **European Polymer Journal**, 43, 2620, 2007.

TAN, H.; WU, J.; LAO, L.; GAO, C. Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, 5, 328-337, 2009.

TATTINI JR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, 1, 2006.

TIZIANI, S.; SUSSICH, F.; CÉSARO, A. The kinetics of periodate oxidation of carbohydrates 2. Polymeric substrates. **Carbohydrate Research**, 338, 1083, 2003.

VOLLHARDT K. P. C.; SCHORE N. E. **Química Orgânica: Estrutura e Função**. 4ª edição. Editora Bookman, 2004.

WANG, L.; AN, X.; XIN, Z.; ZHAO, L.; HU, Q. Isolation and Characterization of Collagen from the Skin of Deep-Sea Redfish (*Sebastes mentella*). **Journal of food science**, 72, 8, E450-E455, 2007.

WENG, L.; CHEN, X.; CHEN, W. Rheological Characterization of in Situ Crosslinkable Hydrogels Formulated from Oxidized Dextran and N-Carboxyethyl Chitosan **Biomacromolecules**, 8, 1109, 2007.

WHANG, K.; THOMAS, C.H.; HEALY, K.E. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. **Polymer**, 36, 837-842, 1995.

WIKIPÉDIA. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Aminoacidos>>
<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Colágeno>>
<http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin> Acesso em Junho de 2012.

WU, X.; LIU, Y.; LI, X.; WEN, P.; ZHANG, Y.; LONG, Y.; WANG, X.; GUO, Y.; XING, F.; GAO, J. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. **Acta Biomaterialia**, 6, 1167–1177, 2010.

WU, Y.; HE, J.; CHENG, W.; GU, H. GUO, Z.; GAO, S.; HUANG, Y. Oxidized regenerated cellulose-based hemostat with microscopically gradient structure. **Carbohydrate Polymers**, 88, 1023– 1032, 2012.

YU, H.; XIAO, C. Synthesis and properties of novel hydrogels from oxidized konjac glucomannan crosslinked gelatin for in vitro drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, 72, 479–489, 2008.

ZHANG, F.; HE, C.; CAO, L.; FENG, W.; WANG, H.; MO, X.; WANG, J. Fabrication of gelatin–hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. **International Journal Biological Macromolecules**, 48, 474–481, 2011.