



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

Síntese e Caracterização de Géis de Galactomanana de
Fava Danta (*Dimorphandra gardneriana*) para Aplicação
Biológica

Aliny Abreu de Sousa Monteiro

Orientadora: Dra Regina Célia Monteiro de Paula

Co-Orientadora: Dra Pablyana Leila Rodrigues da Cunha

Fevereiro 2009



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

Síntese e Caracterização de Géis de Galactomanana de
Fava Danta (*Dimorphandra gardneriana*) para Aplicação
Biológica

Aliny Abreu de Sousa Monteiro

Dissertação submetida à
coordenação do programa de
Pós-graduação em Química,
como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre.

Fevereiro 2009

M774s Monteiro, Aliny Abreu de Sousa

Síntese e caracterização de géis de galactomanana de fava danta
(*Dimorphandra gardneriana*) para aplicação biológica / Aliny Abreu de Sousa
Monteiro, 2009.

82 f.; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Pós-Dra. Regina Célia Monteiro de Paula

Co-orientadora: Profa. Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha

Área de concentração: Química

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências, Fortaleza, 2009.

AGRADECIMENTOS

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

As sementes da espécie *Dimorphandra gardneriana* foram utilizadas como matéria-prima para a obtenção de galactomananas e a eficiência do processo foi determinada pelo rendimento em polissacarídeo obtido. A goma de fava danta foi purificada pelo método de Fehling com a finalidade de reduzir, principalmente, proteínas. Esse tratamento propiciou uma redução de 36% de proteína e uma considerável redução na viscosidade, o que está condizente com a redução da massa molar dessa amostra. A goma de fava danta não-purificada (GFDNP) e a purificada (GFDP) foram reticuladas com glutaraldeído para produzir hidrogéis fluidos. A reação de reticulação foi acompanhada por medidas reológicas. 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. Hidrogéis fluidos de goma de fava danta não purificada (GelGFDNP) e purificada (GelGFDP) foram obtidos após 15 a 17 dias de reticulação. Para o GelGFDNP o aumento da viscosidade foi de nove vezes em relação à viscosidade da solução inicial de goma, enquanto para o GelGFDP foi de cento e trinta vezes. Para esses géis, ao final da reação, na faixa de frequência do joelho normal, o $G' > G''$ e $G'/G'' \geq 3$, sendo considerados géis fortes e verdadeiros. Os géis de fava danta bem como o Hilano G-F 20, medicamento utilizado no tratamento de osteoartrose, são fluidos pseudoplásticos, do mesmo modo que o líquido sinovial presente em joelhos saudáveis. As viscosidades dos géis de fava danta (GelGFDNP e GelGFDP) são da mesma ordem de grandeza que o Hilano G-F 20. As características reológicas dos géis de galactomanana de fava danta indicam que estes géis possuem potencial como agente viscosuplementador.

ABSTRACT

Seeds of *Dimorphandra gardineriana* Tul. ("fava danta") were used to obtain galactomannan and the effectiveness of the process was determined based on polysaccharide yield. The "fava danta" galactomannan was purified by Fehling method in order to reduce protein content. This treatment results in 36% of protein reduction and a decrease in the gum solution viscosity due to the molar mass reduction. "Fava danta" galactomannan without purification (GFDNP) and purified one (GFDP) were crosslinked with glutaraldehyde to produced fluid hydrogels. The crosslinking reaction was followed using rheological measurement. The increase of polysaccharide solution viscosity with increasing reaction time is gradual and can be interrupted at the moment that a fluid hydrogel is obtained through dialysis against water. Fluid hydrogel from "fava danta" galactomannan without purification (GelGFDNP) and purified (GelGFNDP) were obtained after 15 and 17 days respectively. For GelGFDNP an increase of viscosity of nine times was observed while for the GelGFNDP sample, the increase was of one hundred thirty times. At the end of crosslinking reaction, in the health knees frequency, the G' was greater than G'' and the G'/G'' ratio was higher than 3, showing that a true and strong gel was obtained. Fava-danta galactomannan gels and Hilano G-F 20, commercial gel used in the osteoarthritis treatment, shows a characteristic of pseudoplastic fluid. This behavior is the same observed in sinovial fluid present in healthy knees. The viscosity values of "fava danta" galactomannan gels (GelGFDNP and GelGFDP) are in the same order of values found for Hilano G-F 20. The rheological characteristic of "fava danta" galactomannan gels indicate that these gels have potential as a viscosupplement agent.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Razão manose/galactose para galactomananas extraídas de sementes brasileiras	5
TABELA 2- Aplicações testadas para galactomananas brasileiras.....	7
TABELA 3 – Configurações do equipamento de ICP-OES utilizadas para análise da goma de fava danta.	25
TABELA 4 – Percentual de Nitrogênio e Teor de proteína para GFDNP e GFDP.....	31
TABELA 5 - Turbidez das soluções aquosas 0,1% de fava danta e de guar, purificada e não purificada.	34
TABELA 6- Atribuições das principais bandas de absorção características das galactomananas de fava danta.....	36
TABELA 7 - Massas molares de pico para as amostras de goma de fava danta purificada e não purificada.....	38
TABELA 8 – Viscosidades das soluções 0,8% em tampão fosfato/salina de goma de fava danta e guar, não purificada e purificada, T=36°C.	40
TABELA 9 – Razão G'/G'' para as gomas de fava danta, não purificada e purificada e para a goma guar não purificada, a 36°C e frequência de 1Hz.	44
TABELA 10- Teor de água nos géis e no Hilano G-F20	47
TABELA 11-Teores de GA polimérico para os géis da goma de fava danta não purificada e purificada.	49
TABELA 12 - Parâmetros de estabilidade térmica das amostras de GFDNP, GFDP e dos seus géis.	52
TABELA 13 – Viscosidades dos géis de goma de fava danta, não purificada e purificada e do Hilano G-F20.	56
TABELA 14 - Parâmetros viscoelásticos para os géis de goma de fava danta, não purificada e purificada e para o Hilano G-F20, à 36°C.	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química parcial das galactomananas.....	5
FIGURA 2 – Reticulação de polímeros contendo os grupos álcool, amina ou hidrazina (R representa a cadeia polimérica).....	10
FIGURA 3 – Esquema de reticulação de polissacarídeo com o glutaraldeído..	10
FIGURA 4 - Representação gráfica de sistemas polissacarídicos típicos: (A) gel forte; B) solução concentrada; (C) solução diluída.....	13
FIGURA 5 - Estrutura do ácido hialurônico.....	15
FIGURA 6 – Amostra de goma de fava danta não purificada (GFDNP) e goma de fava danta purificada (GFDP).....	30
FIGURA 7 – Amostra de goma guar não purificada (GGuarNP) e guar purificada (GGuarP).....	30
FIGURA 8 - Espectro de infravermelho da GFDNP e da GFDP.....	36
FIGURA 9 - Cromatogramas para as amostras GFDNP e GFDP.	37
FIGURA 10- Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento das amostras de goma de fava danta e goma guar não purificada e das gomas purificadas, T=36°C.	39
FIGURA 11 - Cinética da reação de reticulação das amostras GFDNP, GFDP, GGuarNP e GGuarP, a 36 °C e taxa de cisalhamento de 2 s ⁻¹	41
FIGURA 12 – Aspecto macroscópico do gel de goma de fava danta purificada	42
FIGURA 13- Variação de G' e G'' em função da frequência para GFDNP no 23° dia de reticulação.	44
FIGURA 14- Variação de G' e G'' em função da frequência para GFDP no 25° dia de reticulação.....	45
FIGURA 15- Variação de G' e G'' em função da frequência para GGuarNP no 21° dia de reticulação	46
FIGURA 16 - Espectro de UV para as várias soluções padrão de glutaraldeído em tampão fosfato (pH = 7,3).....	48
FIGURA 17- Espectros de infravermelho das amostras de goma de fava danta não purificada e goma purificada e dos seus géis	50

FIGURA 18 - Curvas termogravimétricas das amostras de goma de fava danta e dos seus géis a 10°C/min em ar sintético.....	51
FIGURA 19 - DTG para as amostras GFDNP, GFDP e seus géis a 10°C/min em ar sintético.....	51
FIGURA 20 - Espectro de infravermelho das amostras GFDNP e GelGFDNP sem aquecimento e delas durante degradação térmica à 500 °C.....	54
FIGURA 21- Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento das amostras GelGFDNP, GelGFDP e do Hilano G-F 20 a T=36°C.	55
FIGURA 22 – Comportamento viscoelástico para os géis GelGFDNP, GelGFDP e Hilano G-F 20 a 36°C.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ : deformação

v: estiramento

ABS: absorbância

AH: ácido hialurônico

DL₅₀: dose letal necessária para provocar a morte de até 50% da população de animais em estudo

DTG: derivada da análise termogravimétrica

FBN: Food Nutritional Board

FDA: Food and Drug Administration

G': módulo de cisalhamento elástico

G'': módulo de cisalhamento viscoso

G'/G'': razão do módulo elástico sobre o módulo viscoso

GA: glutaraldeído

GelGFDNP: gel de goma de fava danta não- purificada

GelGFDP: gel de goma de fava danta purificada

GFDNP: goma da fava danta não purificada

GFDP: goma de fava danta purificada

GGuarNP: goma guar não purificada

GGuarP: goma guar purificada

GPC: cromatografia de Permeação em Gel

Hilano G-F 20: hilano fluido e 20% gel

ICP- OES: espectrometria de emissão atômica por plasma induzido

M/G: razão manose/galactose

M_{pk}: massa molar de pico

OA: osteoartrite

P.A.: pureza analítica

ppm: parte por milhão

rpm: rotações por minuto

TLCA: transecção do ligamento cruzado anterior

T_{max}: temperatura máxima de decomposição

UV: ultravioleta

v/v: volume/volume

VDR: valores diários de referência

V_e: volume de eluição

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua graça e misericórdia infinita.

Aos meus amados pais, Liduina e Edmilson, minha querida irmã, Lidya e minha vó, Ozélia, pelo verdadeiro amor sempre manifesto e por toda dedicação e esforço que acompanham minha firme caminhada.

A minha amada e saudosa irmã Nivya (*in memoriam*) pela linda e curta história de vida. Sua partida me causou imensa dor, mas a lembrança da nossa convivência me faz suportar.

Aos dois grandes amores da minha vida, Sérgio e Mariana, pelo amor, paciência e apoio indispensáveis que me impulsionam a progredir e me fazem completamente feliz.

A professora Regina Célia, por todos esses anos de trabalho, sempre orientando e incentivando meu crescimento profissional. Além da exímia professora e pesquisadora, é uma mãe exemplar em quem eu me inspiro.

As professoras do Grupo de Polímeros, Judith Feitosa, Nágila Ricardo e Sandra Aguiar por todas as contribuições tão fundamentais para a construção e realização deste trabalho.

As minhas queridas amigas, Pablyanna e Durcilene, pela sólida amizade, sempre dispostas a compartilhar tanto os momentos felizes como as infortúnias da vida.

A amiga Jeanny, por estar sempre tão presente no meu dia-a-dia, pelos bons conselhos e que juntamente com sua mãe quase fazem parte da minha família. Ah! Não poderia me esquecer das pertinentes implicâncias do Daniel para comigo, parece “coisas de irmão”.

Aos meninos veteranos do Laboratório de Polímeros (LABPOL), Roberto, Neto, Célio, Júnior, Draúlio, Igor, Paulo Roberto, Hélder e Sávio pelos momentos de descontração, agradável convivência e constantes ajudas.

As meninas e colegas novatos do LABPOL, Leônia, Marília, Clara, Nádia, Rafael, Karine, Samira, Fabrício, Lílian, Bruno, Frank e Maslândia, por criarem laços de amizade e um ambiente de camaradagem nesse grupo de pesquisa.

As minhas amigas e companheiras de moda Ana Paula, Elenir e Janaína, que, cada uma ao seu modo, estão sempre presentes em minha vida.

Aos meus amigos Hanna, Mariana e Ivan pela amizade, pelos passeios, conversas, incentivos e estudos que foram e são tão valiosos para mim.

Aos amigos Érico e Guilherme, pela boa amizade, companheirismo, produtivo trabalho em conjunto e ajudas tão importantes em vários momentos da nossa pós-graduação.

A Natália Pires (Natpol) pela excelente contribuição nas medidas de reologia tão cuidadosamente realizadas.

Ao professor Luiz Gonzaga de França Lopes, coordenador do programa de pós-graduação em Química Inorgânica da UFC pela competência e prestatividade com a qual desempenha seu cargo.

As funcionárias Tereza e Elis pelas análises obtidas e ao secretário da coordenação da pós-graduação em Química Inorgânica, Orlando, por eles sempre estarem dispostos a ajudar.

A CAPES pela bolsa concedida, a rede Nanoglicobiotec e ao CNPq pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento deste projeto.

"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses quefazerse que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade "

Paulo Freire

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
1.1 GALACTOMANANAS	3
1.1.1 POLISSACARÍDEOS DE SEMENTES DA FAVA DANTA	7
1.2 GÉIS DE POLISSACARÍDEOS	9
1.2.1 RETICULAÇÃO	9
1.2.2 REOLOGIA.....	11
1.2.3 APLICAÇÃO DE GÉIS NO TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE.....	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. EXPERIMENTAL	21
3.1. MATERIAIS.....	21
3.2. METODOLOGIA	21
3.2.1 Extração da galactomanana da semente da fava danta (<i>Dimorphandra gardineriana</i>)	21
3.2.2 Purificação da galactomanana da fava danta.....	22
3.2.2.1. Método Fehling.....	22
3.2.3. Reticulação das galactomananas de fava danta e de guar	23
3.2.3.1. Cinética de Reticulação das galactomananas de fava danta e de guar	24
3.2.4 Caracterização dos materiais.....	24
3.2.4.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	24
3.2.4.2. Determinação do teor de proteínas através da análise elementar	24
3.2.4.3. Determinação do teor de cobre por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES).....	25
3.2.4.4. Medidas turbimétricas	26
3.2.4.4.1. Determinação da turbidez por espectroscopia na região do visível .	26
3.2.4.4.2. Determinação da turbidez por turbidímetro	26
3.2.4.5. Estimativa da distribuição de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	27
3.2.4.6. Análise termogravimétrica	27
3.2.4.7. Análises Reológicas	28
3.2.4.7.1. Reologia de fluxo.....	28
3.2.4.7.2. Reologia oscilatória	28
3.2.4.8. Teor de água nos géis GFDNP e GFD	28
3.2.4.9. Teor de glutaraldeído residual nos géis GFDNP e GFDP	29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Rendimento	30
4.2. Análise Elementar – Teor de proteínas	32
4.3. Determinação do teor de cobre na amostra de GFDNP e GFDP por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES) ...	33
4.4. Turbidez	35
4.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	36
4.6. Estimativa da distribuição de massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)	38
4.7. Estudo reológico comparativo das amostras de goma	40
4.8. Cinética de reticulação das galactomananas	41
4.8.1. Reologia de fluxo da cinética de reticulação das galactomananas	42
4.8.2. Cinética de reticulação das galactomananas monitorada por reologia oscilatória.....	44
4.9. Caracterização dos géis de goma de fava danta	44
4.9.1. Teor de água nos géis e no Hilano G-F 20.....	47
4.9.2. Teor de glutaraldeído nas amostras GelGFDNP e GelGFDP	48
4.9.3. Infravermelho da GFDNP e GFDP e dos seus respectivos géis	51
4.9.4. Análise Termogravimétrica.....	51
4.10. Estudos reológicos	56
4.10.1. Reologia de fluxo comparativa dos géis de GFDNP e GFDP com o Hilano G-F 20	56
4.10.2. Reologia oscilatória dos géis de GFDNP e GFDP e do Hilano G-F 20	56
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 GALACTOMANANAS

Dentre os principais polissacarídeos de reserva em plantas estão os polissacarídeos da parede celular. Eles são classificados, de acordo com suas estruturas químicas, em mananas, xiloglucanas e galactanas. As mananas são subdivididas em mananas puras, glucomananas e galactomananas. As galactomananas e as xiloglucanas ganham maior destaque por apresentarem importantes aplicações industriais.

Galactomananas são polissacarídeos neutros extraídos, principalmente, das sementes de plantas da família *Leguminosae* (Reid, 1985) e em menores quantidades das sementes das famílias *Palmae*, *Annonaceae*, *Convolvulaceae* e *Loganiaceae* (Dea e Morrison, 1975; Dey, 1978). Podem ainda ser provenientes de algumas fontes microbiológicas, como fungos (Dea e Morrison, 1975) e líquens (Woranovicz, 1997).

Morfologicamente, as sementes produtoras de galactomananas são constituídas de tegumento ou casca, embrião e pelo endosperma do tipo mucilaginoso que o envolve. A semente mais antiga (datada por Carbono-14) que germinou, tornando-se uma planta viável, tinha 2000 anos de idade. Ela foi descoberta em uma escavação no palácio de Herodes, o Grande, em Massada, Palestina e germinou em 2005. Era uma Tamareira (Wikipédia, 2009).

Os polímeros de reserva estão presentes em endospermas de algumas plantas onde, durante a germinação, esses carboidratos são catabolizados para fornecer produtos de metabolismo para o crescimento da planta (Singha, Oberly e Townsend, 1987). A degradação da galactomanana no endosperma é feita pela ação combinada das enzimas α -galactosidase, β -mananase e β -manosidase manohidrolase (McCleary e col., 1981).

As galactomananas estão presentes em sementes de diversas espécies de todo o mundo (Buckeridge e col., 1995b; Dea e Morrison, 1975), mas suas principais fontes comerciais são a goma guar (*Cyamopsis*

tetragonolobus), goma caroba ou locusta (*Ceratonia siliqua*) e goma tara (*Caesalpinia spinosa*) (Neukom, 1989; Azero e Andrade, 2002).

A goma guar é obtida a partir de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, 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). A planta *Cyamopsis tetragonolobus* é natural do Paquistão e da Índia, sendo aclimatada nos Estados Unidos em 1940 devido à carência de goma alfarroba. Esta goma tem uso consagrado na indústria alimentícia, possui alta solubilidade em água e produz dispersões de viscosidade elevada (Dea e Morrison, 1975).

A goma locusta ou goma alfarroba como também ficou conhecida é obtida a partir de sementes de *Ceratonia siliqua*, esta semente apresenta em peso 30-33% de casca, 42-46% de endosperma e 23-25% de embrião (Glicksman, 1962). É encontrada em diversos países da costa do Mediterrâneo, como Espanha, Portugal e Marrocos. O endosperma de sementes de locusta é praticamente composto por galactomanana pura e é separado das sementes através de um processo que engloba a retirada da casca através de um tratamento drástico com ácidos minerais, seguido de lavagem e secagem em estufas. Em seguida as sementes sem casca são trituradas e o embrião é separado do endosperma através da moagem e peneiramento do material (Wielinga, 1982).

A goma tara é nativa do Peru e suas sementes são similares à locusta, mas seu endosperma representa apenas 20% do peso seco da semente (Neukom, 1989). O mesmo autor afirma que a galactomanana pura só é obtida a partir de sua dispersão em água seguida de precipitação em etanol.

Estruturalmente, as galactomananas apresentam uma cadeia principal formada por unidades β (1 \rightarrow 4) D-manopiranosil com ramificações de α -(1 \rightarrow 6)-D-galactopiranosil (Robinson e col., 1982) (Figura 1).

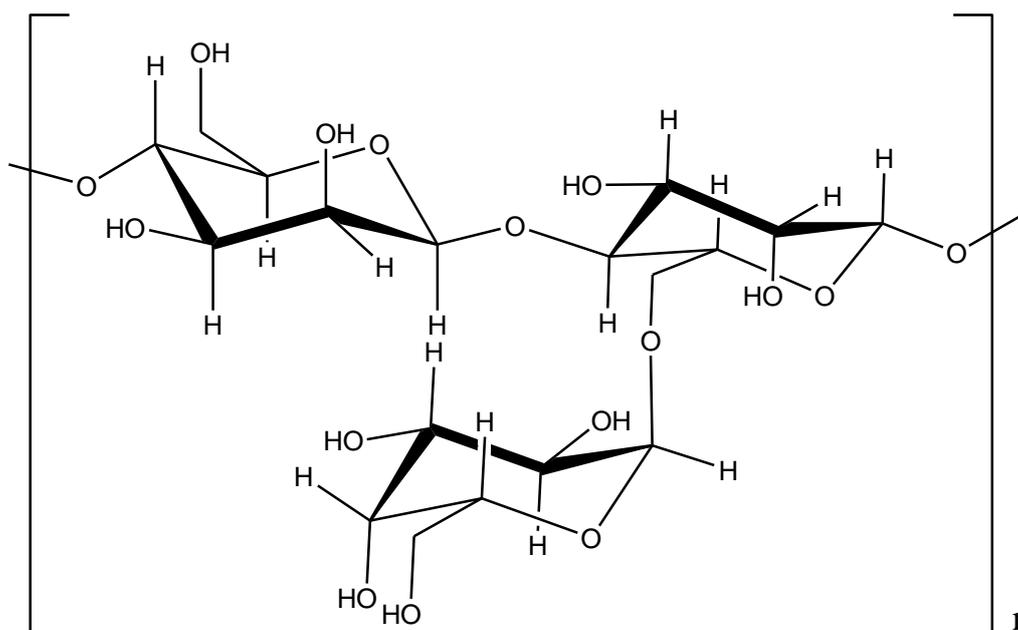


FIGURA 1 – Estrutura química parcial das galactomananas.

De acordo com a origem e espécie da galactomanana, podem ser observadas diferenças na razão manose/galactose (M/G), na massa molar bem como na sua distribuição (Robinson e col., 1982). A proporção de M/G varia entre 1,1 a 4 nas diferentes espécies (Whistler, 1973). A razão da goma de fava danta (1,84) (Cunha e col., 2009) é menor que o valor encontrado para galactomanana extraída de outra espécie de fava danta (*Dimorphandra mollis*), a qual está dentro da faixa de 2,2-2,7 (Panegassi, Serra e Buckeridge, 2000). A Tabela 1 mostra as razões de manose/galactose para galactomananas extraídas de diferentes espécies de sementes brasileiras.

TABELA 1. Razão manose/galactose para galactomananas extraídas de sementes brasileiras.

Espécies	M/G	Referência
<i>Adenantha pavonina</i>	1,35	Cerqueira e col., 2009
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	2,88	Cerqueira e col., 2009
<i>Cassia fastuosa</i>	4,0	Mercê e col., 1998
<i>Dimorphandra gardineriana</i>	1,84	Cunha e col., 2009
<i>Dimorphandra mollis</i>	2,2-2,7	Panegassi e col., 2000
<i>Mimosa scabrella</i>	1,1	Ganter e col., 1995
<i>Schizolobium parahybum</i>	3,0	Ganter e col., 1995
<i>Senna multijuga</i>	2,3	Rechia e col., 1995

Verifica-se que a razão manose/galactose da galactomanana de *Dimorphandra gardineriana* é um valor próximo do encontrado para a goma guar (1,8) e menor que os valores da goma tara (3,0) e goma locusta (4,0) (Cunha e col., 2009; Cheng e col., 2002). Esta razão tem um importante papel na avaliação da solubilidade em água e na dependência da viscosidade da solução com a concentração do polímero (Rinaudo, 2001).

A solubilidade em água depende do conteúdo de galactose substituinte; assim mananas, por exemplo, que não apresentam substituição, são insolúveis em água (McCleary e col., 1981) ao contrário das galactomananas que são solúveis em água e formam dispersões viscosas e estáveis (Meer e Tinker, 1975).

As gomas de sementes podem interagir sinergicamente com vários polissacarídeos, como goma xantana, ágar e carragenana, resultando na formação de gel (Viebke e Piculell, 1992; Zhan e col., 1993). A habilidade das galactomananas interagirem sinergicamente com outros polímeros é geralmente influenciada pela menor quantidade de unidades de galactose (Morris, 1990).

O comportamento sinérgico e as propriedades físico-químicas da galactomanana são importantes para aplicações industriais. Esses polissacarídeos podem ser usados como flocculantes e inibidores sinérgicos (Lucyszyn e col., 2006a; Sorvari e col., 1997), o que os fazem um material de escolha em indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas e têxteis (Shobha e col., 2005). A Tabela 2 apresenta várias aplicações para galactomananas de sementes brasileiras caracterizadas.

TABELA 2. Aplicações testadas para galactomananas brasileiras.

Origem	Aplicações	Referência
<i>Adenanthera pavonina</i>	Filmes	Figueiro e col., 2004
	Liberação de fármaco	Abreu e col., 2006
<i>Caesalpinia pulcherrina</i>	Meio de cultura de fungos	Mesquita e col., 2002
	Filmes finos	Sierakowski e col., 2002
	Filmes para revestimento de frutos	Cerqueira e col., 2006
<i>Cassia fastuosa</i>	Matriz cromatográfica para isolamento de Lectina	Matos, 2000
	Micropropagação de plantas	Lucyszyn e col., 2006
<i>Dimorphandra gardineriana</i>	Extração de Rutina	Phytochemicals, 2008
<i>Dimorphandra mollis</i>	Aditivo na produção de papel	Lima e col., 2003
<i>Leucena leucocephala</i>	Filmes finos	Lucyszyn e col., 2006
	Absorção de albumina	Valenga, 2007
	Antiviral: febre amarela	Ono e col., 2003
<i>Mimosa scabrella</i>	Formulações de xampu, pudim	Sugui, 1994
	Liberação de fármaco	Vendruscolo e col., 2005
	Antiviral: febre amarela	Ono e col., 2003
<i>Schizolobium parahybum</i>	Matriz cromatográfica para isolamento de Lectina	Matos, 2000

1.1.1 POLISSACARÍDEOS DE SEMENTES DA FAVA DANTA

Dimorphandra gardineriana Tul. e *Dimorphandra mollis* Benth, popularmente conhecidas como faveira ou fava danta, pertencem à família *Leguminosae*, são árvores pequenas que habitam os cerrados. A *Dimorphandra mollis* é encontrada em Minas Gerais, São Paulo e Goiás, enquanto que a *Dimorphandra gardineriana* é uma espécie regional dos estados do Maranhão, Bahia, Piauí e Ceará (Cunha e col., 2009; Vieira, 2003).

Ambas possuem porte arbóreo podendo atingir entre 8 – 14 m e seus frutos já são bastante utilizados na produção industrial de rutina, um bioflavonóide com propriedades antioxidantes, antitumorais e antiinflamatórios, e que reforça capilares (vasoprotetor) (Feres e col., 2006; Cunha e col., 2009).

Os frutos destas faveiras são vagens semideiscentes, compridas, medindo até 15 cm de comprimento, mesocarpo farináceo adocicado, mas desagradáveis, muito procuradas pelo gado (Tomassini e Mors, 1966; Corrêa, 1984). Cada vagem produz de 10 a 21 sementes alongadas e avermelhadas. O período de maturação das vagens e formação das sementes é de julho a agosto, podendo estender-se, em algumas áreas, até setembro. As cascas do tronco, pela abundância de taninos, são utilizadas nos curtumes para curtir couros (Tomassini e Mors, 1966; Rizzini, 1963).

Rutina é o terceiro mais importante produto farmacêutico exportado pelo Brasil, onde em 2006 a exportação da rutina representava cerca de US \$ 7,1 milhões (Abiquif, 2008). Para extrair este flavonóide, cerca de 12.000 toneladas por ano de frutos da *Dimorphandra mollis Benth* e *Dimorphandra Gardneriana Tul.* são usados, e cerca 600 ton./ano de sementes são descartadas (Cunha e col, 2009). Destes descartes, cerca de 160 toneladas por ano de galactomananas poderiam ser produzidas, aumentando o valor econômico destas plantações (Cunha e col, 2009).

Estas observações reforçam a grande importância da realização de estudos de obtenção e caracterização das propriedades dessa galactomanana e a comparação com uma de uso industrial consagrado, como a guar, visando a sua substituição. Essa substituição pode gerar vantagens econômicas e ecológicas, com o desenvolvimento de recursos naturais sustentáveis para a população local, resultando num melhor aproveitamento da matéria-prima dessa planta e ampliando o conhecimento da Flora Cearense.

O Brasil apresenta fontes de espécies diversificadas para a extração de gomas de sementes que poderiam suprir a demanda de importação desses polissacarídeos, além de melhorar o valor agregado. No período de 2002 a 2006, a importação de galactomanana correspondeu a um valor aproximado de US\$ 52.100.000,00 (Valenga, 2007). Em 2008, as importações de polissacarídeos cresceram e chegaram a 142 mi US\$, mas as exportações diminuíram (68 mi US\$). O preço médio do produto importado em 2007 foi 4,1 US\$/kg e do exportado 2,3 US\$/kg. O país importa cada vez mais polissacarídeos do que exporta e a um custo médio superior (Cunha e col., 2009).

A investigação sobre a atividade tóxica das favas destas espécies não encontrou nenhuma alteração fisiológica ou de comportamento nos animais em estudo e o material pode ser classificado como praticamente atóxico (Panegassi, Serra e Buckeridge, 2000; Dobereiner e col., 1985; Filho, 1985).

De acordo com os resultados de Cunha e col., 2009, a galactomanana de *Dimorphandra gardneriana* contém, além de manose e galactose, uma pequena parcela de glucose (1,1%), menor que a quantidade normalmente presente na goma guar. Outros monossacarídeos, tais como: arabinose, xilose e ramnose detectados para a guar, não compõem a goma da *Dimorphandra gardneriana* (Cunha e col., 2009). Apesar das galactomananas serem consideradas polissacarídeos neutros, estes mesmos autores relataram para elas, um teor de 2,8% de ácido urônico. De modo similar tem sido detectado, por exemplo, 0,8 e 2,1% de ácido urônico na goma guar (Cunha e col., 2005; Debon e Tester, 2001).

1.2 GÉIS DE POLISSACARÍDEOS

1.2.1 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. Os polissacarídeos em geral são solúveis em água ou formam géis 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.

Um gel é uma rede tridimensional obtida através de ligações das macromoléculas envoltas por um solvente. Géis, como os sólidos elásticos, suportam a própria massa e mantêm a sua forma.

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 Yoshel, 1999).

A presença de grupos funcionais $-OH$, $-COOH$ e $-NH_2$ na estrutura do polissacarídeo propiciam 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 2).

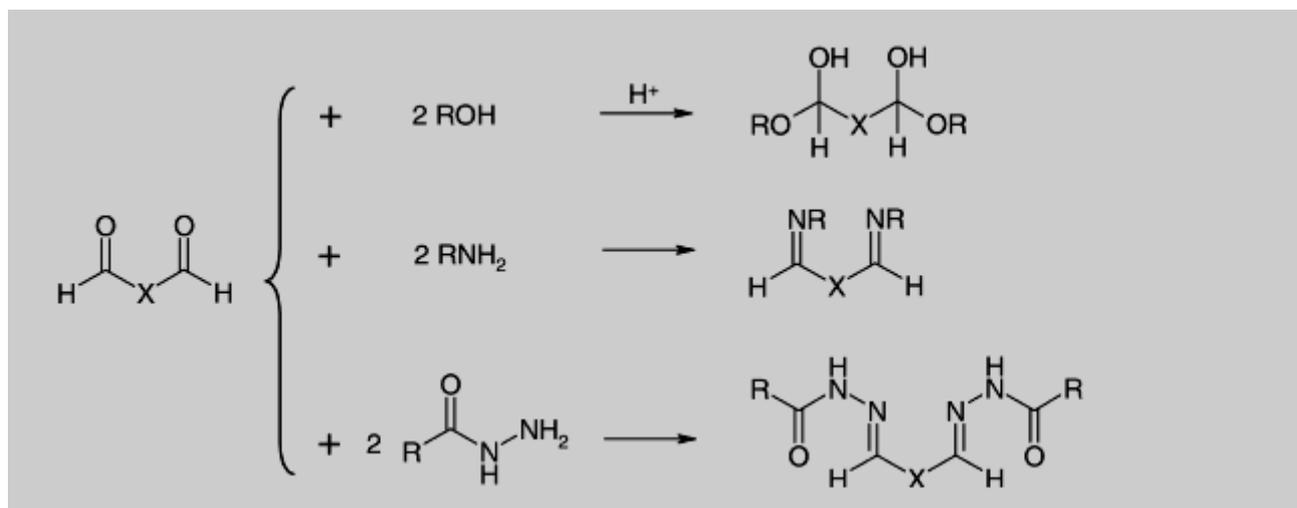


FIGURA 2 – Reticulação de polímeros contendo os grupos álcool, amina ou hidrazina (R representa a cadeia polimérica).

Fonte: Cunha, 2006.

Os agentes reticulantes comumente empregados são: glutaraldeído, epícloridrina ou formaldeído. O glutaraldeído é um importante reagente no campo biomédico. Ele 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).

Porém, tais reticulantes em excesso são tóxicos podendo causar riscos à saúde humana e, portanto, 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).

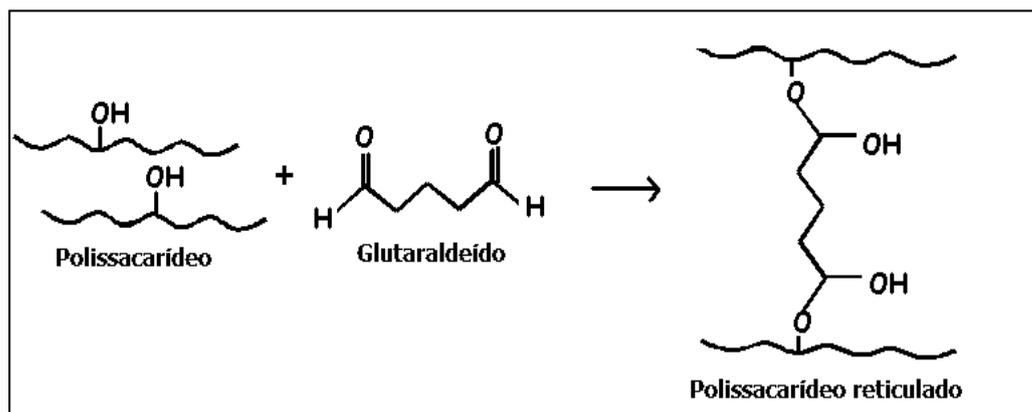


FIGURA 3 – Esquema de reticulação de polissacarídeo com o glutaraldeído.

Fonte: Cunha, 2006.

Para a otimização do emprego industrial dos biopolímeros, tornou-se necessário desenvolver métodos que permitissem prever a estrutura e a função destes polímeros através do conhecimento das conformações adotadas pelos mesmos. Entre os métodos físico-químicos utilizados nessa avaliação estão, por exemplo, as técnicas reológicas.

1.2.2 REOLOGIA

A reologia é a ciência que descreve as propriedades mecânicas dos vários materiais, sob várias condições de deformação, quando eles exibem a capacidade de escoar e/ou acumular deformações reversíveis (Navarro, 1997). Envolve a elasticidade, a viscosidade e a plasticidade. Os materiais, segundo Schramm (2006), podem ser: *sólidos ideais*: os quais se deformam elasticamente; a energia requerida para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida, ou *fluidos ideais*: líquidos e gases que se deformam irreversivelmente e fluem. Neste caso, a energia requerida para a deformação é dissipada sob forma de calor e não pode ser recuperada pela remoção da tensão.

Os corpos reais não são nem sólidos ideais e nem fluidos ideais. A grande maioria dos líquidos apresenta um comportamento reológico que os classifica entre sólido e líquido: são elásticos e viscosos, portanto, chamados de viscoelásticos (Schramm, 2006).

A viscosidade é a grandeza que mede o atrito entre camadas consecutivas de líquido, ou seja, a resistência de um fluido a qualquer mudança do seu volume, sendo também função do cisalhamento (*shearing*), que é a força necessária para causar o movimento das camadas, e ocorre quando o fluido se move fisicamente ou é distribuído. Assim, fluidos viscosos necessitam de mais força para se mover que aqueles menos viscosos (Milas e Rinaudo, 1991; Schott, 1992; Berriaud, Milas e Rinaudo, 1994). Medidas de viscosidade de soluções poliméricas, além do interesse prático, fornecem informações importantes na caracterização molecular de polímeros.

A viscosidade destas soluções depende de alguns parâmetros: natureza físico-química de uma substância; temperatura; pressão; taxa de cisalhamento; tempo; e de uma série de fatores, tais como: tamanho e conformação da molécula, massa molecular, concentração em polímero e flexibilidade da cadeia.

Isaac Newton foi o primeiro a descrever o comportamento de fluxo de um líquido ideal ao relacionar $\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma}$, onde σ é a tensão de cisalhamento; η é a viscosidade e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento.

A tensão de cisalhamento é a força aplicada tangencialmente em uma área, sendo a interface entre a placa superior e o líquido abaixo, gerando um fluxo na camada líquida (Schramm, 2006), cuja velocidade máxima se encontra na camada superior e diminui atravessando o material. No fluxo laminar, uma camada infinitamente fina de líquido desliza sobre a outra e o gradiente de velocidade é denominado taxa de cisalhamento.

Os fluidos podem ser classificados como líquidos Newtonianos e não-Newtonianos. Os Newtonianos são aqueles em que a viscosidade não é afetada por mudanças da taxa de cisalhamento. Os que não apresentam esse comportamento são chamados de não-Newtonianos. Os não-Newtonianos podem ainda ser divididos em pseudoplástico, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e sua estrutura é recuperada quando a taxa de cisalhamento retorna a zero; e dilatante, em que a viscosidade aumenta com a taxa de cisalhamento. A maioria das soluções diluídas de biopolímeros apresenta comportamento Newtoniano e as soluções mais concentradas, pseudoplástico (Morris e col., 1981).

Em sistema oscilatório, as soluções de gomas possuem comportamento entre sólido ideal e líquido ideal e podem ser classificadas de acordo com valores obtidos para os módulos G' ou G'' . Os géis, geralmente, apresentam propriedades viscosas e elásticas, porém observa-se uma preponderância do G' sobre o G'' .

O módulo de armazenamento, G' , denominado módulo de cisalhamento elástico, é a razão entre a tensão aplicada e a deformação provocada em fase; indica que a energia de tensão é armazenada temporariamente durante o teste e pode ser recuperada mais tarde. O módulo de perda, G'' , denominado módulo de cisalhamento viscoso, é a razão entre a tensão aplicada e a deformação provocada fora de fase; nesse caso, a energia usada para iniciar o fluxo é irreversivelmente dissipada ou perdida, sendo transformada em calor de cisalhamento (Morris, 1995; Schramm, 2006).

Na reologia oscilatória pode-se medir o caráter sólido da amostra através do módulo G' . Quanto maior for o valor de G' , maior é o caráter sólido do gel (Walter, 1998) e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (Rao, 1992). Pode-se também medir o módulo G'' , que indica o caráter líquido do material.

Quando a amostra polissacarídica apresenta o módulo de cisalhamento elástico (G') muito maior do que o módulo de cisalhamento viscoso (G''), ambos independentes da frequência na região de viscoelasticidade, tem-se um material de caráter predominantemente sólido. Tratando-se, portanto, de um gel forte (Oliveira, 2001). A Figura 4 mostra um gráfico para sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas.

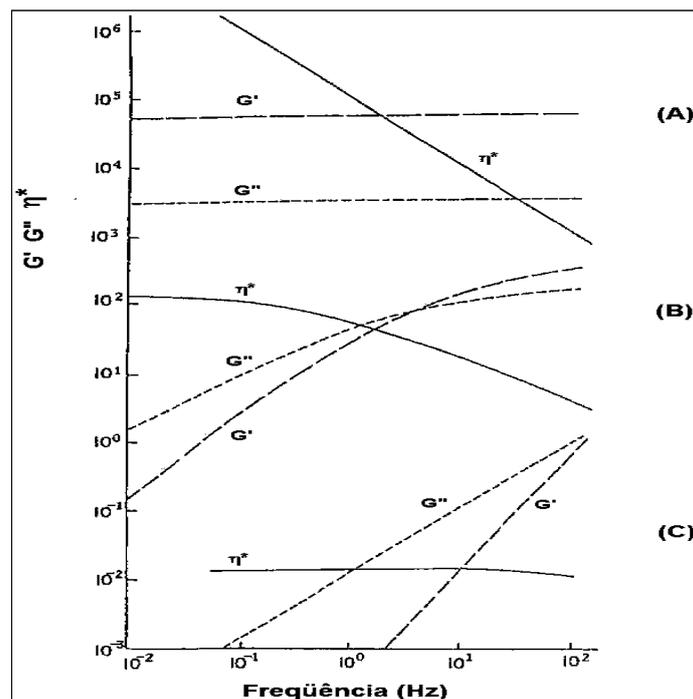


FIGURA 4 - Representação gráfica de sistemas polissacarídicos típicos: (A) gel forte; (B) solução concentrada; (C) solução diluída.

FONTE: Morris, 1995.

A Figura 4(A) representa um perfil característico de um gel de polissacarídeo. O módulo G' é muito maior que G'' em toda a faixa de frequência utilizada no experimento, isto é, apresenta uma resposta predominantemente sólida, e ambos os módulos G' e G'' são essencialmente independentes da frequência, como esperado para uma rede elástica (Kavanagh e Ross-Murphy, 1998; Rao, 1992; Walter, 1998).

Soluções concentradas de polímeros apresentam comportamento de fluxo semelhante ao de um líquido em baixas frequências, onde há predomínio de G'' (Morris, 1990), devido à reorganização da rede enquanto a frequência é baixa (Figura 4(B)). Quando a frequência vai aumentando em relação à reorganização molecular, ocorre distorção da rede, com G' aumentando mais rapidamente que G'' . Desta maneira, os módulos tornam-se praticamente iguais e se cruzam em determinado ponto, que é o ponto de geleificação, a partir do qual G' é maior que G'' e há predomínio do caráter sólido (Kavanagh; Ross-Murphy, 1998; Morris, 1984).

O comportamento típico de uma solução polimérica diluída é demonstrado na Figura 4(C), onde o módulo G' é significativamente mais baixo que o módulo G'' , e ambos tendem a zero quando a frequência tende a zero. Em baixas frequências predomina o movimento translacional, onde a energia é dissipada por entre o solvente. Em frequências mais altas, ocorre maior movimento de contorção das cadeias e armazenamento de energia, e G' aproxima-se de G'' (Morris, 1984).

1.2.3 APLICAÇÃO DE GÉIS NO TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma das doenças articulares mais frequentes na população de idade avançada, que causa incapacidade e dor (Greenberg e col., 2006). Evidências radiográficas de OA ocorrem na maioria das pessoas de 65 anos de idade, e em 80% daquelas com idade superior a 75 anos (Denisson e Cooper, 2003). Em números absolutos, estima-se que existam, hoje, aproximadamente 15 milhões de pessoas com osteoartrite no Brasil (Neto, 2006).

A OA é uma progressiva desordem degenerativa caracterizada pelo esgotamento da cartilagem articular, deteriorização do fluido sinovial presente nas articulações e osteoesclerose subcondral acompanhada por formação de osteófitos (Bailleul, 2006; Buckwalter e Martin, 2006).

Em estágios clínicos da doença, são observadas alterações na membrana sinovial, normalmente associadas a reações inflamatórias (Pelletier, 2004).

Dentre as funções do fluido sinovial, pode-se destacar a lubrificação da cartilagem articular durante os movimentos e a nutrição da cartilagem, sendo, portanto requerido que este fluido tenha uma alta viscoelasticidade (Edwards, 2003). Em alterações patológicas sinoviais, ocorre uma variação na quantidade do líquido sinovial e uma diminuição dessa viscoelasticidade, resultando em dores nas articulações e subsequente decréscimo na mobilidade desta (Pozo e col., 1997).

O fluido sinovial é obtido por ultra filtração do plasma sanguíneo através de capilares sinoviais e posterior adição de ácido hialurônico (AH)

(Edwards, 2003). A viscoelasticidade e a reologia deste fluido são influenciadas fortemente pela presença do AH. Esta viscoelasticidade é essencial para o funcionamento normal das articulações (Brockmeier e col., 2006).

O ácido hialurônico 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 glicosídica β (1 \rightarrow 3). Tais unidades dissacarídicas são unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) (Kirwan, 2001; Prieto e col., 2005) (Figura 5).

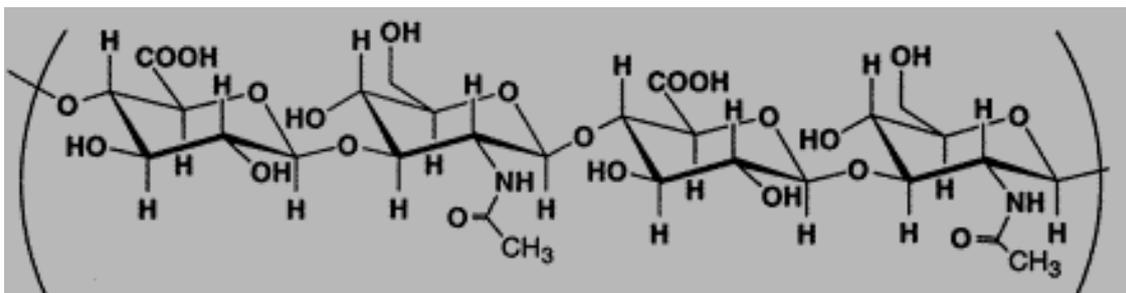


FIGURA 5 - Estrutura do ácido hialurônico.

FONTE: Cunha, 2006.

A massa molar média do AH presente no fluido sinovial é $5 - 7 \times 10^6$ g/mol. O joelho adulto normal contém aproximadamente 2 mL de fluido sinovial, com uma concentração de ácido hialurônico de 2,5 a 4,0 mg/mL. Em osteoartrite de joelho, a concentração de AH é reduzida por um fator de 2 ou 3 devido a diluição e à degradação (Brockmeier e col., 2006).

Além disso, a massa molar do hialuronato presente é reduzida para 2×10^5 g/mol. Estas alterações levam à mudança nas propriedades viscoelásticas do fluido sinovial e dessa forma, altera as funções mecânicas das articulações. A cartilagem torna-se, portanto, mais vulnerável (Brockmeier e col., 2006; Clarcke e col., 2005; Prieto e col., 2005).

Além das propriedades viscoelásticas do AH nas articulações, existem outras tais como: atividades antiinflamatórias, ação analgésica, atuação no metabolismo de células sinoviais e condrociais. Isto sugere que o AH e seus derivados são agentes modificadores no tratamento de osteoartrite, ao invés de agentes meramente paliativos (Brockmeier e col., 2006).

As causas da OA não são totalmente conhecidas, mas suas chances de ocorrência aumentam com a idade, fatores hereditários, excesso de peso, esforço repetitivo e a presença de outro tipo de artrite (The Arthritis Society, 2006).

Dentre os muitos tratamentos empregados na osteoartrite, encontra-se a chamada viscosuplementação. Originalmente introduzido por Balazs e Denlinger na década de 70, o termo *viscosuplementação* significa o restabelecimento das propriedades viscoelásticas do fluido sinovial mediante administração intra-articular de soluções de ácido hialurônico de elevada massa molar e seus derivados. Segundo esses pesquisadores, o restabelecimento ou a suplementação da viscosidade do fluido sinovial na OA poderia melhorar a funcionalidade articular e conseqüentemente reduzir os sintomas dessa 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 $5,0 \times 10^5$ a $7,5 \times 10^5$ g/mol) (Pasquali 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 (Kirwan, 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).

Essa técnica terapêutica foi primeiramente aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 1997. A segurança da viscosuplementação de AH foi estabelecida devido ao uso clínico por mais de duas décadas. Nos Estados Unidos, cinco viscosuplementantes são usados atualmente: Hyalgan

(Sanofi-Aventis), Synvisc (Genzyme Biosurgery), Supartz (Smith and Nephew), Orthovisc (Anika Therapeutics) e Euflexxa (Ferring).

Hyalgan, Orthovisc e Supartz são preparações de hialuronato de sódio; Synvisc é constituído somente de hilanos, que são hialuronatos reticulados e o Euflexxa é um hialuronato obtido por fermentação (Brockmeier, 2006).

O Hilano G-F 20 (Synvisc) foi o primeiro hialuronato reticulado avaliado nos Estados Unidos. Ele consiste de uma combinação das formas fluido e gel na razão de 4:1, respectivamente, ou seja, 20% de gel. A massa molar deste produto é de 6×10^6 g/mol, similar a do AH em articulações saudáveis (Brockmeier, 2006).

Outros materiais têm sido propostos para uso em viscosuplementação, como misturas de hialuronato com alginato (Pelletier e col., 2001) e hidrogel de dextrana com glicidil metacrilato (Burdick e col., 2004). O uso de dextrana para viscosuplementação foi uma das primeiras propostas de utilização de polissacarídeo diferente de ácido hialurônico ou seus derivados para o tratamento de osteoartrite. Atualmente existem algumas patentes que propõem o uso de biomateriais no tratamento de osteoartrite: Polissacarídeos extraídos de paredes celulares de microalgas são indicados para lubrificação articular (Dillon e col., 2007); A injeção intra-articular de micropartículas poliméricas biodegradáveis é descrita como um método de tratamento de osteoartrite (Brown e col., 2007); A patente mais recente relata derivados aminados de ácido hialurônico, particularmente hexadecilamida de AH, como substituto parcial ou total do fluido sinovial (Schiavinato e col., 2008). Nacionalmente, hidrogéis de goma guar (polissacarídeo neutro extraído de sementes) têm sido avaliados para substituir hialuronatos comerciais (Cunha e col., 2005).

Em seu extenso estudo, Cunha (2006) obteve vários resultados importantes acerca de polissacarídeos com ação terapêutica na osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Constatou-se inicialmente, que a presença de contaminantes agregados à estrutura da goma guar, em especial proteínas, encontrada em valor de 3,64% (Cunha e col., 2007), resulta em inflamação das articulações e dor quando administrada nas articulações de ratos Wistar. No entanto, com o processo de purificação

empregado, a goma guar administrada em solução na articulação de ratos Wistar não causa nem inflamação e nem dores significativas (Castro e col., 2007).

A goma purificada, tanto em solução, quanto em gel, tem potencial para ser utilizada no tratamento da osteoartrite, já que ambos apresentaram analgesia (diminuição da dor) em ratos Wistar acometidos de osteoartrite semelhante ao que apresentou o Hilano G-F 20 (Castro e col., 2007). O gel de guar, obtido pela reticulação da goma com glutaraldeído, apresentou um valor de viscosidade 40 vezes maior que o da solução original de goma. A viscosidade final é similar à do Hilano G-F 20 (Cunha e col., 2005).

A viscosidade não deve ser a única responsável pela redução da dor em tratamento de osteoartrite por viscosuplementação, já que a goma purificada tanto em gel como em solução tiveram efeito de analgesia semelhante (Cunha, 2006). Nos dados de caracterização química da guar, encontra-se que a goma possui uma pequena quantidade de monossacarídeos contaminantes, tais como: glucose (3,1%) e arabinose (4,4%). Os autores também detectaram na goma, o teor de ácido urônico (3,3%) e no gel, o teor de glutaraldeído residual (0,157mg/mL) o qual foi muito menor que a dose letal necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população de animais em estudo (DL_{50}) (Cunha e col., 2005). Visto que no processo de purificação usa-se um reagente que contém cobre em sua composição, investigou-se também o teor de cobre na goma guar purificada e o valor obtido foi de 792 ppm.

Cunha (2006) observou também que a goma guar carboxilada e a goma guar sulfatada não reduziram a dor em modelo de osteoartrite por TLCA 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.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é estudar as propriedades físicas e químicas de galactomananas de fava danta (*Dimorphandra Gardneriana*) e seus géis, com a finalidade de utilizá-los, futuramente, na viscosuplementação das articulações do joelho humano em substituição às soluções de hialuronatos comerciais (Hilano G-F 20) ou ao próprio líquido sinovial.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair galactomanana dos endospermas das sementes de fava danta.
- Realizar procedimento de purificação da galactomanana, para permitir a retirada completa de proteína presente e outros polissacarídeos contaminantes que não devem estar presentes em materiais que serão testados no espaço intra-articular.
- Reticular a goma de fava danta para a obtenção de um gel com fluidez suficiente para ser aplicado e testado no espaço intra-articular e que possa ser comparado reologicamente aos produtos comerciais utilizados em viscosuplementação.
- Estudar as propriedades reológicas das soluções e dos géis da galactomanana de fava danta e comparar com as propriedades do gel de guar e com o Hilano G-F 20 (SYNVISC®).
- Caracterizar via métodos físico-químicos as amostras não purificada e purificada, tanto em solução quanto em gel, bem como compará-los com as amostras de goma guar correspondentes.

3. EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS

A goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) foi proveniente da Sigma Corporation. As vagens da fava danta foram coletadas no Crato, no sul do estado do Ceará, no período de Agosto-Setembro de 2006. As sementes foram retiradas das vagens manualmente. O SYNVISC® (Hilano G-F 20), formulação utilizada como substituto temporal e como suplemento ao líquido sinovial em pacientes acometidos com osteoartrite, é fabricado pela Genzyme Corporation e foi proveniente da BIOMATRIX, sendo utilizado neste trabalho como fornecido pelo fabricante. O glutaraldeído (25%) da Vetec Química Fina LTDA, Brasil, foi o agente reticulante utilizado para a obtenção dos géis.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Extração da galactomanana da semente da fava danta (*Dimorphandra gardineriana*)

A galactomanana da fava danta foi isolada seguindo o método descrito por Cunha e col. (2009). Uma massa de 20 gramas de semente de fava danta foi intumescida em 80 mL de água fervente por 20 minutos sob agitação magnética, seguida de um período de 24 h à temperatura ambiente sem agitação. As sementes intumescidas foram descascadas manualmente, separando-se o endosperma, retirando também o tegumento e o embrião.

Os endospermas separados foram colocados em 200 mL de água sob agitação por 16 horas para completar o intumescimento. Posteriormente, foram adicionados 500 mL de água destilada e após uma rápida agitação a mistura foi processada em liquidificador. À solução viscosa obtida adicionou-se mais 500 mL de água e o sistema deixado sob agitação por 2 horas. Logo em seguida, centrifugou-se esta solução por 30 minutos a 6000 rpm.

Após centrifugação, separou-se a solução sobrenadante e com o material sedimentado preparou-se uma suspensão, adicionando 150 mL de água destilada sob agitação, a qual foi centrifugada a 6000 rpm por 30 minutos. À solução sobrenadante obtida nesta etapa misturou-se a solução sobrenadante anterior. A galactomanana solúvel no somatório de sobrenadantes foi precipitada, lentamente e sob agitação moderada, em álcool etílico comercial 96% na proporção de 1:3 (volume de solução de goma/volume de álcool). O precipitado de galactomanana obtido foi recolhido em um funil de placa sinterizada porosidade média, lavado com álcool etílico e acetona P.A, sendo depois seco com ar quente.

O material seco obtido foi denominado goma da fava danta não purificada (GFDNP). Pesou-se o pó obtido e o procedimento teve seu rendimento calculado.

3.2.2. Purificação da galactomanana da fava danta

3.2.2.1. Método Fehling

Em estudos preliminares, Cunha (2006) verificou que a presença de proteínas em galactomanana promovia incapacitação articular e influxo celular na cavidade articular. No intuito de excluir a contaminação protéica, possível responsável por essas ações, procedeu-se à purificação.

Este procedimento segue a metodologia de purificação de polissacarídeos como no método 3 descrito por Cunha e col. (2007).

Inicialmente, foram preparadas duas 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 hidratado 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.

No processo de purificação pelo método de Fehling, 1,0 grama de goma da fava danta foi misturada a 100 mL de água destilada e a mistura deixada por 24 horas sob agitação à temperatura ambiente. À solução formada adicionou-se 5 mL de solução de Fehling recém-preparada e agitou-se bastante com bastão de vidro, observando-se a formação de um precipitado azulado. A mistura foi deixada sob refrigeração (10°C) por 17 horas. Decorrido esse tempo, separou-se o precipitado formado da solução sobrenadante e adicionou-se 80 mL de ácido clorídrico 0,1M sob agitação por uma hora à temperatura ambiente.

Após a dissolução, adicionou-se à solução 240 mL de etanol e o precipitado (galactomanana) obtido foi filtrado em funil de placa sinterizada porosidade média e lavado com etanol e acetona sucessivas vezes. A goma de fava danta purificada, denominada de GFDP, foi então pesada e o rendimento calculado.

3.2.3. Reticulação das galactomananas de fava danta e de guar

Com a finalidade de preparar um hidrogel com propriedades viscoelásticas semelhantes às do Hilano G-F 20, foi realizada a reticulação das galactomananas de fava danta e guar, não-purificada e purificada, com glutaraldeído.

O procedimento de reticulação utilizado neste trabalho foi baseado no procedimento de Gliko-Kabir e col. (1999). Uma solução de goma 0,8% foi preparada pela solubilização de 0,16 g da goma em 20 mL de água destilada e após 24 horas de agitação o pH desta foi ajustado para 2 com solução de ácido sulfúrico 0,1 M. À solução foi adicionada 0,5 mL de glutaraldeído (agente reticulante) da VETEC 25% (GA) sob agitação, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida após a formação do gel, retirando o sistema reacional da agitação e realizando uma 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/salina 0,1M (pH = 7,3), durante 24 horas na proporção de 100:1 de volume de tampão para volume de gel.

3.2.3.1. Cinética de reticulação das galactomananas de fava danta e de guar

A cinética da reação foi acompanhada por medidas reológicas de fluxo e oscilatório, durante um período de 30 dias, através do reômetro da TA INSTRUMENTS, modelo AR 550, a uma temperatura constante de 36°C com geometria cone-placa 40 mm e ângulo de 0° 59' 1".

3.2.4. Caracterização dos materiais

3.2.4.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros dos compostos foram obtidos em amostras preparadas na forma de pastilhas, dispersas em brometo de potássio (KBr), utilizando-se um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR da ABB Bomem FTLA 2000-102, apresentando uma janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.2.4.2. Determinação do teor de proteínas através da análise elementar

As amostras de goma da fava danta purificada e não purificada (GFDP e GFDNP) foram submetidas à análise elementar em um microanalisador CARLO ERBA EA1108. O teor de proteínas foi estimado pelo teor de nitrogênio obtido para cada amostra nessa microanálise, uma vez que a estrutura da goma de fava danta não possui átomos de nitrogênio. O cálculo foi realizado utilizando-se um fator de conversão igual a 5,85, usual para proteínas de origem vegetal (Azero e Andrade, 2002).

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

Com a possibilidade de aplicação farmacológica é importante avaliar a quantidade de cobre nas amostras. O teor desse metal foi quantificado por espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP), para as amostras de goma de fava danta não purificada (GFDNP) e purificada (GFDP).

A digestão das amostras foi realizada utilizando-se 0,1 g de cada goma, sendo estas pesadas diretamente em tubo de teflon (em duplicata), adicionando em seguida 3 mL de solução composta de HNO₃ e H₂O₂, ambos P.A., 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 trinta minutos. Depois dessa etapa, os tubos foram resfriados em banho de água corrente à temperatura ambiente. Transferiu-se a solução resultante da digestão do polissacarídeo para tubos de Falcon e diluiu-se para um volume final de 20 mL. Estes foram armazenados à temperatura ambiente para posterior análise em ICP-OES.

Foram preparadas quatro soluções padrão multielementares em tubos de Falcon, sendo acrescentados 25, 125, 250 e 300 µL de soluções padrão de cada elemento (microconstituintes): 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 no polissacarídeo estão indicadas na Tabela 3.

TABELA 3 – Configurações do equipamento de ICP-OES utilizadas para análise da goma de fava danta.

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

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 uma curva de calibração.

3.2.4.4. Medidas turbidimétricas

3.2.4.4.1. Determinação da turbidez por espectroscopia na região do visível

Foram preparadas soluções aquosas das gomas (GFDNP e GFDP) pela solubilização de 0,1 g de amostra em 100 mL de água deionizada através de agitação por 24 horas. Os espectros eletrônicos na região do visível das soluções foram obtidos em um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 diode array, acoplado a um computador, utilizando célula de quartzo retangular de caminho ótico de 1 cm, à temperatura ambiente.

Os valores estimados de turbidez foram então obtidos pela absorbância a 500 nm, usando como branco a própria água deionizada que foi utilizada no preparo das soluções.

3.2.4.4.2. Determinação da turbidez por turbidímetro

Foram preparadas soluções das gomas (GFDNP, GFDP, GGuarNP, e GGuarP) em água pela solubilização de 0,1 g de amostra em 100 mL através de agitação por 24 horas. As soluções foram então analisadas em um

turbidímetro Orbeco-Hellige modelo 966 à temperatura ambiente (~28°C). O instrumento foi calibrado com solução coloidal padrão (40 NTU).

3.2.4.5. Estimativa da distribuição de massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Foram preparadas soluções 0,1% das gomas (GFDNP e GFDP) em água miliQ filtrada e sonicada. Tais soluções foram filtradas com membrana MILIPORE de porosidade 0,45 µm e em seguida adicionado etilenoglicol como padrão interno.

A distribuição da massa molar foi determinada através de Cromatografia de Permeação em Gel, utilizando um sistema cromatográfico tipo HPLC da Shimadzu constituído de uma bomba modelo LC-10AD funcionando isocraticamente com os detectores de índice de refração modelo RID-6A e UV-VIS SPD-10AV, ambos da Shimadzu. Foi utilizada uma coluna Ultrahydrogel Linear de 7,8 x 300 mm, com fase móvel NaNO₃ 0,1 M, à temperatura ambiente e fluxo de 0,5 mL/min. O volume injetado das amostras foi de 50 µL.

A curva de calibração para a determinação da massa molar foi construída utilizando-se soluções padrões de pululana (Shodex P-82, da Shawa Denko) com massas molares no intervalo de 10³ a 10⁵ g/mol.

3.2.4.6. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica das amostras de goma de fava danta (GFDNP e GFDP) e das amostras de gel de goma de fava danta não-purificada e purificada (GelGFDNP e GelGFDP) liofilizados 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 na faixa de 25-900 °C e a massa de amostra foi de 10 mg.

3.2.4.7. Análises Reológicas

3.2.4.7.1. Reologia de fluxo

Os estudos reológicos de fluxo foram realizados com soluções 0,8% das amostras não purificadas e purificadas da goma de fava danta e da goma guar em tampão fosfato/salina (0,1 M/0,15 M) (GFDNP, GFDP, GGuarNP e GGuarP) e com os géis antes e depois da diálise (GelGFDNP, GelGFDP) e do Hilano G-F 20. O equipamento utilizado foi o reômetro da TA Instruments modelo Advanced Rheometer 550 (AR 550) em sensor do tipo cone-placa de diâmetro de 40 mm e ângulo de $0^{\circ} 59' 1''$, a 36°C e uma taxa de cisalhamento de $0,1 \text{ s}^{-1}$ a 1000 s^{-1} .

3.2.4.7.2. Reologia oscilatória

Os parâmetros viscoelásticos das amostras submetidas à reticulação foram medidos periodicamente e o comportamento viscoelástico dos géis (GelGFDNP, GelGFDP) e do Hilano G-F 20 foram analisados através do sistema dinâmico ou oscilatório em sensor do tipo cone-placa de diâmetro de 40 mm e ângulo de $0^{\circ} 59' 1''$ em um reômetro da TA Instruments modelo Advanced Rheometer 550 (AR 550), com frequências oscilatórias variando de 0,01 Hz a 10 Hz, mantendo tensão constante em 4 Pa, a 36°C .

3.2.4.8. Teor de água nos géis GFDNP e GFD

Para a determinação do conteúdo de água, uma massa de aproximadamente 1 g de amostra foi pesada em um pequeno frasco previamente pesado e posta para congelar em freezer (-18°C). Liofilizou-se o frasco contendo o gel congelado. Depois do material seco, o frasco foi mais uma vez pesado. O conteúdo de água foi calculado considerando a massa do hidrogel úmido e a massa do hidrogel seco.

3.2.4.9. Teor de glutaraldeído residual nos géis GFDNP e GFDP

Já que o glutaraldeído tem toxicidade considerável, o teor residual deste reagente no hidrogel de goma de fava danta foi determinado, tendo em vista a viabilidade destes géis como protótipos de medicamentos.

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, que se refere ao GA polimérico e outra em 280 nm, que se refere ao GA monomérico (Kawahara e col., 1992).

Foram preparadas soluções de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M nas concentrações de 0,0025; 0,005; 0,01; 0,015 e 0,020 M. As absorbâncias destas soluções a 235 nm e 280 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 residual nas amostras dos géis, um volume de 2 mL de cada gel foi misturado a 10 mL de água, deixando sob agitação 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/salina 0,2 M, e obteve-se o espectro na região do ultravioleta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento

A presença de galactomanana nas sementes de *Dimorphandra mollis* foi relatada inicialmente por Franco e col. (1996). Nesse trabalho a técnica de extração teve um rendimento de 40% de galactomanana a partir de sementes.

O rendimento da galactomanana não purificada de fava danta foi calculado considerando-se a massa inicial de sementes postas para intumescer e a massa de galactomanana obtida após o método de extração.

O valor do rendimento da galactomanana em relação à massa de semente foi de 32%. Cunha e col. (2009) obtiveram um resultado muito semelhante (31%) para galactomanana extraída da mesma espécie de sementes que este trabalho. Tais percentuais são similares ao de galactomananas extraídas de outras espécies de sementes tais como: *Gleditsia macracantha* (21.7%) (Rakhmanberdyeva e col., 2005); *Trigonella foenumgraecum* (22.6%) (Brummer, Cui, e Wang, 2003); *Cassia javanica* (26%) (Andrade e col., 1999); *Caesalpinia pulcherrima* (25%) (Cerqueira e col., 2009; Andrade e col., 1999); *Gleditsia triacanthos* (24,73%) (Cerqueira e col., 2009) and *Cyamopsis tetragonolobus* (24–35%) (Dea e Morrison, 1975).

Algumas extrações de galactomananas têm um rendimento consideravelmente menor, como observado para *Lotus corniculatus* (4,54%) (Egorov e col., 2003); *Sophora japonica* (9,22 - 3,33%), *Adenantha pavonina* (17,11%) (Cerqueira e col., 2009) and *Prosopis juliflora* (10-16%) (Vieira e col., 2007; Azero e Andrade, 2002). Contudo, o rendimento médio de extração de galactomananas de mais de 30 espécies de sementes brasileiras é de 30% (Vendruscolo, 2005), semelhante ao valor encontrado para o rendimento de polissacarídeo da *Dimorphandra gardineriana*.

A purificação da goma da fava danta teve como objetivo 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.

A galactomanana de fava danta purificada pelo método de Fehling obteve um rendimento médio de 80%. Esse rendimento foi um pouco superior ao obtido por Cunha (2006) na purificação de goma guar pelo mesmo método (75%). A Figura 6 mostra a goma de fava danta não purificada (GFDNP) e goma de fava danta purificada pelo método Fehling (GFDP). Observando a fotografia percebe-se que o aspecto macroscópico da amostra de goma de fava danta antes e após o tratamento de purificação quase não mudou.



FIGURA 6 – Amostra de goma de fava danta não purificada (GFDNP) e goma de fava danta purificada (GFDP).

Já as amostras de goma guar não purificada (GGuarNP) e goma guar purificada (GGuarP), mostradas na Figura 7, apresentam mudança significativa. Pela imagem, observa-se o clareamento da amostra de goma guar após o tratamento de purificação.

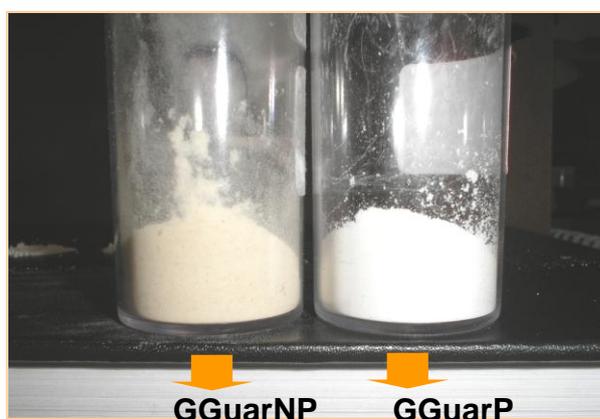


FIGURA 7 – Amostra de goma guar não purificada (GGuarNP) e guar purificada (GGuarP).

4.2. 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 igual a 5,85 (Azero e Andrade, 2002) para calcular o teor de proteína. Os teores de proteína para a goma de fava danta não purificada e purificada estão mostrados na Tabela 4.

TABELA 4 – Percentual de Nitrogênio e Teor de proteína para GFDNP e GFDP.

Amostra	% Nitrogênio	% Proteína
GFDNP	0,36	2,11
GFDP	0,23	1,35

Proteína é um contaminante comum em polissacarídeos naturais. A galactomanana de *Dimorphandra gardineriana* não purificada (GFDNP) mostra uma quantidade considerável de proteína (2,11%) considerando-se a aplicação farmacológica.

Em galactomananas extraídas de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* e de *Dimorphandra mollis* foi detectado um teor de proteína de 3,64% e 8,3-16,8% (Cunha, 2006; Panegassi, Serra e Buckeridge, 2000), respectivamente. Entretanto, o método de obtenção da galactomanana da *D. mollis* é diferente. Nesse processo, as sementes são somente moídas e peneiradas. No trabalho de Cunha e col. (2009), o teor de proteína para galactomanana obtida da mesma espécie de semente que a deste trabalho foi de 1,75%.

Essa proteína pode ser um contaminante ou pode estar associada com a cadeia do polissacarídeo, via ligação covalente (Debon e Tester, 2001).

O teor de proteínas apresentado pela amostra não purificada (GFDNP) é quase duas vezes o percentual da purificada (GFDP), esse tratamento propiciou uma redução de 36%.

Segundo Cunha (2006) o teor de proteínas da goma guar comercial da Sigma (GGuarNP) foi de 3,64% e o da goma guar purificada (GGuarP) pelo mesmo método que a fava danta foi de 0,94%. Para a GGuarNP o percentual

obtido foi superior ao da GFDNP, enquanto que para a GGuarP o valor foi inferior ao da GFDP. No caso da goma guar, na sua forma comercialmente disponível, a razão do valor mais elevado se deve ao processo industrial de obtenção, que faz uma moagem e depois peneira o material.

Aproximadamente 25% da semente de guar consistem em embrião, sendo esta rica em proteínas (48% de massa seca). Uma larga porção (60-70%) são proteínas como globulinas (insolúveis em água), e o restante são proteínas funcionais (enzimas, inibidores, etc) (Rakhmanberdyeva e col., 2005). Estas proteínas podem então ser arrastadas durante o processo de extração da goma.

A purificação resultou numa redução do teor de proteína. O método Fehling se baseia na remoção de proteínas livres e outros polissacarídeos por complexação da goma 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 (Brummer, Cui e Wang, 2003).

No trabalho de Andrade e col. (1999) uma amostra da goma locusta 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.

4.3. Determinação do teor de cobre na amostra de GFDNP e GFDP por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES)

A relação linear da curva de calibração de cobre obtida no ICP é mostrada na equação abaixo:

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

Onde, I é a intensidade do sinal e C é a concentração do elemento.

A quantificação foi feita aplicando-se o valor obtido de intensidade média do sinal na equação da curva padrão mostrada anteriormente.

Os valores do teor de cobre para as amostras de goma da fava danta não purificada e purificada (GFDNP e GFDP) foram respectivamente, zero ppm e 783 ppm.

A amostra GFDNP não contém cobre, como previsto, mas na amostra GFDP o metal está presente. Isso indica que o processo de purificação com a solução de Fehling, que contém composto com cobre (CuSO_4), acarreta o aumento deste elemento químico no material obtido.

Ao comparar-se estes dados com os valores de teor de cobre encontrados na goma guar, observa-se que seguem a mesma tendência com relação ao processo de purificação e as concentrações obtidas em ambas as gomas são bastante similares. Para as amostras de goma guar não purificada e purificada os valores obtidos foram de zero ppm e 792 ppm, respectivamente. (Cunha, 2006). O valor obtido para a goma de fava danta purificada ainda foi ligeiramente inferior ao da goma guar purificada.

Com o intuito de utilizar esses materiais na viscosuplementação, a qual faz uso intra-articular de 2 mL de solução injetável de Hilanos por articulação afetada, é importante calcular a concentração de cobre em 2 mL de solução de GFDP. Considerando então o volume da injeção e a massa de goma contida neste volume, para uma concentração 0,8% de GFDP, o teor de cobre obtido é de 6,26 ppm por injeção.

O regime de tratamento recomendado é de três injeções na articulação do joelho, com intervalo mínimo de uma semana entre as injeções e de quatro semanas entre os ciclos. Num ciclo de tratamento, que perdura por quase 3 meses, a quantidade de cobre administrada no organismo seria de 0,037mg do metal nesse período.

No corpo humano a concentração de cobre é variável, dependente do órgão onde é encontrado. As concentrações são maiores no fígado, cérebro, coração e rim (Basu e Dickerson, 1996).

O cobre é essencial ao metabolismo em níveis de traços, sendo que o Food Nutritional Board (FBN) estabeleceu para o cobre o VDR (Valores Diários de Referência) de 1,5 a 3,0 mg/dia para adultos (Washington, 1989). Alguns estudos sobre a atuação do cobre no organismo revelam sua associação com oxido-redutases dos tecidos e também com a absorção de ferro da dieta para biossíntese de hemoglobina. Porém, o excesso deste metal acarreta algumas complicações para o organismo, tais como: lesões nos vasos capilares, no fígado e nos rins além da chamada doença de Wilson,

caracterizada pela precipitação deste metal na córnea resultante do acúmulo de cobre nos tecidos (Serpe e Freitas, 1991).

A quantidade de cobre que seria adicionada, trimestralmente, ao organismo pela viscosuplementação com GFDP é quase 100 vezes menor que a recomendada na alimentação diária, podendo ser desconsiderada, visto que não acarretará prejuízo ao corpo humano.

4.4. Turbidez

A Tabela 5 mostra os valores de turbidez (turbidímetro) para as amostras de GFDNP e GFDP bem como para as amostras de goma guar (GGuarNP e GGuarP).

Devido a sua simplicidade também foram realizadas medidas de densidade ótica a fim de verificar a variação de turbidez entre as amostras e compará-las. A densidade ótica é influenciada por diferentes parâmetros tais como: concentração, tamanho, forma e polidispersão das espécies em suspensão.

A turbidez corresponde à redução da transparência da água, ocasionada pelo material em suspensão, que reflete a luz, dificultando a sua passagem pela solução. A quantificação de luz refletida pelas partículas suspensas dá uma ordem de grandeza de sólidos em suspensão na amostra (Tomazoni e col., 2005).

Os valores de densidade ótica (turbidez) encontrados para as amostras GFDNP e GFDP, foram de 0,082 e 0,036, respectivamente.

TABELA 5 - Turbidez das soluções aquosas 0,1% de fava danta e de guar, purificada e não purificada.

Amostras	Turbidez (NTU)
GFDNP	9,9
GFDP	7,5
GGuarNP	41,7
GGuarP	22,7

Observa-se uma maior turbidez para a goma guar não purificada (GGuarNP), devido ao total de açúcares contaminantes (7,6% de glicose e arabinose) que ela contém, oriundos de polissacarídeos insolúveis, de fibras e/ou material celulósico (Mark e col., 1980).

A purificação produziu um material 45,6% menos turvo para a goma guar, sendo ainda considerado um número elevado. A goma de fava danta (GFDNP) apresentou uma turbidez quatro vezes menor que a da guar (GGuarNP), porém houve uma pequena redução, apenas de 24%, com o tratamento empregado. Nas medidas de densidade ótica por sua vez, constatamos uma redução de 56% para as amostras de fava danta, no entanto não podemos comparar os valores obtidos pelos dois métodos.

Os tratamentos aplicados às sementes descritos na literatura para a produção de galactomanana, de vários tipos, produzem soluções viscosas com bastante material insolúvel (Seaman, 1980).

A turbidez é causada pela presença de porções insolúveis de endosperma (Seaman, 1980). O procedimento de purificação (método Fehling) reduz a turbidez do material.

Entretanto a turbidez parece não estar relacionada apenas com a presença de polissacarídeos contaminantes, mas também com a viscosidade. Em soluções com maiores valores de viscosidade, as partículas se encontram mais agregadas, resultando numa modificação do espalhamento de luz (Cunha e col., 2007).

4.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Para a análise das estruturas das galactomananas de fava danta, não purificada e purificada, obteve-se o espectro na região do infravermelho, mostrado na Figura 8.

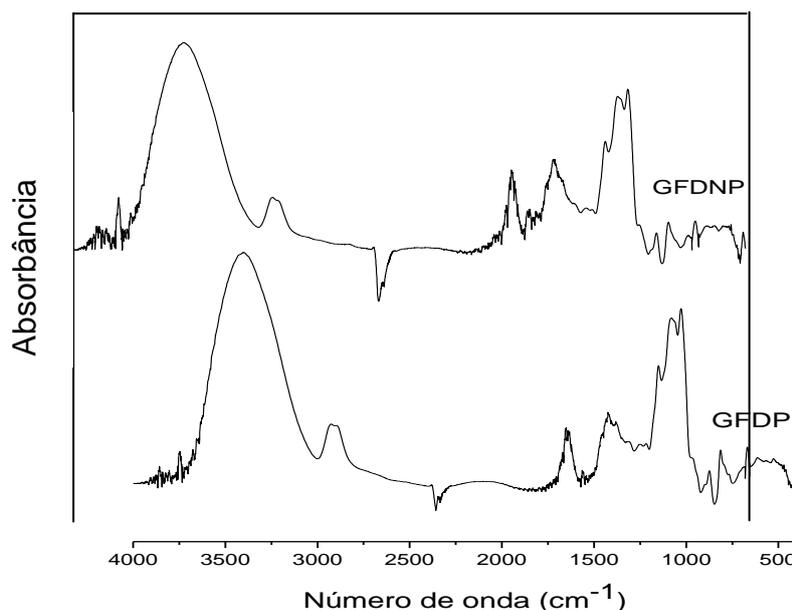


FIGURA 8 - Espectro de infravermelho da GFDNP e da GFDP.

A Tabela 6 mostra as principais frequências de estiramento e deformação e suas respectivas atribuições, características de polissacarídeos, encontrada para as amostras.

TABELA 6- Atribuições das principais bandas de absorção características das galactomananas de fava danta.

FREQUÊNCIAS (cm ⁻¹)		ATRIBUIÇÕES
GFDNP	GFDP	
3392	3394	v(O-H)
2926	2927	v(C-H)
1653	1651	δ(O-H) de H ₂ O adsorvida
1147	1149	v(C-O-C) éter de ligação glicosídica
1076	1074	v(C) carbono anomérico e v (C-O) álcool secundário
1028	1028	v(C-O) álcool primário

Bandas características de glicosídeos relativas aos grupos O-H (3000 – 3500 cm⁻¹), aos grupos CO (1028 cm⁻¹), a ligação glicosídica C-O-C (1149 cm⁻¹) e ao carbono anomérico (1074 cm⁻¹) (Grosev, 2001), foram

identificadas nas amostras. Da análise destes resultados, conclui-se que as bandas de absorção para as amostras estão em concordância com as estruturas típicas de galactomananas.

Nota-se pelos espectros a semelhança estrutural entre as amostras, não sendo, entretanto perceptível a diminuição de proteína causada pela purificação do polímero. Constata-se que estruturalmente o polissacarídeo não sofre alteração quando submetido ao método de purificação.

4.6. Estimativa da distribuição de massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Realizou-se a análise por cromatografia de permeação em gel para analisar a distribuição de massa molar das amostras de goma de fava danta antes e após a purificação e estimar a massa molar de pico. A Figura 9 mostra os cromatogramas para as amostras de goma, não purificada (GFDNP) e purificada (GFDP).

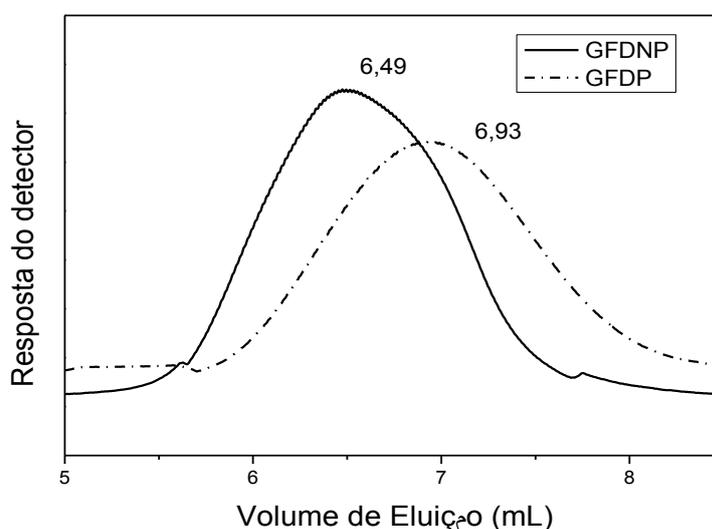


FIGURA 9 - Cromatogramas para as amostras GFDNP e GFDP.

A análise dos cromatogramas dos padrões de pululana permitiu estabelecer uma relação linear entre o $\log M_{pk}$ (logarítmo da massa molar dos padrões) e os respectivos valores de volume de eluição, definidos pelos picos de cada padrão. Deste modo, com estes pares de valores foi possível construir a curva de calibração, através da qual, encontrou-se a equação da reta:

$$\log M_{pk} = 13,47 - 0,974V_e, \quad (R = 0,9993) \quad (\text{Equação 2})$$

Com base nessa equação, pode-se calcular as massas molares de pico dos polissacarídeos em análise, mostradas na Tabela 7.

TABELA 7 - Massas molares de pico para as amostras de goma de fava danta purificada e não purificada.

Amostra	$M_{pk} \times 10^{-6}$ (g/mol)
GFDNP	3,40
GFDP	1,33

As M_{pk} estimadas para as amostras GFDNP e GFDP são semelhantes aos valores obtidos por Cunha (2006) para goma guar não purificada e purificada, sendo estes, respectivamente, de $4,5 \times 10^6$ g/mol e $1,8 \times 10^6$ g/mol.

Para efeito de comparação, a massa molar do ácido hialurônico presente no líquido sinovial varia entre 5×10^6 g/mol e 7×10^6 g/mol. Em joelho adulto com artropatia, a massa molar do ácido hialurônico é reduzida para 2×10^5 g/mol. Já a faixa de massa molar de derivados do ácido hialurônico, nomeados de hilanos é de $2 - 26 \times 10^6$ g/mol. A massa molar do Hilano G-F 20, um hilano comercialmente utilizado na viscosuplementação, é de 6×10^6 g/mol (Brockmeier, 2006). Pode-se constatar então, que as gomas de fava danta e de guar apresentam massa molares dentro das faixas de massa molar dos compostos a serem substituídos.

Numa análise qualitativa dos cromatogramas, observa-se que as amostras apresentam uma distribuição unimodal de massa molar, porém a distribuição de massa molar é mais polidispersa para a amostra purificada.

A GFDP apresenta uma redução significativa de massa molar em relação à GFDNP. Essa redução pode estar relacionada à diminuição de proteínas ligadas (complexo glicoprotéico) proporcionada pelo método de purificação, comprovada pelos resultados da análise elementar.

Outro motivo para a diminuição do valor de massa molar da GFDP pode ser o uso da solução de Fehling a qual promove uma clivagem na cadeia

da galactomanana. Isto ocorre devido à precipitação direta da GFDP em solução de Fehling, sem etapas de centrifugação, que proporciona um contato da solução de polissacarídeo com solução bastante alcalina, resultando então na degradação do polímero e conseqüente redução de massa molar (Cunha e col., 2007). Comportamento semelhante foi observado para a amostra de goma guar purificada, comprovado pelos valores de massa molar apresentados anteriormente (Cunha e col., 2007).

4.7. Estudo reológico comparativo das amostras de goma

A reologia das soluções 0,8% de gomas de fava danta e de guar, não purificada e purificada, em tampão fosfato/salina foi realizada a 36°C, para analisar o efeito da purificação no comportamento de fluxo das gomas e os dados estão dispostos na Figura 10.

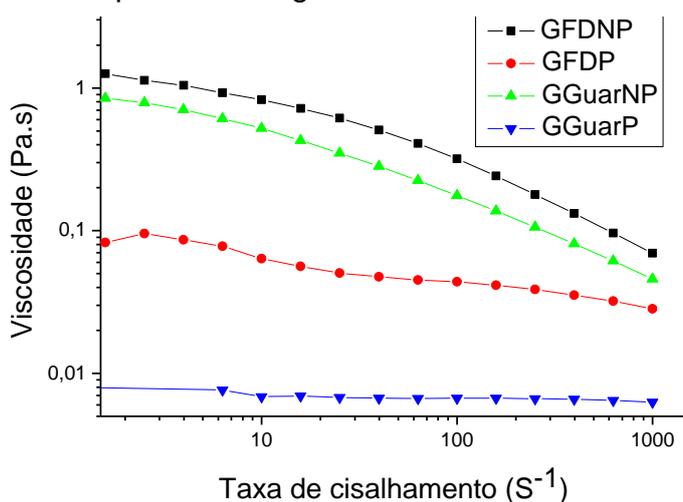


FIGURA 10- Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento das amostras de goma de fava danta e goma guar não purificada e das gomas purificadas, T=36°C.

A Tabela 8 contém os valores de viscosidade das amostras GFDNP, GFDP, GGuarNP e GGuarP, em duas diferentes taxas de cisalhamento.

TABELA 8 – Viscosidades das soluções 0,8% em tampão fosfato/salina de goma de fava danta e guar, não purificada e purificada, T=36°C.

Amostra	Viscosidade (mPa.s)	
	Taxa de cisalhamento 2 s ⁻¹	Taxa de cisalhamento 400 s ⁻¹
GFDNP	1.132	132
GFDP	95	35
GGuarNP	787	81
GGuarP	8	7

Para uma mesma faixa de taxa de cisalhamento, as amostras GFDNP, GFDP, e GGuarNP apresentam comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com um aumento na taxa de cisalhamento (McClements, 2005). Já a amostra GGuarP é denominada de fluido Newtoniano, pois praticamente seus valores de viscosidade independem da taxa de cisalhamento.

A redução da viscosidade quando muda a taxa de cisalhamento de 2s⁻¹ para 400 s⁻¹ é bem mais pronunciada para as amostras GFDNP e GGuarNP, indicando um maior caráter pseudoplástico destas amostras quando comparado com a GFDP.

De acordo com a Tabela 8 observa-se que a uma taxa fixa de cisalhamento as gomas de fava danta têm maiores valores de viscosidade que as gomas de guar.

As amostras (GFDP e GGuarP) purificadas pelo método de Fehling apresentam considerável redução na viscosidade, em ambas as taxas de cisalhamento indicadas na Tabela 8, o que está condizente com a redução das massas molares dessas amostras analisadas por GPC.

4.8. Cinética de reticulação das galactomananas

A fim de comparar a reticulação das gomas de fava danta (GFDNP e GFDP) com as gomas de guar (GGuarNP e GGuarP) realizou-se o acompanhamento da cinética da reação de reticulação através de medidas reológicas de fluxo e oscilatório.

As medidas de fluxo foram realizadas avaliando a variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento aplicada a cada amostra. Através dos ensaios de reologia oscilatória verificou-se como os módulos de viscoelasticidade se comportam frente à variação da frequência de oscilação do experimento.

4.8.1. Reologia de fluxo da cinética de reticulação das galactomananas

A Figura 11 mostra o resultado da variação de viscosidade com o tempo de reação para as quatro amostras, separadamente, a uma taxa de cisalhamento de 2 s^{-1} e temperatura constante de $36 \text{ }^\circ\text{C}$.

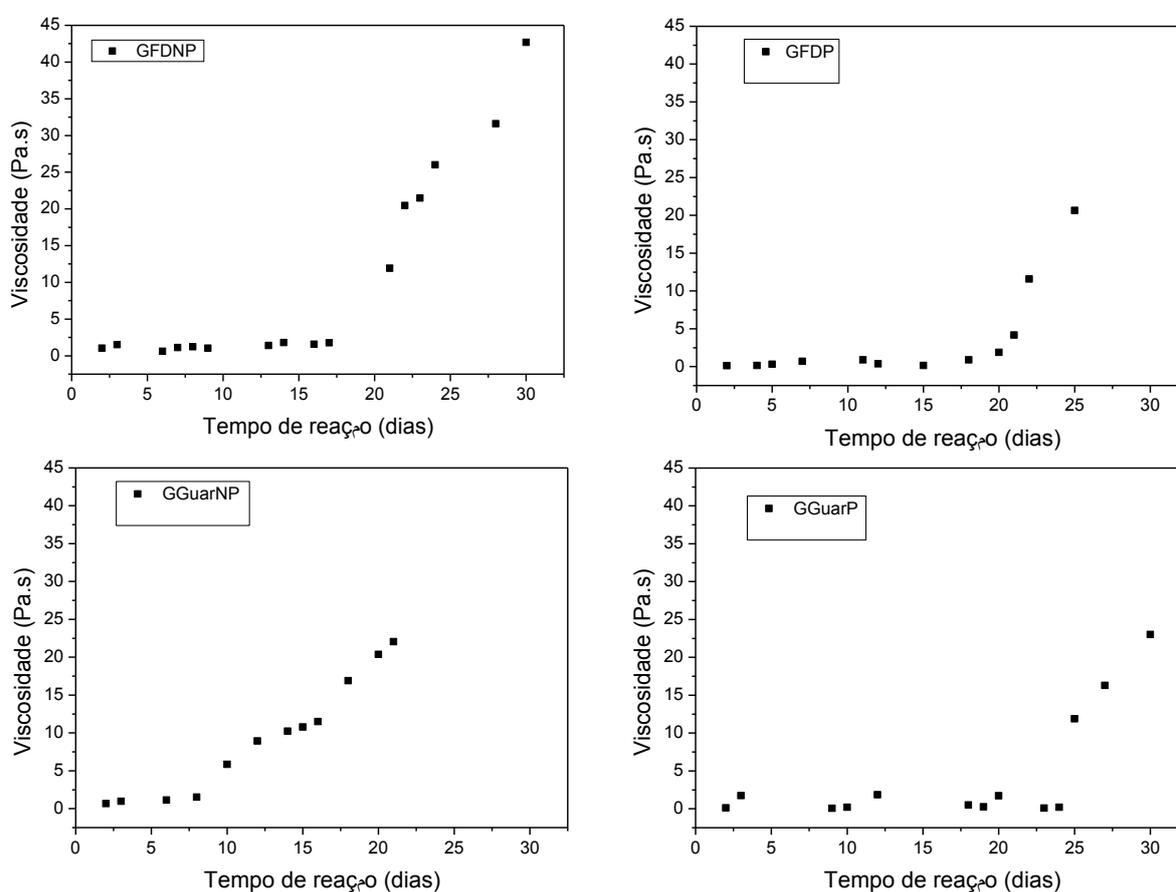


FIGURA 11 - Cinética da reação de reticulação das amostras GFDNP, GFDP, GGuarNP e GGuarP, à $36 \text{ }^\circ\text{C}$ e taxa de cisalhamento de 2 s^{-1} .

No início da reação, as amostras purificadas e não purificadas têm viscosidades semelhantes entre si, em média de 0,84 Pa.s para as gomas não purificadas e de 0,12 Pa.s para as gomas purificadas. Até o 8º dia de reação, nenhuma das gomas apresentou aumento significativo de viscosidade.

Para a GFDNP, a partir do 17º dia de reação observa-se o início do aumento da viscosidade, sendo este crescimento bem mais acentuado em relação às demais amostras. Já para a GFDP, o aumento de viscosidade foi observado a partir do 15º dia, no entanto atingiu menores valores de viscosidade do que a GFDNP. Isso comprova a redução de massa molar da goma purificada, constatada pelo GPC, causada pelo processo de purificação com Fehling e conseqüente redução de viscosidade.

O início da reticulação da GGuarNP ocorreu em tempo menor que o das outras amostras e atingiu valores de viscosidade final próximos da GFDP e GGuarP. Para a GGuarP, a cinética de reticulação apresentou valores desordenados de viscosidade até o 24º dia, quando só então houve aumento desses valores.

Nota-se que o final da reação ocorre em tempos diferentes para todas as amostras, podendo ser colocado em ordem crescente: GGuarNP < GFDP < GFDNP < GGuarP. Contudo a reticulação foi eficaz, pois houve aumento de viscosidade em todas as amostras.

Fica evidenciado então que a reticulação das galactomananas pode ser monitorada até atingir a viscosidade desejada do gel.

O aspecto macroscópico do gel de goma de fava danta purificada GFDP está mostrado na Figura 12.



FIGURA 12 – Aspecto macroscópico do gel de goma de fava danta purificada.

4.8.2. Cinética de reticulação das galactomananas monitorada por reologia oscilatória

Soluções de biopolímeros, como todos os sistemas reais, exibem um comportamento entre um sólido perfeito e um líquido perfeito, ou seja, um comportamento viscoelástico. Algumas das propriedades reológicas que podem ser determinadas no estudo desse comportamento são o módulo de armazenamento (G'), que representa o caráter elástico do sistema (parte sólida), e o módulo de perda (G'') que representa o caráter viscoso (parte líquida). Quando uma determinada tensão é aplicada ao material, ocorre uma resposta elástica, correspondente ao deslocamento das moléculas de sua posição original, e o trabalho exercido é armazenado sob forma de energia. Se a tensão for removida, o corpo tende a recuperar sua forma original. Entretanto, esta recuperação é incompleta devido à manifestação viscosa do material, que é a segunda resposta à tensão aplicada (Rojas, 1999).

O estudo mais apurado dos diferentes sistemas baseia-se na dependência do G' e G'' em função da frequência. No caso de um gel, G' é superior ao G'' em toda a faixa de frequência. Quando um gel é fraco, estes módulos são dependentes da frequência aplicada. Por outro lado para um gel verdadeiro, observa-se uma diminuição desta dependência, principalmente para G' e verifica-se que a razão G'/G'' é sempre maior ou igual a três (Rojas, 1999).

Para caracterizar o processo de geleificação das amostras em análise através dos módulos de cisalhamento, realizou-se o acompanhamento da reticulação com medidas reológicas dinâmicas. Na Tabela 9, pode-se observar os resultados comparativos de G'/G'' a uma frequência de 1 Hz em diferentes dias de reação para as amostras GFDNP, GFDP e GGuarNP.

TABELA 9 – Razão G'/G'' para as gomas de fava danta, não purificada e purificada e para a goma guar não purificada, a 36°C e frequência de 1Hz.

Tempo de reação (dias)	G'/G''		
	GFDNP	GFDP	GGuarNP
2	0,27	0,23	0,34
12	-	-	1,06
17	0,56	0,20	1,50
21	0,87	0,76	4,80
23	5,50	1,40	-
25	-	3,00	-
30	7,60	-	-

Podemos notar que a razão G'/G'' aumenta com o tempo de reação para todas as amostras, sendo este aumento mais pronunciado para a goma de fava danta não purificada (GFDNP). Para essa amostra, a formação de gel ($G' > G''$) teve início a partir do 21º dia de reação, tornando-se um gel verdadeiro ($G'/G'' \geq 3$) no 23º dia quando a razão foi de 5,5, valor superior ao do Hilano G-F 20 que nesta mesma frequência é de 4,8. No final da reação, o valor de G'/G'' foi de quase duas vezes maior que o do medicamento empregado na osteoartrose.

O comportamento dos módulos G' e G'' em função da frequência para a GFDNP no 23º dia de reação está demonstrado na Figura 13.

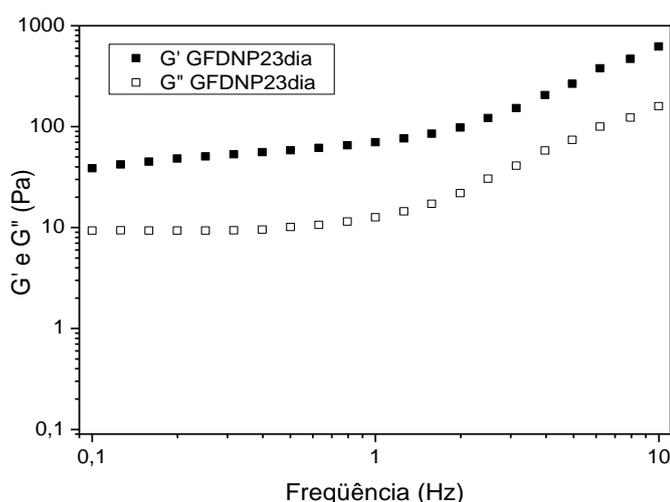


FIGURA 13- Variação de G' e G'' em função da frequência para GFDNP no 23º dia de reticulação.

Nesta etapa da reação, já ocorreu o “crossing-over”, ou seja, a inversão dos valores de G' e G'' . Os valores de G'' iniciam-se maiores que os de G' durante os primeiros dias da reação, predominando o caráter viscoso da amostra, típico de uma solução. A diferença entre os dois módulos torna-se cada vez menor até que eles se cruzam e invertem de posições, logo o G' atingirá valores maiores que o G'' , prevalecendo o caráter elástico da amostra, típico de um gel. Verifica-se ao final da reação que G' é maior que G'' em toda a faixa de frequência analisada, caracterizando um gel forte, com predomínio do caráter sólido, conforme esperado para uma rede tridimensional (Endress, Döschl-Volle e Dengler, 1996; Morris, 1995).

Para a goma de fava danta purificada (GFDP), observou-se a formação do gel ($G' > G''$) no 23º dia e somente no 25º dia pode-se constatar a formação de gel verdadeiro onde a razão atingiu um valor igual a três. Os valores de G'/G'' para a GFDP foram menores que o do Hilano G-F20 durante toda a reação. A Figura 14 mostra o comportamento reológico dinâmico da amostra GFDP na faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz, no 25º dia de reticulação.

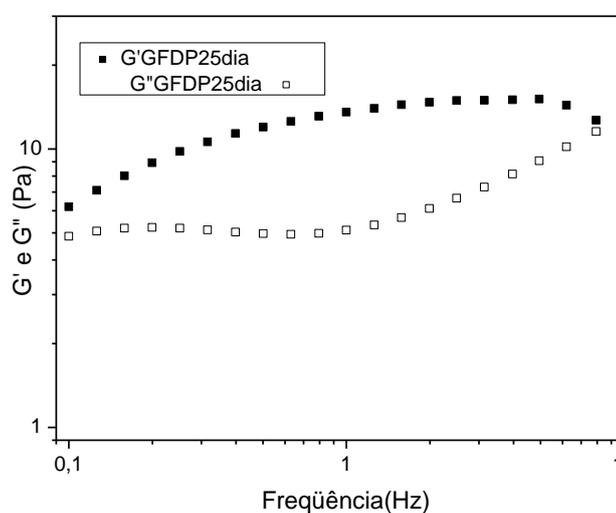


FIGURA 14- Variação de G' e G'' em função da frequência para GFDP no 25º dia de reticulação.

Para essa amostra (GFDP), o fenômeno ocorrido foi semelhante ao da GFDNP relatado e visualizado na Figura 13. Nota-se, entretanto, que $G' > G''$ na maior parte da faixa de frequência estudada. Próximo à frequência de 10

Hz, percebe-se que ainda há um discreto cruzamento entre os dois módulos e em um único ponto de frequência, $G' < G''$.

Já a goma guar não purificada, apresentou no final da reação uma razão de 4,8 a 1 Hz, igual a do hilano comercial. A formação de gel para essa goma foi logo observada no 12º dia ($G' > G''$), podendo ser considerada gel verdadeiro apenas no 21º dia (final da reação). A variação dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') do sistema em função da frequência para a GGuarNP no 21º dia de reação está apresentada na Figura 15.

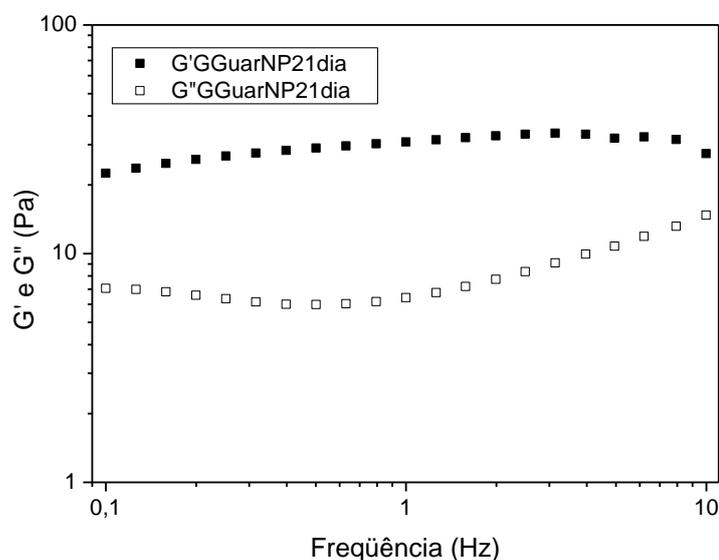


FIGURA 15- Variação de G' e G'' em função da frequência para GGuarNP no 21º dia de reticulação.

Verifica-se ao final da reação que G' é maior que G'' em toda a faixa de frequência analisada, caracterizando um gel forte. Neste caso, a diferença entre os módulos é bem mais pronunciada em relação as outras amostras.

4.9. Caracterização dos géis de goma de fava danta

4.9.1. Teor de água nos géis

Os percentuais de conteúdo de água nos géis de fava danta não purificada e purificada, GelGFDNP e GelGFDP, respectivamente, e do Hilano G-F 20 estão compondo a Tabela 10.

TABELA 10- Teor de água nos géis e no Hilano G-F 20

Amostra	Teor de água (%)
GelGFDNP	95
Gel GFDP	96
GelGGuarNP	96
GelGGuarP	98
Hilano G-F 20	97

As amostras apresentaram valores iguais ou próximos ao do líquido sinovial e ao do Hilano G-F 20. O componente majoritário tanto do líquido sinovial quanto do Hilano G-F 20 é a água, pois seu percentual nestes materiais é de 95% e 97%, respectivamente (Stanley e col., 1990).

Estudos feitos por Cunha e col. (2005) mostram valores pouco maiores para o teor de água dos hidrogéis de goma guar, sendo estes de 96% para o GelGGuarNP (amostra não-purificada) e de 98% para o GelGGuarP (amostra purificada).

4.9.2. Teor de glutaraldeído nas amostras GelGFDNP e GelGFDP

O glutaraldeído é um reagente citotóxico (Kawahara e col., 1992), e precisa ser quantificado em materiais que venham a ter aplicação biológica.

As soluções aquosas desse agente reticulante não são homogêneas. São caracterizadas por misturas complexas em equilíbrio, contendo glutaraldeído livre, formas mono e diidratadas, hemiacetais cíclicos (monoméricos e poliméricos) e vários polímeros α,β -insaturados. Das formas principais, têm-se indícios de que a responsável pela reticulação seja a monomérica (Kawahara e col., 1992).

Soluções de glutaraldeído em meio tamponado com concentrações conhecidas foram preparadas e as absorvâncias medidas a 235 nm (Figura 16).

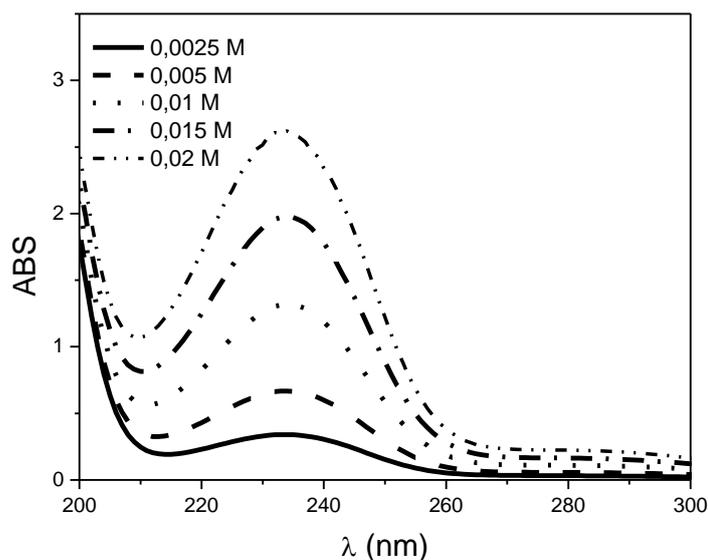


FIGURA 16 - Espectro de UV para as várias soluções padrão de glutaraldeído em tampão fosfato (pH = 7,3).

A análise do espectro permitiu a construção de uma curva de calibração onde se relacionou a concentração do reagente com a absorvância no comprimento de onda (λ) de 235 nm. A equação (3) representa a regressão linear dos pontos experimentais obtidos de absorvância (ABS) em função da concentração (C):

$$\text{ABS} = - 0,0179 + 96,86 C , R= 0,9989 \quad (\text{Equação 3})$$

Conhecida a absorvância das amostras (alíquotas de mistura gel+água) em 235 nm e considerando-se as diluições, calculou-se a quantidade de glutaraldeído polimérico residual nos géis (GelGFDNP e GelGFDP) utilizando-se a Equação 3 (Tabela 11).

TABELA 11-Teores de GA polimérico para os géis da goma de fava danta não purificada e purificada.

Amostras	GA adicionado na reação ($\times 10^3$ mols)	Teor de GA polimérico residual ($\times 10^5$ mols)	Teor de GA em %
GeIGFDNP	1,25	1,92	1,5
GeIGFDP	1,25	3,24	2,6

Visando os ensaios farmacológicos, especificaram-se ainda mais os resultados, calculando a massa de glutaraldeído presente em cada gel por massa corporal do animal (ratos Wistar). Sabendo que a dosagem a ser aplicada na articulação dos ratos (*Rattus norvegicus*), que pesam em torno de 200 g, é de 50 μ L, pode-se então encontrar a quantidade de GA expressa em mg de GA/kg do animal. O teor de glutaraldeído na injeção dos géis GeIGFDNP e GeIGFDP são respectivamente 0,2 e 0,4 mg de GA/Kg do animal.

A dose letal de glutaraldeído em injeção intraperitoneal necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população de animais em estudo, a DL_{50} , é de 17,9 mg de GA por kg do animal (PTCL, 2006). O residual de GA encontrado nos géis GeIGFDNP e GeIGFDP é cerca de no mínimo 50 vezes menor que a DL_{50} .

Pelo espectro de UV do glutaraldeído, observa-se que as bandas estão bem mais acentuadas e bem definidas em 235 nm, indicando a predominância da espécie polimérica. 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 galactomanana deva-se à maior concentração das espécies poliméricas.

No estudo de cinética de reticulação mostrado anteriormente, a reação requeria um tempo mínimo para iniciar. Como as espécies monoméricas e poliméricas se encontram em equilíbrio e este depende da concentração (Kawahara, 1992), supõe-se que este tempo 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.

4.9.3. Infravermelho da GFDNP e GFDP e dos seus respectivos géis

A Figura 17 apresenta os espectros de infravermelho obtidos para as amostras de goma (GFDNP e GFDP) e seus respectivos géis.

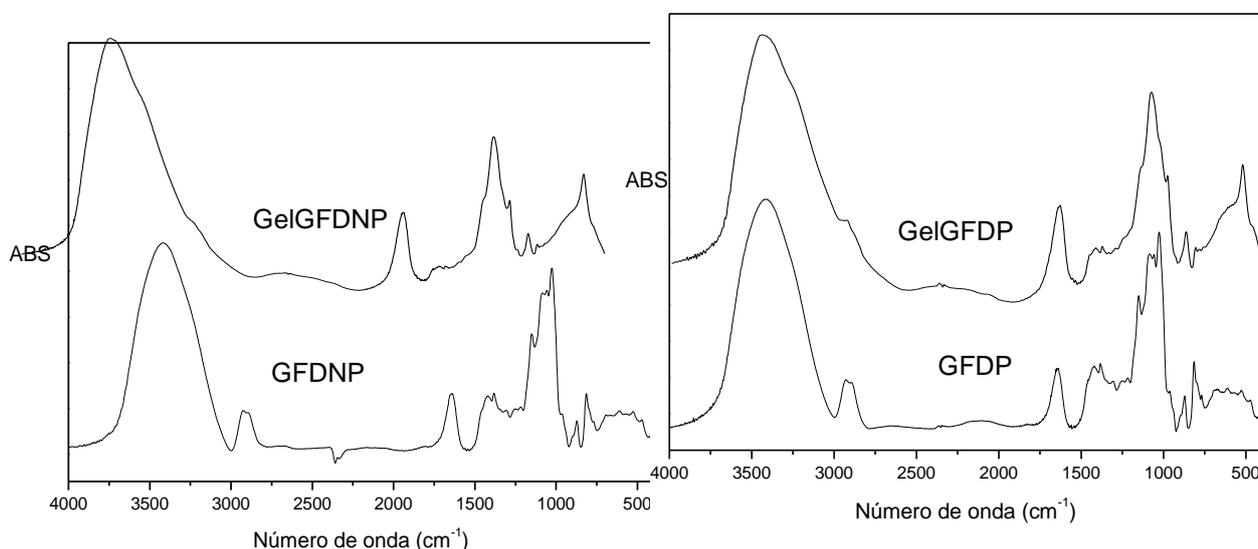


FIGURA 17- Espectros de infravermelho das amostras de goma de fava danta não purificada e goma purificada e dos seus géis.

Freqüências relativas aos grupos O-H ($3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$), aos grupos C-O de álcool ($1016 - 1074 \text{ cm}^{-1}$) e O-H de H_2O adsorvida (1657 cm^{-1}) e relativa a C-O-C (1159 cm^{-1}) são observadas de modo semelhante tanto para as gomas de fava danta como para os géis, sendo estas freqüências características de polissacarídeos.

Vibrações de C-H absorvem em aproximadamente 2933 cm^{-1} para as gomas, mas pode estar mascarada nos espectros dos géis pela larga banda em torno de 3400 cm^{-1} , atribuída aos grupos O-H. Podia-se prever que quase nenhuma modificação causada pela reticulação fosse observada pelo infravermelho, pois as pontes formadas pelo glutaraldeído contêm apenas ligações $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ e ligações de éter ($-\text{C-O-C}-$), ambas pré-existent na estrutura dos polissacarídeos.

4.9.4. Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas das gomas e de seus respectivos géis, liofilizados estão mostradas na Figura 18.

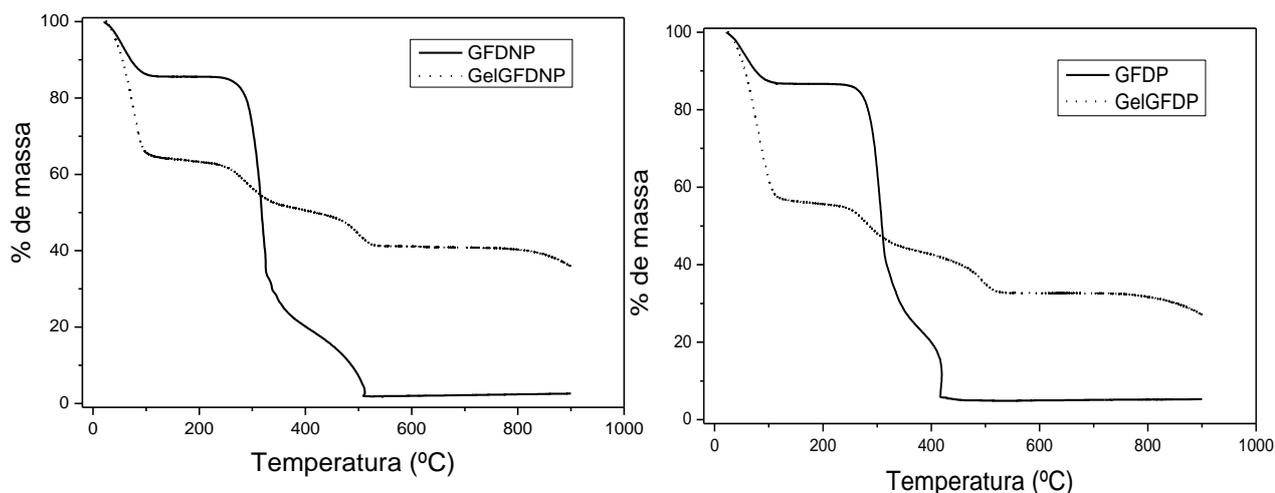


FIGURA 18 - Curvas termogravimétricas das amostras de goma de fava danta e dos seus géis a 10°C/min em ar sintético.

Para uma precisa identificação da quantidade de eventos térmicos e as respectivas temperaturas máximas de cada evento, a Figura 19 apresenta as derivadas das curvas termogravimétricas visualizados anteriormente.

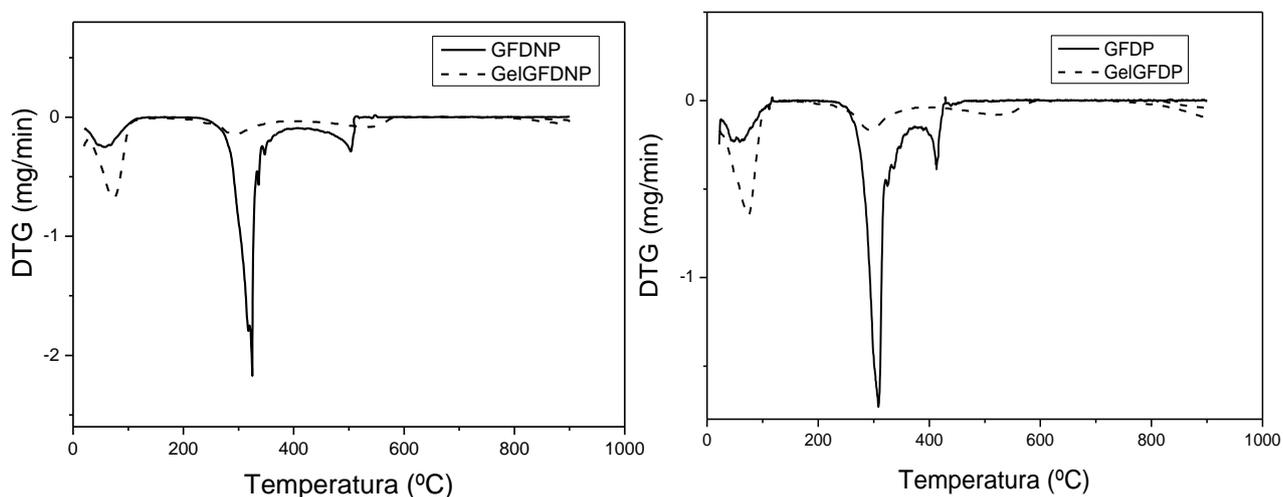


FIGURA 19 - DTG para as amostras GFDNP, GFDP e seus géis a 10°C/min em ar sintético.

Os parâmetros termogravimétricos: temperatura inicial de decomposição (T_i), temperatura de máxima decomposição (T_{max}) e percentual de resíduo são mostrados na Tabela 12.

TABELA 12 - Parâmetros de estabilidade térmica das amostras de GFDNP, GFDP e dos seus géis.

Amostras	T _i (°C)	T _{max} nos eventos (°C)			Umidade (%)	Resíduo em 900°C (%)
		I	II	III		
GFDNP	284	58	319	507	14,3	3,0
GelGFDNP	250	73	289	495	36,4	36,0
GFDP	283	56	306	418	12,6	5,6
GelGFDP	254	77	282	494	44,3	27,2

O primeiro evento de perda de massa em todas as amostras se deve à perda de umidade, que geralmente ocorre antes de 100°C. O percentual de umidade das amostras varia entre 12 e 45%. Nota-se que para os géis a perda de água residual é bem maior e ocorre em temperaturas mais elevadas que as gomas.

Este alto valor percentual de umidade dos géis pode ser explicado pela forma das amostras. As gomas foram obtidas na forma de pó e os géis foram liofilizados. O processo de liofilização produz um material de aspecto esponjoso, com tendência à absorção de água.

Em adição a isso, as gomas reticuladas contêm espaços internos nos quais as moléculas de água podem penetrar e cristalizar. O volume e a forma desses espaços mudam conforme a reticulação, e essa mudança pode causar irregularidades na estrutura cristalina e no teor de umidade (Glico-Kabir e col., 1999).

O perfil termogravimétrico das amostras apresentou dois eventos de perda de massa correspondentes à decomposição térmica dos polímeros. Para o segundo evento, a temperatura máxima de decomposição (T_{max}) obtida pela DTG variou de 282 a 319°C. Para o terceiro evento, a T_{max} variou de 418 a 507°C.

Pirólises de polissacarídeos por cisão randômica das ligações glicosídicas são seguidas por futuras decomposições (Glico-Kabir e col., 1999).

Os valores de T_{max} para o segundo e terceiro evento de decomposição da GFDNP foram de 319 e 507°C, respectivamente, com temperatura inicial de 284°C. Cunha (2006) encontrou três eventos de decomposição termoxidativa da goma guar não purificada, com temperaturas

máximas de 307, 440 e 504°C e uma temperatura inicial de decomposição de 233°C.

A GFDP e seu gel tiveram os menores valores de temperaturas máximas de decomposição, indicando que tais amostras apresentam menor estabilidade térmica. Isso sugere que o método de purificação promoveu alguma mudança no comportamento termogravimétrico dos materiais.

O elevado percentual de perda de massa do principal evento de decomposição das gomas (GFDNP e GFDP) sugere a ocorrência de processos nos quais galactoses e manoses são clivadas da cadeia da galactomanana favorecendo a decomposição.

No geral, os produtos reticulados apresentaram uma diminuição das temperaturas de decomposição em relação às gomas, com exceção do GelGFDP, o qual teve sua T_{max} no terceiro evento maior que a respectiva goma precursora. Comportamento semelhante foi reportado para goma guar reticulada com glutaraldeído (Glico-Karbir e col.,1999).

Segundo Glico-Karbir (1999), isto pode ser explicado por uma catálise ácida que causa uma redução inicial no grau de polimerização e uma destruição das ligações de hidrogênio pré-existentes nas regiões onde a reticulação ocorreu. Um fenômeno similar foi reportado por Rodrigo e col. (1975) que investigaram o comportamento pirolítico da celulose e da celulose reticulada sob mesmas condições.

O resíduo final em 900°C varia entre 3,0 e 36,0%. Para as gomas, a amostra GFDP apresenta resíduo final superior ao da amostra não purificada, devido à presença de cobre, proveniente da solução de Fehling. Um fenômeno similar ocorreu para a goma guar purificada (Cunha, 2006). Para os géis, observa-se que o percentual de resíduo é consideravelmente maior que o das gomas, sugerindo uma maior estabilidade térmica dos mesmos, conferida certamente pelas ligações cruzadas existentes entre suas cadeias.

Em busca de uma melhor explicação para o processo de degradação térmica dessas amostras, obteve-se os espectros de IV dos resíduos, à 500 °C, correspondentes da reação de degradação de GFDNP e GelGFDNP e comparou-se com os espectros das respectivas amostras originais, à temperatura ambiente, na região de 2000-500 cm^{-1} (Figura 20).

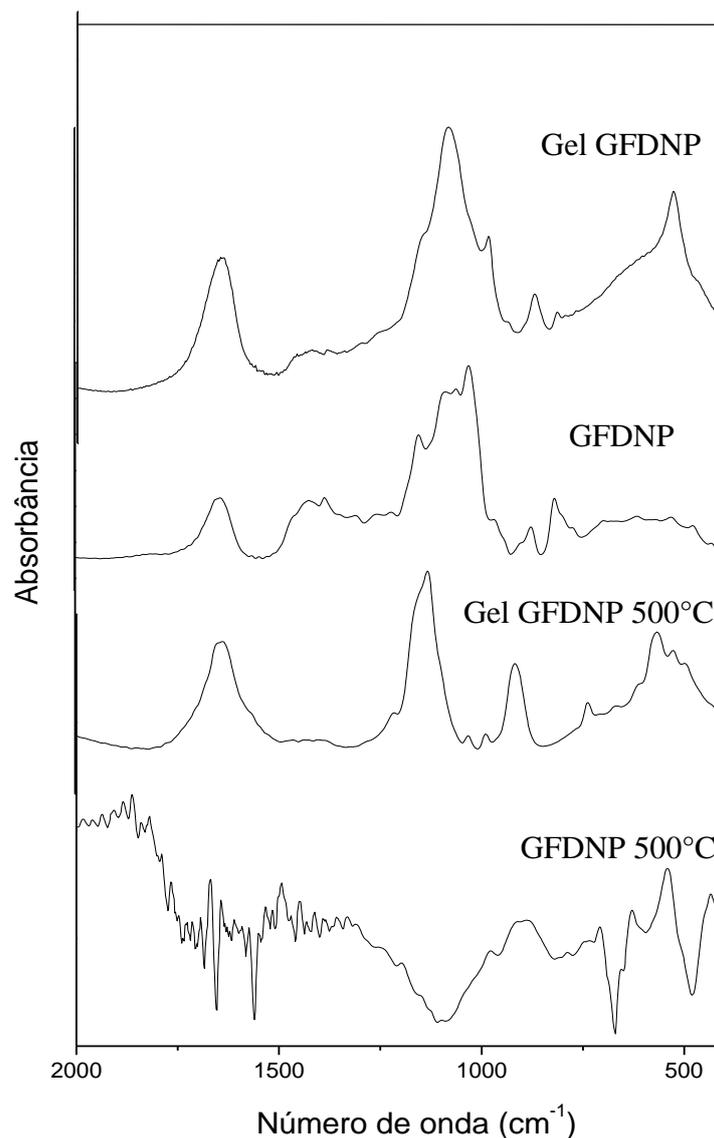


FIGURA 20 - Espectro de infravermelho das amostras GFDNP e GelGFDNP sem aquecimento e delas durante degradação térmica a 500 °C.

As mudanças na GFDNP aquecida a 500 °C são mais significativas que no GelGFDNP 500 °C, confirmando a alta estabilidade térmica do gel. No espectro da GFDNP 500 °C, a intensidade das bandas correspondentes aos grupos exocíclicos (1150, 1077 e 1023 cm⁻¹) diminuem, como uma consequência da clivagem da ligação glicosídica na cadeia principal e liberação de água (Silva e col., 2006).

Para GelGFDNP 500 °C, ao contrário do resíduo da goma aquecida, observa-se uma preservação parcial da estrutura na região polissacarídica. A banda na região de 1657-1653cm⁻¹ permanece no resíduo do gel aquecido indicando a formação de estruturas insaturadas, como observada para a

metilcelulose a 500 °C (Villetti e col., 2002) e para a goma do cajueiro reticulada (Silva e col., 2006).

A banda em aproximadamente 950 cm^{-1} no espectro do GelGFDNP 500 °C pode ser um indicativo de C-O-C da reticulação. Banda com esta atribuição está presente na formação de 3,6-anidro- α -L-galactose como acontece para *Gracilaria birdiae* (Maciel e col., 2008).

4.10. Estudos reológicos

4.10.1. Reologia de fluxo comparativa dos géis de GFDNP e GFDP com o Hilano G-F 20

A reologia de fluxo dos géis dialisados de fava danta, não purificada e purificada, e do Hilano G-F 20 foi realizada a 36°C, variando a taxa de cisalhamento e verificando seu efeito sobre a viscosidade (Figura 21).

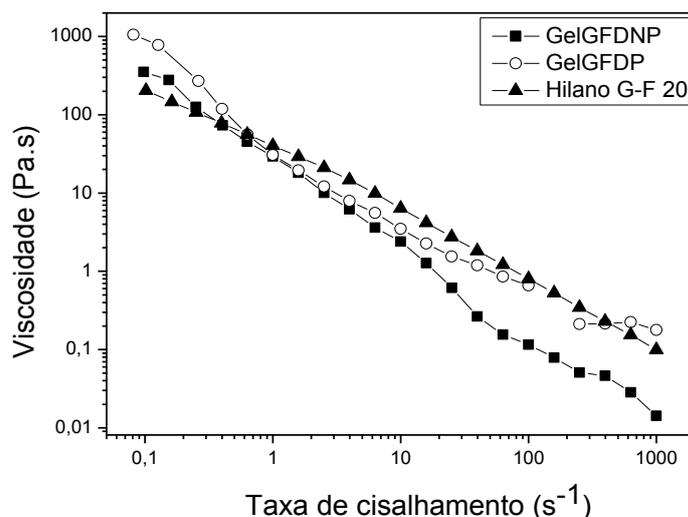


FIGURA 21- Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento das amostras GelGFDNP, GelGFDP e do Hilano G-F 20 a $T=36^{\circ}\text{C}$.

A Tabela 13 mostra os valores de viscosidade dos géis GelGFDNP, GelGFDP e do Hilano G-F 20, em duas taxas de cisalhamento diferentes.

TABELA 13 – Viscosidades dos géis de fava danta, não purificada e purificada e do Hilano G-F 20.

Amostra	Viscosidade (mPa.s)	
	Taxa de cisalhamento 2 s^{-1}	Taxa de cisalhamento 400 s^{-1}
GelGFDNP	10.070	46,4
GelGFDP	12.110	214,3
Hilano G-F 20	21.110	229,6

A Figura 21 mostra que tanto os géis de fava danta como o Hilano G-F20 apresentam comportamento pseudoplástico.

Comparando a viscosidade, na taxa de cisalhamento 2 s^{-1} , dos géis GelGFDNP e GelGFDP (Tabela 13) com os valores de viscosidade das respectivas gomas (Tabela 8), constata-se que para a GFDNP houve um aumento de apenas 9 vezes após a formação do gel, enquanto que para a GFDP o aumento foi bastante significativo de quase 130 vezes com a formação do gel. Pode-se afirmar então que a reação com glutaraldeído aumenta consideravelmente a viscosidade da goma de fava danta, especialmente para a purificada.

Nota-se ainda que as viscosidades dos géis (GelGFDNP e GelGFDP) são da mesma ordem de grandeza que a do medicamento utilizado no tratamento de osteoartrose, o Hilano G-F 20.

4.10.2. Reologia oscilatória dos géis de GFDNP e GFDP e do Hilano G-F 20

A fim de estudar as propriedades viscoelásticas dos géis GelGFDNP, GelGFDP e do medicamento Hilano, verificou-se como os dois módulos de viscoelasticidade se comportam frente à variação da frequência de oscilação do experimento. A Figura 22 mostra o comportamento reológico dos géis dialisados (GelGFDNP e GelGFDP) e do Hilano G-F 20 na faixa em Hz que compreende a faixa de frequência do joelho normal (2 a 8 rad/s).

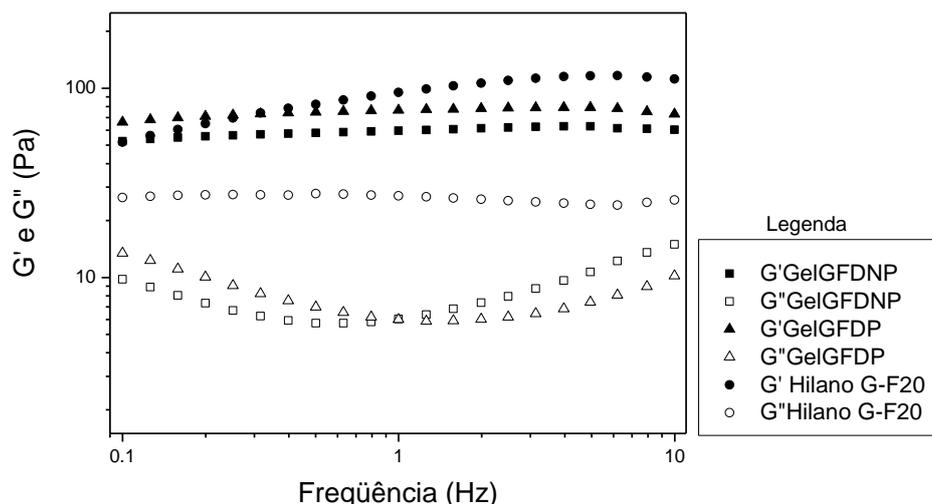


FIGURA 22 – Comportamento viscoelástico para os géis GelGFDNP, GelGFDP e para o Hilano G-F 20 a 36°C.

A Tabela 14 mostra os valores dos módulos de cisalhamento (G' e G'') e a relação G'/G'' dos géis GelGFDNP, GelGFDP e do Hilano G-F20, em duas frequências distintas.

TABELA 14 - Parâmetros viscoelásticos para os géis de goma de fava danta, não purificada e purificada e para o Hilano G-F 20, a 36°C.

Amostras	Frequência: 2 rad/s			Frequência: 8 rad/s		
	G'	G''	G'/G''	G'	G''	G'/G''
GelGFDNP	57,01	6,25	9,1	60,19	6,36	9,4
GelGFDP	73,13	8,25	8,9	77,08	5,88	13,1
Hilano G-F 20	73,99	27,35	2,7	99,05	26,66	3,7

Para todas as amostras, o módulo de cisalhamento elástico G' é superior ao módulo de cisalhamento viscoso G'' e ambos possuem uma pequena dependência da frequência, na faixa estudada.

O líquido sinovial saudável sempre apresenta G' maior que G'' na faixa de frequência do joelho (2 a 8 rad/s) (Pelletier e col., 2001).

Nos extremos dessa faixa, o Hilano apresenta valores de G' e G'' maiores que os mesmos módulos dos géis da galactomanana.

A uma frequência de 8 rad/s, os três materiais analisados podem ser classificados como géis verdadeiros, pois a razão G'/G'' é maior que três para todas as amostras, e tem valor máximo de 13,1 para o GelGFDP. No entanto, em 2 rad/s apenas o Hilano G-F 20 apresentou $G'/G'' < 3$.

5. CONCLUSÕES

Galactomananas podem ser facilmente obtidas a partir de sementes de *Dimorphandra gardneriana*. O rendimento é comparável com os apresentados por galactomananas obtidas de sementes brasileiras e para goma guar extraída das sementes *Cyamopsis tetragonolobus*.

A purificação pelo método de Fehling da fava danta mostrou rendimento um pouco superior ao da goma guar pelo mesmo método. Esse método foi eficiente na redução de proteína, comprovada pela diminuição dos valores de turbidez e de massa molar para as amostras purificadas.

As gomas de fava danta não purificada e purificada e de guar não purificada apresentaram comportamento pseudoplástico, enquanto que a goma guar purificada é um fluido Newtoniano. A uma taxa de cisalhamento fixa, as gomas de fava danta mostraram maiores valores de viscosidade que a goma de guar.

O método de reticulação da goma de fava danta 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.

Hidrogéis fluidos de goma de fava danta não purificada e purificada foram obtidos após 15 a 17 dias de reticulação. A GFDNP atingiu o maior valor de viscosidade no final da reação. A viscosidade da GFDP foi menor que a GFDNP e semelhante à da GguarNP.

Os géis de fava danta bem como o Hilano G-F 20 foram considerados como fluidos pseudoplásticos, do mesmo modo que para o líquido sinovial em condições normais.

A reticulação com glutaraldéido promoveu um aumento considerável de viscosidade, em relação às gomas. Constatou-se que para a GFDNP houve um aumento de apenas 9 vezes após a formação do gel, enquanto que para a GFDP o aumento foi bastante significativo de quase 130 vezes com a formação do gel. Para essas amostras, na faixa de frequência do joelho normal, o G' é superior ao G'' , e elas são consideradas géis verdadeiros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIQUIF Site: <http://www.abiquif.org.br/mercado_estatísticas.html> Acesso em Março, 2008.
2. ABREU, R. F.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O.; *XXXV Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, 2006.*
3. ANDRADE, C. T.; AZERO, E. G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M. P.; *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, **26**: 181.
4. AZERO, E.; ANDRADE, C.; *Polymer Testing*, 2002, **21**: 551.
5. BAILLEUL, FRANCOIS (2006) United States Patent Application 20060148755, depositada em 20 de dezembro, 2005.
6. BALAZS, E.; DENLINGER, J.; *Journal of Rheumatology*, 1993, **20**: 3.
7. BASU, T. K.; DICKERSON, J.W.; *CAB International*, 1996.
8. BERGER J.; REIST, M.; MAYER, J. M; FELT, O.; GURN, R.; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, **57**: 19.
9. BERRIAUD, N.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; *International Journal of Biological Macromolecules*, 1994, **1**: 137.
10. BRAY, B.; *Journal Theoretical Biological*, 2001, **210**: 121.
11. BROCKMEIER, S. F.; SHAFFER, B.S.; *Sports Med Arthrosc Rev*, 2006, **14**: 155.
12. BROWN, L.J.; CUI, H.; WU, Z. (2007) United States Patent Application 20070141160, depositada em 15 de dezembro, 2005.
13. BRUMMER, Y.; CUI, W.; WANG, Q.; *Food Hydrocolloids*, 2003, **17**: 229.
14. BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI, V. R.; ROCHA, D. C.; DIETRICH, S. M.; *Phytochemistry*, 1995, **38**: 871.

15. BUCKWALTER, J. A.; MARTIN, J. A.; *Osteoarthritis, Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, **58**: 150.
16. BURDICK, J.; LABERGE, M.; LICKFIELD, G. (2004) US Patent 6.800.298, 2004.
17. CASTRO, R. R.; FEITOSA, J.P.A.; CUNHA, P.L.R.; ROCHA, F.A.C.; *Clinical Rheumatology*, 2007, **26**: 1312.
18. CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. M. P.; MONTEIRO, A. C. O.; MOREIRA, H. H. T.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; XXXV *Reunião Anual da SBBq*, Águas de Lindóia, 2006.
19. CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; SOUZA, B. W. S.; LIMA, A. M. P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; COIMBRA, M. A.; GONÇALVES, M. P.; VICENTE, A. A.; *Carbohydrate Polymers*, 2009, **75**: 408.
20. CHENG, Y.; BROWN, K.; PRUD'HOMME, R.; *Biomacromolecules*, 2002, **3**: 456.
21. CLARKE, S.; LOCK, V.; DUDDY, J.; SHARIF, M.; NEWMAN, J.H.; KIRWAN, J.R.; *The knee*, 2005, **12**: 57.
22. CORRÊA, M. P.; *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, V. I e II, 1984, p. 267 e p. 370-375.
23. CUNHA, P.L.R.; *Tese de Doutorado*, Desenvolvimento de polissacarídeos com ação terapêutica em osteoartrite. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
24. CUNHA, P.L.R.; CASTRO, R. R.; ROCHA, F.A.C.; FEITOSA, J.P.A. Brazilian Patent PI 0502198-7, depositada em 16 de Junho, 2005.
25. CUNHA, P. L. R.; CASTRO, R. R.; ROCHA, F. A. C.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, **37**: 99.

26. CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, **41**: 324.
27. CUNHA, P. L. R.; VIEIRA, I. G. P.; ARRIAGA, A. M. C.; PAULA, R.C. M.; FEITOSA, J.P.A.; *Food Hydrocolloids*, 2009, **23**: 880.
28. CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; *Química Nova*, 2009, **32**: 649.
29. DEA, I. C. M.; MORRISON, A.; *Advanced Carbohydrate Chemical Biochemistry*, 1975, **31**: 241.
30. DEBON, S. J. J.; TESTER, R. F.; *Food Chemistry*, 2001, **73**: 401.
31. DENNISON, E.; COOPER, C.; Osteoarthritis: epidemiology and classification. In: HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J.; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H.; *Rheumatology*, Volume 2, 3^o edição, London: Mosby, 2003.
32. DEY, P.M.; *Advanced Carbohydrate Chemical Biochemistry*, 1978, **35**: 341.
33. DILLON, H. F.; SOMANCHI, A.; ZAMAN, A. (2007) United States Patent Application 20070167397, depositada em 19 de Janeiro, 2006.
34. DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C. K.; CONSORTE, L. B.; *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 1985, **5**: 47.
35. 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 edição, London: Mosby, 2003.
36. EGOROV, V.; MESTECKINA, N. M.; PLENNIK, R.Y.A.; SHCHERBUKHIN, V. D.; *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2003, **39**: 509.
37. ENDRESS, H. U.; DÖSCHL-VOLLE, C.; DENGLER, K.; Rheological Methods to Characterize Pectins in Solutions and Gels. In: VISSER, J.;

- VORAGEN, A. G. J.(Eds.), Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases. Amsterdam: Elsevier, 1996, **14**: 407.
38. EVANICH, J. D.; EVANICH, C.J.; WRIGHT, M. B.; RYDLEWICZ, J. A.; *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2001, **390**: 173.
39. FERES, C.A.O.; MADALOSSO, R.C.; ROCHA, O.A.; LEITE, J.P.V.; GUIMARAES, T.M.D.P.; TOLEDO, V.P.P.; TAGLIATI, C.A.; *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, **108**: 450.
40. FIGUEIRO, S. D.; GOES, J. C.; MOREIRA, R. A.; SOMBRA, A. S. B.; *Carbohydrate Polymers*, 2004, **56**: 313.
41. FILHO, J. A. B. M.; *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 1985, **5**: 93.
42. FLORA BRASILIENSIS Site, Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br>, acesso em Março, 2008.
43. FRANCO, T. T.; RODRIGUES, N. R.; SERRA, G. E.; PANEGASSI, V. R.; BUCKERIDGE, M. S.; *Journal of Chromatography B*, 1996, **680**: 255.
44. GANTER, J. L. M. S.; HEYRAND, A.; PETKOWICKZ, C. L. O.; RINAUDO, M.; REICHER, F.; *International Journal of Biological Macromolecules*, 1995, **17**: 13.
45. GHOSH, P.; GUIDOLIN, D.; *Seminars Arthritis and Rheumatism*, 2002, **32**: 10.
46. GLICKSMAN, M.; *Advances in Food Research*, 1962, **11**: 109.
47. GLIKO-KABIR, I.; PENHASI, A.; RUBINSTEIN, A.; *Carbohydrate Research*, 1999, **316**: 6.
48. GREENBERG, D.D.; STOKER, A.; KANE, S.; COCKRELL, M.; COOK, J.L.; *Osteoarthritis and cartilage*, 2006, **14**: 814.
49. GROSEV, V. M.; BOZAC, R.; PUPPELS, G. J.; *Spectrochimica Acta*, 2001, **57**: 2815.

50. HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C.F.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**: 13.
51. HOCHBERG, M. C.; *Seminars Arthritis and Rheumatism*, 2000, **30**: 2.
52. HOFFMAN, A.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002; **54**: 3.
53. JONES, J.; STOODLEY, R.; *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1965, **5**: 36.
54. KAVANAGH, G. M.; ROSS-MURPHY, S. B.; *Progress in Polymers Science*, 1998, **23**: 533.
55. KAWAHARA, J.; OHMORI T.; ONKUBO T.; HATTORI S.; KAWAMURA M.; *Analytical Biochemistry*, 1992, **201**: 94.
56. KIM, B.H.; KIM, D.; JUNG, Y.; KIM, H.; CHO, D.; *Macromolecular Research*, 2003, **11**: 291.
57. KIRWAN, J.; *The knee*, 2001, **8**: 93.
58. KONISHI, M.; TABATA, Y.; KARIYA, M.; SUZUKI, A.; MANDAI, M.; NANBU, K.; TAKAKURA, K.; FUJII, S.; *Journal of Controlled Release*, 2003, **92**: 301.
59. LIMA, D. U.; OLIVEIRA, R. C.; BUCKERIDGE, M. S.; *Carbohydrate Polymers*, 2003, **52**: 367.
60. LUCYSZYN, N.; QUORIN, M.; KOEHLER, H. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R.; *Science Horticulturae*, 2006, **107**: 358.
61. MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J.P.A.; DE PAULA, R. C. M.; *Carbohydrate Polymers*, 2008, **71**: 559.
62. MARK, H.; OVERBEIGER, C.; OTHMAR, D.; SEABORG, G.; *Rheologica Acta-Encyclopedia of Chemical Technology*, volume 12, 3ª edição, John Wiley & Sons In, 1980.

63. MATOS, V. C.; *Tese de Doutorado*, Gomas endospérmicas de *Delonix regia* e *Schizolobium parahybae*. Universidade Federal do Ceará, 2000.
64. McCLEARY, B.V.; AMADO, R.; WAILEL, R.; *Carbohydrate Research*, 1981, **92**: 269.
65. 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.
66. MEER, G.; MEER, W. A.; TINKER, J.; *Food Technology*, 1975, **29**: 22.
67. MERCÊ, A. L. R.; LOMBARDI, S. C.; MANGRICH, A. S.; REICHER, F.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M. R.; *Carbohydrate Polymers*, 1998, **35**: 13.
68. MESQUITA, J. C.; SANTANA, A. A.; REIS, M. C.; LIMA, H. S.; SILVA, A. M.; REIS, T. M.; SOARES, G. M.; MUNIZ, W. F.; GARROS-ROSA, I.; *VI Reunião Regional Nordeste SSBq*, Fortaleza, 2002.
69. MILAS, M.; RINAUDO, M.; *Polieletrólitos*. Instituto de Física e Química de São Paulo – USP, São Carlos, p. 83, 1991.
70. MORRIS, E.R.; Mixed polymer gels. In: HARRIS, P.; *Food Gels*, London: Elsevier Applied Science. p. 291-359, 1990.
71. MORRIS, E. R.; Polysaccharide Rheology and in-Mouth Perception. In: STEPHEN, A. M.; *Food polysaccharides and their applications*. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 517-546.
72. MORRIS, E. R.; CUTTLER, A. N.; ROSS-MURPHY, S. B.; RESS, D. A.; *Carbohydrate Polymers*, 1981, **1**: 5.
73. MORRIS, E. R.; Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A.; *Gums and stabilizers for the food industry*, v. 2, p. 57-58, 1984.

74. NETO, J.F.M.; Osteoartrite. Disponível em: <<http://www.msdrasil.com/msdbrazil/patients/biblioteca/artigos/osteoartrite/artigo2.html>> Acesso em: 28 jun.2006.
75. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Importação. Disponível em: <<http://www.aliceweb.desenvolvimento.gov.br>> Acesso em 02 jan. 2007.
76. NAVARRO, R.F.; *Fundamentos de reologia de polímeros*. Caxias do Sul, 1997, p. 9-11, 141-144.
77. NEUKOM, H.; *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1989, **22**: 41.
78. OLIVEIRA, J. D.; SILVA, D. A.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA H. C. B.; *International Journal of Biological Macromolecules*, 2001, **29**: 35.
79. ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I. M.; COIMBRA, T. L. M.; GORIN, P. A. J.; SIERAKOWSKI, M-R.; *Antiviral Research*, 2003, **60**: 201.
80. PANEGASSI, V. R.; SERRA, G. E.; BUCKERIDGE, M. S.; *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 2000, **20**: 3.
81. PASQUALI R.I.; GUERRA, D.; TAPARELLI, F.; BORALDI, F.; BERGAMINI, G.; MORI, G.; ZIZZI, F.; FRIZZIERO, L.; *Rheumatology*, 2001, **40**: 158.
82. PELLETIER, J. M.; *Osteoarthritis and Cartilage*, 2004, **12**: 31.
83. PELLETIER, S.; HUBERT, P.; PAYAN, E.; MARCHAL, P.; CHOPLIN, L. E DELLACHERIE, E.; *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, **54**: 102.
84. PEPPAS, N.; BURESA, P.; LEOBANDUNGA, W.; ICHIKAWA H.; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, **50**: 27.

85. PHYTOCHEMICALS Site:
<<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rutin>> Acesso em
Março, 2008.
86. POZO, M.; BALAZS, E.; BELMONTE, C.; *Experimental Brain Research*.
1997, **116**: 3.
87. PRIETO, J.; PULIDO, M.; ZAPICO, J.; MOLINA, A.; GIMENO, M.;
CORONEL, P.; ALVAREZ, A.; *International Journal of Biological
Macromolecules*, 2005, **35**: 63.
88. PTCL- Physical & Theoretical Chemistry Laboratory. Safety (MSDS) data
for glutaric dialdehyde. Disponível em: <[http://
physchem.ox.ac.uk/MSDS/GL/glutaric_dialdehyde.html](http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/GL/glutaric_dialdehyde.html)>. Acesso em: 09
jul.2006.
89. RAO, M. A.; STEFFE, J. F.; *Viscoelastic properties of foods*. New York:
Elsevier Applied Science, 1992, p. 207-231.
90. RAKHMANBERDYEVA, R. K.; SHASHKOV, A. S.; *Chemistry of Natural
Compounds*, 2005, **41**: 14.
91. RECHIA, C. G. V.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.;
REICHER, F.; *International Journal of Biological Macromolecules*, 1995,
17: 409.
92. RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES. Subcommittee on the Tenth
Edition of RDAs. Washington, National Academic Press, 1989. Cap.10.
p.195-246.
93. REID, G.J.S.; Galactomannans. In: DEY, P.M.; DIXON, R.A.;
Biochemical of Story Carbohydrate. London: Academic Press. p. 265-
286, 1985.
94. RINAUDO, M.; *Food Hydrocolloids*, 2001, **15**: 433.
95. RIZZINI, C. T.; *A Flora do Cerrado*, São Paulo: ed. USP, 1963, p. 127-
177.

96. ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S.B.; MORRIS, E.R.; *Carbohydrate Research*, 1982, **107**: 17.
97. RODRIG, H.; BASCH, A.; LEWIN, M.; *Journal Polymer Science: Polymer Chemistry*, 1975, **13**: 1921.
98. ROJAS, E. G. A.; *Tese de Doutorado*, Instituto de Macromoléculas da UFRJ, Rio de Janeiro, 1999.
99. ROSIAK, J. M.; YOSHEL, F.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1999, **151**: 56.
100. RUJIRAVANIT, R.; KRUYKITANON, S.; JAMIESON, A.M.; TOKURA, S.; *Macromolecular Bioscience*, 2003, **3**: 604.
101. SCHOTT, H.; Reologia. In: GENARO, A. R.; Remingtons: Farmacia. Buenos Aires: Ed. Med.Panamericana, 1992, p. 461-481.
102. SCRHAMM, G.; Reologia e Reometria. Fundamentos Teóricos e Práticos. São Paulo: Artliber, 2006.
103. SEAMAN, J.; in: Handbook of Water-Soluble Gums and Resins, R. Davidson, ed., McGraw-Hill Book Company, 1980.
104. SERPE, E.R.; FREITAS, R.J.S.; *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 1991, **9**: 141.
105. SHIAVINATO, A.; BELLIN, D. (2008) United States Patent Application 20080069884, deposited on August 15, 2007.
106. SHOBHA, M.S.; VISHU KUMAR, A.B.; THARANATHAN, R.N.; KOKA, R.; GAONKAR, A.K.; *Carbohydrate Polymers*, 2005, **62**: 267.
107. SIERAKOWSKI, M. R.; FREITAS, R. A.; FUJIMOTO, J.; PETRI, D. F. S.; *Carbohydrate Polymers*, 2002, **49**: 167.
108. SILVA, D. A.; FEITOSA, J.P.A.; MACIEL, J. S.; PAULA, H. C. B., DE PAULA, R. C. M; *Carbohydrate Polymers*, 2006, **66**: 16.

109. SINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C.; *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1987, **11**: 209.
110. SORVARI, S.; TOLDI, O.; AHANEN, K.; VIINAMAKI, T.; HAKONEM, T.; TAHVONEN, R.; *Journal American Society Hortic. Science*, 1997, **122**: 878.
111. STANLEY, W.; FRANCONI, C.; LOSSOW, W.; *Anatomia e Fisiologia Humana*, 5ª edição, Editora Guanabara, 1990.
112. SUGUI, J. A.; *Dissertação de Mestrado*, Aplicação de galactomanana de *Mimosa scabrella* (Bracatinga): Interação com surfactantes e proteína. Universidade Federal do Paraná, 1994.
113. THE ARTHRITIS SOCIETY. Osteoarthritis. Disponível em: <<http://www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/osteoarthritis/default.asp?s=1>>. Acesso em: 26 jun. 2006.
114. TOMASSINI, E.; MORS, W. B.; *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1966, **38**: 321.
115. VALENGA, F.; *Dissertação de Mestrado*, Estudos de interação entre galactomanana e alginato e possíveis aplicações. Universidade Federal do Paraná, 2007.
116. VENDRUSCOLO, C. W.; ANDREAZZA, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T. M. B.; *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, **296**: 1.
117. VENDRUSCOLO, C. W.; *Dissertação de Mestrado*, Goma xantana e galactomanana (*M. scabrella*): Desenvolvimento de matrizes hidrofílicas para liberação modificada de teofilina. Universidade do Vale do Itajaí, 2005.
118. VIEBKE, C.; PICULELL, L.; *Carbohydrate Polymers*, 1992, **29**: 1.

119. VIEIRA, I. G. P.; *Tese de Doutorado*, Estudo químico de *Dimorphandra* ssp (Leguminosae) e preparação de complexos de flavonóides com fosfolipídios. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
120. VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALLÃO, M. I.; DE BRITO, E. S.; *Food Chemistry*, 2007, **101**: 70.
121. VILLETTI, M. A.; CRESPO, J. S.; SOLDI, M. S.; PIRES, A. T. N.; BORSALI, R.; SOLDI, V.; *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2002, **67**: 295.
122. WALTER, R. H.; *Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food*. San Diego: Academic Press, 1998.
123. WHISTLER, R. L.; HYMOWITZ, T.; Guar: Agronomy, Production, Industrial Use and Nutrition. Indiana: Purdue University Press, 1979.
124. WHISTLER, R. L.; Solubility of Polysaccharides and their behaviour in solution. In: Carbohydrates in Solution. ACS Advances in Chemistry Series, 117, 1973, p. 242.
125. WIELINGA, W. C. Application of gum-based stabilization systems in ice-cream and fruit ices. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J. & WILLIAMS, P. A. ed. Gums and Stabilisers for the Food Industry - Application of Hydrocolloids. Pergamon Press, 1982, **2**: 251.
126. WIENTJES, R.; DUIJS, M.; JONGSCHAAP, R.; MELLEMA, J.; *Macromolecules*, 2000, **33**: 9594.
127. WIKIPEDIA Site: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Semente>> Acesso em Fevereiro, 2009.
128. WOBIG, M.; BACH, G.; BEKS, P.; DICKHUT, A.; RUNZHEIMER, J.; SCHWIEGER, G.; VETTER, G.; BALAZS, E.; *Clinical Therapeutics*, 1999, **21**: 154.
129. WORANOWICZ, S. M.; GORIN, P. A. J.; MARCELLI, M. P.; TORRIS, G.; IACOMINI, M.; *The Lichenologist*, 1997, **29**: 471.

130. ZHAN, D. F.; RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.; MORRIS, V. J.;
Carbohydrate Polymer, 1993, **21**: 53.