



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**Modificações Químicas do Ácido Hialurônico para a
Produção de Géis Reticulados e de Fosfolipídios
Derivatizados**

Autora: Andréa Arruda Martins Shimojo

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Fevereiro/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Sh62m Shimojo, Andréa Arruda Martins
Modificações químicas do ácido hialurônico para a
produção de géis reticulados e de fosfolipídios
derivatizados / Andréa Arruda Martins Shimojo. --
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Ácido Hialurônico. 2. Hidrogel. 3. Osteoartrite.
4. Reologia. 5. Lipossomos. I. Santana, Maria Helena
Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Chemical modification of hyaluronic acid for production of
cross-linked gels and derivatized phospholipids

Palavras-chave em Inglês: Hyaluronic Acid, Hydrogel, Osteoarthritis, Rheology,
Liposome

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Giuliana Piovesan Alves, Lucimara Gaziola de La Torre

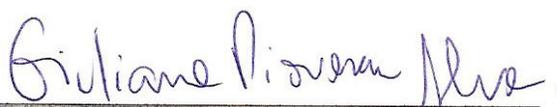
Data da defesa: 25/02/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Andréa Arruda Martins Shimojo e aprovada em 25 de fevereiro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Dr.^a. Maria Helena Andrade Santana



Dr.^a. Giuliana Piovesan Alves



Dr.^a. Lucimara Gaziola de La Torre

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Andréa Arruda Martins Shimojo e aprovada pela comissão julgadora em 25 de fevereiro de 2011.



Prof.^a. Dr.^a. Maria Helena Andrade Santana

*“Que o teu trabalho seja perfeito para que,
mesmo depois da tua morte, ele permaneça”.*

Leonardo da Vinci

Aos amores da minha vida

Luther, Laura e Júlia.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Helena Andrade Santana pela oportunidade, orientação e confiança durante a execução deste trabalho.

Em especial à minha querida amiga Aline Mara Barbosa Pires, aluna de pós-doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela imensa colaboração, incentivo, carinho, paciência e principalmente pela grandeza de sua amizade. Minha eterna gratidão.

À minha grande amiga Professora Dra. Lucimara Gaziola de La Torre do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp pelo incentivo constante e pelas sempre perfeitas sugestões ao longo do trabalho.

À Dra. Mariana Altenhoffen da Silva, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, pelo carinho em participar das bancas de qualificação e defesa.

À Empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. pelos espectros de infravermelho e em especial à Dra. Giuliana Alves Piovesan pela colaboração na execução deste trabalho.

Ao amigo Gilson Barbosa Maia Jr., técnico do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB), pela paciência, dedicação e amizade em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Edvaldo Sabadini do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da Unicamp pela utilização do reômetro e à sua aluna de doutorado, Liliam Padula pela colaboração e disponibilidade.

Ao Professor Dr. César Costapinto Santana do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp pela utilização do Laboratório de Propriedades Coloidais.

Ao Professor Dr. William Dias Belangero e as suas alunas Nilza Alzira Batista e Ana Amélia Rodrigues do Laboratório de Biomateriais em Ortopedia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelas análises *in vitro*.

Ao técnico Moisés Barbosa do Departamento de Plásticos do Colégio Técnico da UNICAMP (COTUCA) pelas análises de força de extrusão.

Ao técnico Disney Ricardo Tomazelli do Departamento de Tecnologia de Polímeros da FEQ/UNICAMP pelas análises térmicas.

Aos colegas do LDPB Amanda, André, Beatriz, Carolina, Caroline, Daniel, Felipe, Fernanda, Gabriela, Jonny, Júlia, Leandra, Marcos, Marina, Pablo, Rafaela, Renata, Suzana, Thiago, Viviane Ferri e Viviane Pasquotto. Em especial à querida amiga Patrícia Severino que me instigou a iniciar esta jornada.

Ao meu aluno de Iniciação Científica, Rafael Lichy, pela ajuda e principalmente para imensa paciência.

Aos colegas que passaram pelo LPCR durante o período deste trabalho, em especial à Anayla, Luísa, João Paulo, Absolon e Rafael.

À Professora Dra. Sônia Maria Malmonge da Universidade Federal do ABC pelos conselhos, amizade e pela serenidade contagiante.

Ao meu marido Luther, pelo amor, incentivo, dedicação, paciência, apoio e compreensão em todos os momentos. Sem você nada disso teria se realizado.

As minhas filhas Laura e Júlia, pelas férias perdidas, pelas incontáveis horas no laboratório, pela compreensão, amor e paciência.

À toda minha família, pelo apoio e incentivo. Em especial, quero agradecer minha tia Therezinha Zani pelo amor, apoio e pela torcida em todos os momentos mais importantes da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento.

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas as reações de modificação química do ácido hialurônico (AH) com divinilsulfona (DVS) para preparação de géis reticulados e com carbodiimidias para preparação de fosfolipídios derivatizados. A modificação com DVS envolve os grupos hidroxílicos do AH, enquanto a modificação mediada por carbodiimida envolve os grupos carboxílicos do AH e o grupo amina do fosfolipídio. A extensão da reação de reticulação do AH com divinilsulfona (DVS) foi estudada em relação à razão mássica AH/DVS e concentração de NaOH na mistura reacional. O grau de modificação dos géis foi correlacionado com a reologia e a razão de intumescimento (RI). As reações de reticulação foram realizadas com AH de origem bacteriana de massa molar média da ordem de 10^5 Da. O gel plano preparado com concentrações de AH e NaCl de 3g/100g e em pH alcalino foi submetido a alto cisalhamento para produção de partículas. A reologia desses géis foi estudada em relação ao diâmetro médio das partículas e razão mássica gel/fluido. Um gel com propriedades reológicas semelhantes ao fluido sinovial foi preparado com partículas entre 75 e 100 μm e razão mássica gel/fluido (AH 1g/100g) de 75:25, o qual foi avaliado quanto à sua citotoxicidade em ensaios *in vitro*. Os resultados mostraram que a concentração de DVS é diretamente proporcional à dureza e à viscoelasticidade do gel, mas inversamente proporcional a RI. Os géis mostraram comportamento não Newtoniano pseudoplástico em toda a faixa de taxa de cisalhamento estudada. Nas medidas oscilatórias, foi observado comportamento característico de géis, com o módulo elástico maior que o viscoso ($G' > G''$), ambos independentes da frequência. Baseado nos parâmetros reológicos, os géis foram classificados em covalentes e fracos. A alcalinidade da mistura reacional foi inversamente proporcional à viscosidade do meio e à dureza do gel. O tamanho de partícula foi diretamente proporcional à dureza do gel e à viscosidade. O aumento da porcentagem da fase fluida (solução de AH 1% não reticulado) causou redução em G' e G'' e nas forças de extrusão. O gel analisado *in vitro* não apresentou efeitos citotóxicos. O conjugado AH-fosfolipídio foi preparado através da ativação do AH com *1-ethyl-3-(3-dimethyl)aminopropyl carbodiimide hydrochloride* (EDCA) em pH 4,0 e adição do fosfolipídio *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine* (DPPE) em pH 8,6. Os conjugados obtidos foram separados por ultrafiltração e caracterizados por cromatografia em camada delgada, ressonância magnética nuclear de próton, teor de fosfato e AH. A capacidade de incorporação do conjugado em bicamada lipídica foi avaliada através da preparação de lipossomas compostos de lecitina de ovo e DPPE, contendo 5, 10 e 15% do conjugado. Os resultados obtidos indicaram modificação do tamanho, polidispersidade e das propriedades de superfície dos lipossomas preparados com incorporação do conjugado AH-DPPE. Esses resultados contribuem para o desenvolvimento de produtos à base de AH, para aplicações nas áreas médica, farmacêutica e de cosméticos.

Palavras-chave: ácido hialurônico, géis, reticulação, osteoartrite, fosfolipídios, lipossomas.

ABSTRACT

In this work, it was studied the chemical modification of hyaluronic acid (HA) with divinyl sulfone (DVS) for the preparation of cross-linked hydrogels and with carbodiimides for the preparation of derivatized phospholipids. The modification with DVS involves the hydroxyl groups of HA, while the carbodiimide-mediated modification involves the carboxylic groups of HA and the amino group of the phospholipid. The cross-linking reaction of HA with DVS has been studied regarding the HA/DVS mass ratio and NaOH concentration in the reaction mixture. The modification degree of the gels was correlated with their rheological properties and swelling ratios (SR). The crosslinking reactions were performed with bacterial hyaluronic acid of molecular weight around 10^5 Da. The hydrogels plans prepared with concentrations of HA and NaCl of 3g/100g and at alkaline pH were subjected to high shear to produce particles. The rheology of these hydrogels was studied in relation to the average particle size and gel/fluid mass ratio. A gel with rheological properties similar to synovial fluid was prepared with particles between 75 and 100 micrometres and gel/fluid mass ratio (HA 1g/100g) of 75:25. The cytotoxicity of this gel was evaluated through tests *in vitro*. The results showed that the DVS concentration was directly proportional to the hardness and viscoelasticity of the hydrogel, but it was inversely proportional to the SR. The hydrogels showed non-Newtonian pseudoplastic behavior in the range of shear rate studied. In the oscillatory measurements, the cross-linked HA hydrogels exhibited characteristic behavior of gels, with the elastic modulus higher than the viscous modulus ($G' > G''$), both frequency independent. Furthermore, based on the rheological parameters, the gels were classified as covalent and weak. The alkalinity of the reaction mixture was inversely proportional to the viscosity of the medium and to the hardness of the hydrogel. The particle size was directly proportional to the hardness and viscosity of the hydrogel. The increase in the percentage of fluid phase caused a reduction in G' and G'' and the extrusion forces. The hydrogel analysed *in vitro* showed no cytotoxic effects. The HA-phospholipid conjugate was prepared through the activation of HA with 1-ethyl-3-[3-dimethyl aminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDCA) at pH 4.0 and addition of the phospholipid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) at pH 8.6. The conjugates were separated by ultrafiltration and characterized by thin layer chromatography, proton nuclear magnetic resonance, phosphate and HA content. The incorporation ability of the conjugate into the lipid bilayer was evaluated through the preparation of liposomes composed of egg lecithin and DPPE containing 5, 10 and 15% of the conjugate. The liposomes were characterized by size, polydispersity and zeta potential, and compared with the control (no conjugate). The results indicated modification of the size, polydispersity and surface properties of liposome-conjugates HA-DPPE. These results contribute to the development of HA-based products for applications in medical, pharmaceutical and cosmetic industries.

Keywords: *hyaluronic acid, gels, crosslinking, osteoarthritis, phospholipid, liposomes.*

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
SUMÁRIO	xvii
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxvii
NOMENCLATURA	xxxii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVO	5
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. ÁCIDO HIALURÔNICO	7
2.1.1. Breve Histórico e Terminologia.....	7
2.1.2. Estrutura Química.....	8
2.1.3. Funções Fisiológicas.....	12
2.1.4. Fontes de Ácido Hialurônico.....	12
2.2. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS	13
2.2.1. Modificação do Grupo Carboxílico.....	15
2.2.1.1. Esterificação.....	15
2.2.1.2. Reações Mediadas por carbodiimida.....	16
2.2.1.2.1. Mecanismo da reação de conjugação AH-DPPE.....	17
2.2.2. Modificação do Grupo Hidroxílico.....	19
2.2.2.1. Sulfatação.....	19
2.2.2.2. Esterificação.....	19
2.2.2.3. Acoplamento com Isouréia.....	20
2.2.2.4. Oxidação com Periodato.....	20
2.2.2.5. Esterificação.....	20
2.2.3. Outras Modificações.....	21
2.2.3.1. Modificação do Terminal Reduzido.....	21
2.2.3.2. Modificação da Amida.....	21
2.2.4. Reticulação.....	22

2.2.4.1. Hylans.....	23
2.2.4.1.1. Mecanismo da reação de reticulação.....	25
2.3. APLICAÇÕES DO AH.....	26
2.3.1. Aplicações Médicas e Cosméticas.....	27
2.3.1.1. Viscocirurgia (Oftalmologia).....	27
2.3.1.2. Viscosuplementação (Ortopedia e Reumatologia).....	28
2.3.1.2.1. Osteoartrite.....	28
2.3.1.2.2. Viscosuplementos Comerciais.....	32
2.3.1.3. Viscoamento (Dermatologia e Cirurgia Plástica).....	35
2.3.1.4. Viscoproteção.....	37
2.3.1.5. Viscosseparação ou Viscoadesão.....	38
2.4. PROPRIEDADES REOLÓGICAS.....	39
CAPÍTULO 3- MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1. PREPARAÇÃO DE GÉIS RETICULADOS DE AH.....	45
3.1.1. Purificação do Ácido Hialurônico.....	45
3.1.2. Reticulação com divinilsulfona.....	46
3.1.3. Desintegração dos géis.....	46
3.1.4. Preparação de fluido de AH (1-1,25 g/100g).....	47
3.1.5. Avaliação dos parâmetros da reação de reticulação.....	47
3.1.5.1. Efeito da razão mássica AH/DVS.....	48
3.1.5.2. Efeito da concentração de NaOH.....	48
3.1.5.3. Efeito da razão mássica gel/ fluido.....	48
3.1.5.4. Efeito do diâmetro médio das partículas.....	49
3.1.5.5. Efeito da esterilização.....	49
3.1.5.5.1. Efeito da esterilização no AH seco (matéria-prima).....	50
3.1.5.5.2. Efeito da esterilização em soluções de AH.....	50
3.1.5.5.3. Efeito da esterilização nos géis de AH reticulados com DVS e nas misturas gel/fluido.....	50
3.1.5.6. Efeito da pureza da matéria-prima nas propriedades estruturais dos géis.....	51

3.1.6. Caracterização de géis reticulados de AH.....	51
3.1.6.1. Análise reológica.....	51
3.1.6.2. Diâmetro médio das partículas.....	52
3.1.6.3. Concentração de AH.....	52
3.1.6.4. Massa molar média de AH.....	52
3.1.6.5. Concentração de proteínas.....	53
3.1.6.6. Razão de Intumescimento.....	53
3.1.6.7. Caracterização Estrutural.....	54
3.1.6.8. Força de Extrusão.....	54
3.1.6.9. Grau de Modificação.....	55
3.1.6.10. Perfil Térmico.....	55
3.1.6.11. Análises Microbiológicas.....	56
3.1.6.11.1. Contagem de bactérias (mesófilos totais).....	56
3.1.6.11.2. Contagem de bolores e leveduras.....	57
3.1.6.12. Teste <i>in vitro</i>	58
3.1.6.12.1. Testes de viabilidade celular.....	58
3.2. PREPARAÇÃO DO CONJUGADO AH-DPPE.....	59
3.2.1. Preparação do AH-DPPE.....	59
3.2.2. Caracterização do AH-DPPE.....	60
3.2.3. Preparação de Lipossomas.....	61
CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1. PREPARAÇÃO DE GÉIS RETICULADOS DE AH.....	63
4.1.1. Purificação do ácido hialurônico.....	63
4.1.2. Reticulação com divinilsulfona.....	65
4.1.2.1. Caracterização Estrutural.....	66
4.1.3. Desintegração dos Géis.....	68
4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO....	70
4.2.1. Efeito da razão mássica AH/DVS.....	70
4.2.1.1. Concentração de AH.....	72
4.2.1.2. Teor de proteínas.....	75
4.2.1.3. Razão de intumescimento.....	76

4.2.1.4. Perfil térmico.....	78
4.2.1.5. Caracterização reológica.....	82
4.2.1.6. Grau de modificação.....	91
4.2.2. Efeito da Concentração de NaOH.....	93
4.2.2.1. Razão de intumescimento.....	95
4.2.2.2. Perfil térmico.....	96
4.2.2.3. Caracterização reológica.....	98
4.2.3. Efeito da razão mássica gel/ fluido.....	103
4.2.4. Efeito do diâmetro médio das partículas.....	107
4.2.5. Efeito da esterilização.....	111
4.2.5.1. Efeito da esterilização no AH seco (matéria-prima).....	112
4.2.5.2. Efeito da esterilização em soluções de AH.....	114
4.2.5.3. Efeito da esterilização nos géis de AH reticulados com DVS e nas misturas gel/fluido.....	116
4.2.6. Efeito da pureza da matéria-prima nas propriedades estruturais dos géis.....	118
4.2.7. Variabilidade da reação de reticulação.....	120
4.2.8. Efeito da massa molar média.....	121
4.2.9. Estabilidade reológica.....	123
4.2.10. Testes <i>in vitro</i>	124
4.2.10.1. Testes de viabilidade celular.....	124
4.2.10.1.1. Método de incorporação do vermelho neutro.....	124
4.2.10.1.2. Método do MTT.....	125
4.3. PREPARAÇÃO DO CONJUGADO AH-DPPE.....	126
4.3.1. Avaliação da reação de conjugação.....	126
4.3.2. Avaliação da reação por Cromatografia em Camada Delgada.....	127
4.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton.....	128
4.3.4. Preparação de Lipossomas.....	130
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	133
5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	139
CAPÍTULO 6 – BIBLIOGRAFIA.....	141
ANEXOS.....	155

Figura 1.1	Aplicações do ácido hialurônico nas áreas médico-farmacêutica e cosmética.....	2
Figura 2.1	Estrutura primária do AH: unidades repetidas dissacarídicas do ácido hialurônico.....	8
Figura 2.2	Estrutura secundária do AH (Adaptado de Almond <i>et al.</i> , 1998).....	9
Figura 2.3	Estrutura terciária do AH: Estrutura de fita torcida da molécula de AH em solução, com faces hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (vermelhas) (Macedo, 2006).....	10
Figura 2.4	Relação entre a estrutura da beta D-glicose (A) e a estrutura dissacarídica do AH (B) (Adaptado de Hascall & Laurent, 1997).....	10
Figura 2.5	Grupos de Modificação Química: (1) <i>carboxílico</i> , (2) <i>hidroxílico</i> , (3) <i>acetamida</i> , (4) <i>Terminal Reduzido do Polímero</i> (Adaptado de Garg & Hales, 2004).....	14
Figura 2.6	Mecanismo da reação entre AH e fosfolipídio (DPPE) mediada por carbodiimida (EDAC) (Adaptado de Kuo <i>et al.</i> , 1991).....	18
Figura 2.7	Reações de reticulação do AH (A) Com diepóxido, (B) Com biscarbodiimida, (C) Com dihidrazida mediada com carbodiimida (D) Com divinilsulfona, (E) Fotoreticulação de derivados metacrilados de AH (Leach & Schimdt, 2004).....	23
Figura 2.8	Mecanismo da reação de reticulação de AH com DVS (Leshchiner <i>et al.</i> , 2007).....	26
Figura 2.9	Curvas de escoamento para fluido Newtonianos e não-Newtonianos (Braga, 2006).....	40
Figura 2.10	Respostas de um material ideal elástico, de um material ideal viscoso e de um material viscoelástico a uma deformação senoidal (ângulo de fase δ , taxa de cisalhamento γ , tensão de cisalhamento σ e frequência angular ω) (Steffe, 1996).....	42
Figura 2.11	Espectro mecânico e curva de fluxo típicos de géis (Adaptado de Chronakis & Kasapis, 1995).....	42

Figura 3.1	Parâmetros da reação de reticulação de AH com DVS avaliados neste trabalho.....	47
Figura 3.2	Suporte para acoplamento das seringas usadas nas análises de força de extrusão.....	54
Figura 3.3	Estequiometria da reação de reticulação de AH com DVS.....	55
Figura 3.4	Procedimento para contagem de bactéria usando método da diluição seriada.....	57
Figura 4.1	Protocolos de purificação do AH. (a) Protocolo descrito por Won & Seo, 2008. (b) Protocolo usado neste trabalho.....	64
Figura 4.2	Meio fermentado após etapas de purificação segundo Won e Seo, 2008.....	64
Figura 4.3	Soluções 3% (g/100g) preparadas a partir de AH com 30% e 70% (g/100g) de pureza.....	65
Figura 4.4	Espectros de Infravermelho: (a) Gel de AH reticulado com DVS preparado neste estudo ($[AH]$ e $[NaCl] = 3\%$, AH/DVS 1:1, $[NaOH] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), (b) Ácido hialurônico bacteriano, (c) <i>Synvisc</i> [®] - Transmitância versus número de onda (cm^{-1}).....	66
Figura 4.5	Curvas de distribuição de tamanhos de partículas em volume do gel reticulado de AH obtidas por diferentes métodos de desintegração do gel.....	68
Figura 4.6	Diâmetros médios de partículas (em volume) do gel reticulado de AH (AH/DVS 2:1, $[NaOH]=0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) em função do tempo de agitação em turrax a 24.000 rpm. Médias referentes a 10 leituras.....	69
Figura 4.7	Géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS. (a) AH/DVS 1:1, 2:1, 3:1 e 5:1. (b) AH/DVS 1:5.....	71
Figura 4.8	Razão de Intumescimento (Q) e grau de modificação de géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS (Concentração de AH na solução de partida 3% (g/100g), 25°C, 4 horas).....	78
Figura 4.9	Termogramas dos géis de AH com diferentes razões mássicas AH/DVS (Concentração de AH na solução de partida 3% (g/100g), 25°C, 4 horas).....	79

Figura 4.10	Termogramas do AH Bacteriano (LDPB) usado neste trabalho para a preparação dos géis e do AH usado por Barbucci e colaboradores (2000).....	80
Figura 4.11	Termogramas dos géis de AH intumescidos preparados com diferentes razões mássicas AH/DVS.....	81
Figura 4.12	Espectro de oscilação dos géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl]= 3% (g/100g), [NaOH]= 0,1 mol.L ⁻¹ , 25°C, 4 horas).....	83
Figura 4.13	Cadeias de AH com diferentes graus de reticulação (Adaptado de Kablik <i>et al.</i> , 2009).....	84
Figura 4.14	Módulo de estocagem (G') em função da razão mássica AH/DVS.....	87
Figura 4.15	Curvas de fluxo dos géis de AH com diferentes razões mássicas AH/DVS.....	88
Figura 4.16	Espectro de oscilação da solução de AH 3% (massa/volume) e do gel de AH reticulado (AH/DVS 1:1).....	90
Figura 4.17	Comparação entre as curvas de fluxo da solução de AH 3% (m/v) e do gel de AH reticulado (AH/DVS 1:1).....	91
Figura 4.18	Géis de AH reticulados com DVS com diferentes concentrações de NaOH (a) 0,05, 0,1 e 0,2 mol.L ⁻¹ e (b) 0,5 e 1 mol.L ⁻¹ ([AH] e [NaCl]=3% e AH/DVS 1:1).....	94
Figura 4.19	Razão de Intumescimento (Q) de géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (Concentração de AH na solução de partida 3% (g/100g), 25°C, 4 horas, AH/DVS 1:1).....	96
Figura 4.20	Termogramas dos géis de AH preparados com diferentes concentrações de NaOH (0,05, 0,1 e 0,2 mol.L ⁻¹) (AH/DVS 1:1).....	97
Figura 4.21	Espectro de oscilação dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH ([AH] e [NaCl]=3g/100g, AH/DVS 1:1).....	99
Figura 4.22	Viscosidade da mistura reacional em função da concentração de NaOH.....	99
Figura 4.23	Massas molares médias das misturas reacionais em diferentes concentrações de NaOH (2 horas de dissolução).....	100

Figura 4.24	Viscosidade dos géis de AH com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1).....	102
Figura 4.25	Espectro de oscilação de misturas gel/fluido com diferentes razões mássicas. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹ , D=75-100 µm. Fluido: 1% (massa/volume).....	104
Figura 4.26	Espectro mecânico da mistura gel/fluido 60:40 e do fluido de AH 1%.	104
Figura 4.27	Curvas de fluxo das misturas gel/fluido com diferentes razões mássicas. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹ , D=75-100 µm. Fluido: 1% (massa/volume).....	105
Figura 4.28	Força de extrusão das misturas gel/fluido com diferentes razões mássicas. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹ , D=75-100 µm. Fluido: 1% (massa/volume).....	107
Figura 4.29	(a) Espectro de oscilação de géis de AH com diferentes tamanhos de partículas. (b) Ângulo de fase em função da frequência para géis com diferentes tamanhos de partículas. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹	108
Figura 4.30	Viscosidade complexa (η^*) versus frequência de oscilação e viscosidade aparente (η) versus taxa de cisalhamento de géis com diferentes tamanhos de partículas. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹	109
Figura 4.31	Massa molar média de AH bacteriano seco e de uma solução de AH 1% (m/m) submetido a diferentes tempos de tratamento térmico em autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm ²).....	113
Figura 4.32	Massas molares médias obtidas para soluções de AH com concentrações de 1% e 7% (m/m) submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico em autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm ²).....	115
Figura 4.33	Comportamento reológico de géis de AH reticulados com DVS e de misturas gel/fluido (75:25 e 70:30) antes e após processo de esterilização em autoclave a 126°C por 2,5 minutos. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹ , D=75-100 µm. Fluido: 1% (massa/volume). (a) Espectro de oscilação e (b) Curva de	

	Fluxo. (E)=estéril e (NE)=não esterilizado.....	117
Figura 4.34	Placas para a contagem de (a) Mesófilos Totais e (b) Bolores e Leveduras em gel de AH reticulado com DVS (AH/DVS 1:1).....	118
Figura 4.35	Géis obtidos a partir de AH com diferentes graus de pureza. (a) 30% e (b) 70%. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹ , D=75-100 µm.....	119
Figura 4.36	Espectros de Oscilação de géis obtidos a partir de AH com diferentes graus de pureza. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹ , D=75-100 µm.....	120
Figura 4.37	Variabilidade da reação de reticulação. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹ , D=75-100 µm.....	121
Figura 4.38	Espectros de oscilação do gel <i>Controle</i> (6,6 x 10 ⁵ Da) e do produto comercial Synvisc®. (2 x 10 ⁶ Da).....	122
Figura 4.39	Estabilidade reológica da mistura gel/ fluido 75:25. (gel de AH preparado com AH 10 ⁵ Da na concentração de 3g/100g, [NaCl]=3 g/100g, [NaOH]=0,1 mol.l ⁻¹ , diâmetro médio de partícula= 75-100µm e razão mássica AH/DVS 1:1 e fluido preparado a partir de AH 10 ⁵ Da na concentração de 1g/100g em PBS). (a) Espectro de Oscilação e (b) Curva de Fluxo.....	123
Figura 4.40	Análise de citotoxicidade indireta pelo ensaio de Viabilidade Celular pelo Método de Incorporação do Vermelho Neutro com células VERO (nível de significância 0,05).....	125
Figura 4.41	Análise de citotoxicidade indireta pelo ensaio de Viabilidade Celular pelo Método do MTT com células VERO (p=0,05).....	126
Figura 4.42	Placas de Cromatografia de Camada Delgada (fase móvel CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 65:25:2). Reações realizadas com: (a) AH MM=10 ⁴ Da; (b) AH MM=10 ⁵ Da; (c) AH MM=10 ⁶ Da. <i>Compostos aplicados:</i> (1)=AH; (2)=DPPE; (3)=Retido na Membrana; (4)=Filtrado.....	127
Figura 4.43	Espectros de RMN ¹ H das amostras de conjugado AH-DPPE preparados a partir de AH (a) 10 ⁴ Da, (b) 10 ⁵ Da e (c) 10 ⁶ Da.....	130

Tabela 2.1	Nomenclaturas científicas do AH (Adaptada de Romagnoli & Belmontesi, 2008).....	8
Tabela 2.2	Comparação entre as propriedades reológicas do AH e <i>Hylans</i> (Adaptado de Band, 1998).....	25
Tabela 2.3	Efeito da reticulação no tempo de residência nos tecidos. Comparação entre AH e Hylan B (Adaptado de Band, 1998).....	25
Tabela 2.4	Áreas de aplicação clínica do AH e de seus derivados descrita por Balazs (2004) (Adaptado de Kogan <i>et al.</i> , 2007).....	27
Tabela 2.5	Parâmetros reológicos do fluido sinovial em indivíduos jovens e idosos e em pacientes com OA (Adams, 2000).....	30
Tabela 4.1	Propriedades físico-químicas dos géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl] = 3g/100g e [NaOH]= 0,1 mol.L ⁻¹).....	71
Tabela 4.2	Teores de AH encontrados nos géis reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl]=3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L ⁻¹)....	73
Tabela 4.3	Balanco mássico da reação de reticulação com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl]=3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L ⁻¹)....	73
Tabela 4.4	Rendimentos das reações de reticulação realizadas com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH]=3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L ⁻¹).....	74
Tabela 4.5	Teores de proteínas dos géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl]=3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L ⁻¹)....	76
Tabela 4.6	Efeito das razões mássicas AH/DVS no intumescimento dos géis ([AH] e [NaCl]= 3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L ⁻¹).....	77
Tabela 4.7	Informações de DSC de géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS após secagem a 25°C.....	79
Tabela 4.8	Conteúdo de água dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de DVS.....	82
Tabela 4.9	Constantes da “Lei de Potência” para a relação entre o módulo de estocagem e a frequência para géis reticulados de AH ($G' = A \omega^B$).....	85
Tabela 4.10	Valores de $\tan \delta$ (in 4,6 Hz) para os géis de AH preparados nesta etapa do trabalho (Concentração de AH e NaCl na solução de partida	

	3% (g/100g), concentração de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ , 25°C, 4 horas).....	86
Tabela 4.11	Parâmetros determinados nas curvas de fluxo dos géis de AH reticulados com DVS.....	89
Tabela 4.12	Graus de modificação “teóricos” e “reais” dos géis de AH preparados com diferentes razões mássicas AH/DVS.....	92
Tabela 4.13	Propriedades físico-químicas de géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (0,05, 0,1, 0,2, 0,5 e 1 mol.L ⁻¹).....	94
Tabela 4.14	Efeito da concentração de NaOH no intumescimento dos géis.....	95
Tabela 4.15	Informações de DSC de géis de AH preparados com diferentes concentrações de NaOH, após secagem a 25°C.....	97
Tabela 4.16	Conteúdo de água dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1).....	98
Tabela 4.17	Constantes da “Lei de Potência” para a relação entre o módulo de estocagem e a frequência para géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1) ($G' = A \omega^B$).....	101
Tabela 4.18	Valores de tan δ (in 4,6 Hz) para os géis de AH preparados com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1).....	102
Tabela 4.19	Parâmetros determinados nas curvas de fluxo dos géis de AH reticulados com DVS (AH/DVS 1:1).....	103
Tabela 4.20	Parâmetros determinados nas curvas de fluxo das misturas gel/fluido. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L ⁻¹ , D=75-100 μ m.....	106
Tabela 4.21	Resultados dos testes de plaqueamento para bactérias e bolores e leveduras.....	118
Tabela 4.22	Valores de tan δ (in 4,6 Hz) do gel <i>Controle</i> e do Synvisc®.....	122
Tabela 4.23	Parâmetros da “Lei de Potência” para a relação entre o módulo de estocagem e a frequência para géis reticulados de AH ($G' = A \omega^B$).....	122
Tabela 4.24	Parâmetros determinados nas curvas de fluxo das misturas gel/fluido 75:25 (gel de AH preparado com AH 10 ⁵ Da na concentração de 3g/100g, [NaCl]=3 g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L ⁻¹ , diâmetro médio de partícula= 75-100 μ m e razão mássica AH/DVS 1:1 e fluido preparado	

	a partir de AH 10^5 Da na concentração de 1g/100g em PBS).....	124
Tabela 4.25	Concentrações de AH e DPPE no conjugado e rendimento da reação de conjugação.....	126
Tabela 4.26	Características físico-químicas de estruturas lipídicas preparadas com Lipoid E-80/DPPE 80:20 e Lipoid E-80/DPPE/AH-DPPE.....	131

Nomenclatura

AH.....	Ácido Hialurônico
AT.....	Azul de Toluidina
ATCC.....	<i>American Type Culture Collection</i>
BDDE.....	1,4-butanodiol diglicidil éter
BCA.....	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BSA.....	Albumina de soro bovino
CBMAI.....	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CCD.....	Cromatografia em Camada Delgada
CMC.....	Carboximetilcelulose
CNBr.....	Brometo de cianogênio
CNT.....	Controle Negativo de Toxicidade
CPT.....	Controle Positivo de Toxicidade
Da.....	Daltons
DEO.....	1,2,7,8-diepoxi octano
DMF.....	Dimetilformamida
DLS.....	<i>Dynamic light scattering</i>
DNA.....	Ácido Desoxiribonucleico
DOPE.....	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOTAP.....	cloreto de 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
DOX.....	Doxirrubicina
DPPE.....	Dipalmitoil fosfatidil etanolamina
DSC.....	Calorimetria exploratória diferencial
DVS.....	Divinilsulfona
ECM.....	Matriz Extracelular
EDCA.....	1-etil-3-[3-dimetil aminopropil]carbodiimida
<i>fc</i>	Frequência cruzada
FDA.....	<i>Food and Drug Administration</i>
FS.....	Fluido Sinovial
FT-IR.....	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
G*.....	Módulo Complexo
G'.....	Módulo de Rigidez (componente elástico)

Nomenclatura

G''	Módulo de Dissipação (componente viscoso)
G ^{1/2}	Gauge
GlcNAc	N-acetilglicosamina
GlcUA	Ácido D-glicurônico
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatograph</i>
Hz	Hertz
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LDPB	Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos
MM	Massa molar média
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium
NaAH	Hialuronato de Sódio
NaBH ₃ CN	Cianoborohidreto de Sódio
NASHA [®]	AH não-animal Estabilizado
NSAIDs	Drogas Anti-inflamatórias não Estereoidais
OA	Osteoartrite
OVA	Ovoalbumina
Pa	Pascal
PBS	Tampão de fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
PLL	poli(L-lisina)
R _f	Fator de Retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
SBF	Soro bovino fetal

Nomenclatura

SEC.....	Cromatografia de Exclusão por Tamanho
SI.....	Sistema Internacional
UFC.....	Unidades formadoras de colônia
XP.....	<i>Xylidine Ponceau</i>
γ	Taxa de cisalhamento
γ_c	Taxa de cisalhamento crítica
δ	Ângulo de Fase
η	Viscosidade
η^*	Viscosidade Complexa
η_0	“zero shear viscosity”
τ	Tensão de Cisalhamento
ω	Frequência de oscilação

INTRODUÇÃO

Os avanços na ciência de polímeros e tecnologias correlatas têm promovido o desenvolvimento de diversos biomateriais para as áreas médica e cosmética. Nessas áreas, o ácido hialurônico (AH) possui um vasto campo de aplicação devido a suas características físico-químicas e biológicas, quando utilizado *in natura*, conjugado a outras moléculas, na forma de hidrogéis reticulados, ou de micro- e nano-cápsulas.

O AH é um polissacarídeo natural linear composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc), unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. Foi isolado pela primeira vez em 1934 por Meyer e Palmer do vítreo de olhos bovinos (Ruhela *et al.*, 2006, Meyer & Palmer, 1934).

O AH é encontrado naturalmente nos tecidos conjuntivos de mamíferos, e pode ser extraído da pele, tendões, do vítreo dos olhos, do fluido sinovial e do cordão umbilical, existindo nestes dois últimos tecidos em altas concentrações. Em animais inferiores o AH é encontrado na crista de galo (Kuo *et al.*, 2000). Apesar do AH de fonte animal ser utilizado para produção da maior parte dos produtos comerciais, sua associação com antígenos de origem animal limita as aplicações destes produtos principalmente na área médica. Sendo assim, a produção deste polímero por processos fermentativos com microrganismos do gênero *Streptococcus* vem sendo utilizada como alternativa aos processos convencionais de extração de fontes animais.

As funções e aplicações do AH estão associadas basicamente às suas características estruturais, e às possíveis modificações químicas do polímero, as quais determinam suas propriedades reológicas, de solubilidade, de hidratação e de reconhecimento celular específico. Além disso, o AH é não-imunogênico, biocompatível e biodegradável, e por isso possui diversas aplicações como biomateriais.

As modificações químicas do AH têm se tornado essenciais na preparação de diferentes produtos para aplicações específicas. Os derivados resultantes dessas modificações normalmente têm propriedades mecânicas e físico-químicas que podem diferir significativamente do polímero original, porém a maioria destes derivados retém a biodegradabilidade, a biocompatibilidade e, em alguns casos, as propriedades farmacológicas do AH natural.

O AH pode ser modificado no grupo carboxílico, hidroxílico, acetamida e no terminal reduzido do polímero através de reações de esterificação, eterificação, reações mediadas por carbodiimidas, acilação, acoplamento com isouréia, oxidação com periodato, sulfatação, aminação redutiva, entre outras. Além disso, estas reações podem modificar o AH por reticulação e/ou por adição de compostos na cadeia polimérica, proporcionando assim, uma infinidade de produtos com características estruturais específicas (Garg & Hales, 2004).

Atualmente, os biomateriais baseados em ácido hialurônico, possuem diversas aplicações principalmente nas áreas médico-farmacêutica e cosmética, podendo estas aplicações serem divididas em quatro grandes grupos:

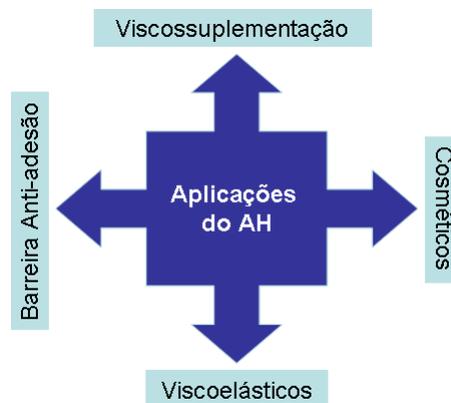


Figura 1.1. Aplicações do ácido hialurônico nas áreas médico-farmacêutica e cosmética.

A viscosuplementação trata principalmente das aplicações do AH em ortopedia, na reposição do fluido sinovial e preenchimento de articulações, visando principalmente o alívio de dores causadas pela osteoartrite dos joelhos (Balazs & Denlinger, 1993). No segmento de viscoelásticos as aplicações estão direcionadas para a oftalmologia, em cirurgia de cataratas, reposição de lentes intra-oculares e na reposição do humor vítreo dos olhos (Balazs, 1983).

As aplicações na área cosmética utilizam a alta capacidade de absorção de água do AH,

para a elaboração de hidratantes e de produtos para rejuvenescimento da pele (Lowe *et al.*, 2001). No segmento de barreira anti-adesão ou viscosseparação, o AH na forma de membranas ou de hidrogéis é usado principalmente em cirurgias abdominais e pélvicas, (Holmström & Ricici, 1967).

Além destas aplicações, nos últimos anos o AH também vem sendo utilizado como sistema para encapsulação e liberação controlada de fármacos, cosméticos e agentes quimioterápicos, e na engenharia de tecidos como *scaffolds* para o crescimento e diferenciação celular (Kim *et al.*, 2005, Ohri *et al.*, 2004).

Neste trabalho foram estudadas as reações de modificação química do ácido hialurônico (AH) com divinilsulfona (DVS) para preparação de géis reticulados e com carbodiimidias para preparação de fosfolipídios derivatizados. A modificação com DVS envolve os grupos hidroxílicos do AH, enquanto que a modificação mediada por carbodiimida envolve os grupos carboxílicos do AH e o grupo amina do fosfolipídio.

A relevância da obtenção de géis reticulados de AH está nas aplicações em estética facial, em cosméticos e nas aplicações médicas que exigem viscossuplementação. Já a derivatização com fosfolipídios representa uma alternativa ao polietilenoglicol (PEG) ou outros polímeros hidrofílicos, na modificação da superfície de lipossomas ou de partículas lipídicas sólidas. Em ambos os casos, as modificações químicas geram produtos de alto valor agregado, inexistentes no mercado brasileiro.

Até 2020, somente nos Estados Unidos, por exemplo, o número de pessoas acima de 65 anos deverá atingir aproximadamente 71 milhões. Pessoas nessa faixa etária entrarão em uma fase onde há maior incidência de osteoartrite, catarata e rugas faciais. Sendo assim, os biomateriais baseados em AH terão um papel importante e suas demandas deverão ser impulsionadas (Frost & Sullivan, 2004).

Atualmente, o mercado mundial de AH é estimado em 1 bilhão de dólares e de acordo com Frost e Sullivan (2004), o AH encontra na viscossuplementação a maior área em termos de vendas mundiais, e é esperado que cresça a uma taxa de 11,5% ao ano (Kogan *et al.*, 2007).

No Brasil, não existe produção comercial de AH e todos os produtos utilizados nas áreas médica e cosmética são importados. O *Synvisc*®, por exemplo, produzido pela empresa Genzyme Corporation, que apresenta expressividade no mercado de viscossuplementação, é comercializado

por R\$ 360,00 a caixa com 1 seringa de 2 mL. Sendo assim, devido ao alto custo destes produtos, o acesso por parte da população brasileira aos benefícios do AH nos vários segmentos torna-se muito limitado.

Já a derivatização de fosfatidiletanolaminas com gangliosídeos ou polietilenoglicol surgiu no final dos anos 80, devido à necessidade de preparação de lipossomas do tipo “*stealth*”, capazes de evadir o sistema imunológico, permanecer por tempo prolongado na corrente sanguínea e serem direcionados para sítios específicos e tumores sólidos (Lasic, 1993). Entretanto, trabalhos da literatura reportam efeitos adversos de lipossomas com polietilenoglicol, tais como estomatite e síndrome de pé e mão. Além disso, o PEG não é biodegradável e apresenta limitadas possibilidades de funcionalização química. Neste contexto, a derivatização do fosfolípido com AH não só permite a modificação da superfície dos lipossomas tornando-os mais estáveis na corrente sanguínea, como também permite o seu direcionamento específico para células de tumores que expressam os receptores CD44.

1.1. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo estudar as reações químicas de modificação do ácido hialurônico, com divinilsulfona para produzir géis reticulados para aplicações em viscosuplementação e com carbodiimidias para produzir fosfolipídios derivatizados utilizados na modificação da superfície de partículas lipídicas coloidais.

Para atingir o objetivo mencionado, os seguintes aspectos foram abordados:

Produção de géis de AH reticulados com divinilsulfona

1. Influência dos parâmetros da reação de reticulação (razão mássica AH/DVS, alcalinidade do meio) nas propriedades estruturais e reológicas dos géis;
2. Correlação do grau de modificação dos géis com sua capacidade de intumescimento, dureza, propriedades químicas e reológicas (viscosidade e viscoelasticidade);
3. Obtenção de partículas de gel através da aplicação de alto cisalhamento ao gel plano. Modulação do diâmetro médio de partículas em função da intensidade e do tempo de cisalhamento;
4. Avaliação do efeito da esterilização nas propriedades estruturais e reológicas dos géis;
5. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* visando aplicações médicas como viscosuplementos.

Produção de derivados AH-fosfolipídio

1. Preparação do derivado AH-DPPE (dipalmitoil fosfatidil etanolamina) através de reação mediada por carbodiimida no grupo carboxílico do AH;
2. Influência da massa molar do polímero na reação de conjugação;
3. Avaliação da etapa de separação dos produtos conjugados por ultrafiltração;
4. Avaliação da capacidade de incorporação do conjugado em bicamada lipídica através da preparação de lipossomas.

REVISÃO

BIBLIOGRÁFICA

2.1. ÁCIDO HIALURÔNICO

2.1.1. BREVE HISTÓRICO E TERMINOLOGIA

O ácido hialurônico (AH) é um mucopolissacarídeo ácido presente nos tecidos conjuntivos de animais, isolado em 1934 por Meyer e Palmer do vítreo de olhos bovinos (Meyer & Palmer, 1934). Contudo, sua estrutura química precisa só foi determinada em 1954, por Weissman e Meyer, através de métodos químicos e enzimáticos (Weissman & Meyer, 1954, Brown & Jones, 2005, Laurent & Fraser, 1992).

Nos 20 anos entre a descoberta e a determinação completa de sua estrutura química, o ácido hialurônico foi isolado de muitos outros tecidos, incluindo fluido sinovial, crista de galo e cordão umbilical. Entretanto, a extração do AH desses tecidos apresentava várias dificuldades, entre elas a retenção de proteínas. Entre os anos de 1960 e 1970, o estabelecimento do mecanismo de biossíntese do AH e a clonagem da enzima *AH sintase*, que mostrou que ele pode ser preparado sem a presença de qualquer proteína base, solucionaram as interações específicas do AH com as proteínas.

Entre os anos de 1950 e 1960, os pesquisadores Sandy Ogston, Torvard Laurent, Endre Balazs e por último Bob Cleland estabeleceram o comportamento não-Newtoniano ou não-ideal

do AH em soluções diluídas (Hardingham, 2004).

O ácido hialurônico também é conhecido como hialuronato de sódio, hialuronan ou como *Natrii hyaluronas*. A Tabela 2.1 apresenta as quatro nomenclaturas do AH, e suas aplicações na literatura científica (Romagnoli & Belmontesi, 2008).

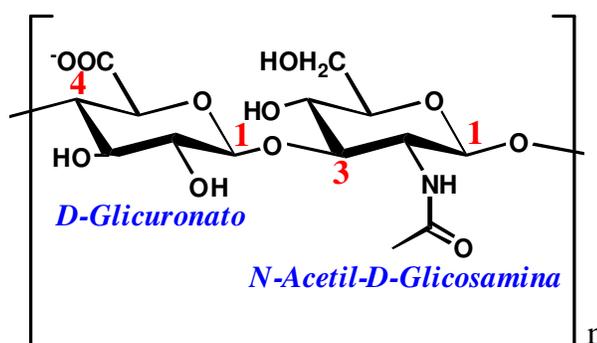
Tabela 2.1. Nomenclaturas científicas do AH (Adaptada de Romagnoli & Belmontesi, 2008).

Nomenclatura	Comentário e campo de aplicação	Uso (%)
Ácido Hialurônico	Meyer e Palmer, 1934 - medicina	60
Hialuronato de sódio	Sal em pH neutro - farmacêutico	10
Hyaluronan	Balazs <i>et al.</i> - científico	30
Natrii hyaluronas	Termo em Latin - Farmacopéia	Único

Neste trabalho será utilizado o termo ácido hialurônico (AH).

2.1.2. ESTRUTURA QUÍMICA

O AH é um biopolímero viscoelástico linear composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc), unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4 (Figura 2.1) (Kuo *et al.*, 2000). O dissacarídeo representa a estrutura primária do AH.



n = número de repetições de unidades dissacarídicas

Figura 2.1. Estrutura primária do AH: unidades repetidas dissacarídicas do ácido hialurônico.

Embora a estrutura química do AH seja invariável e independente da fonte de obtenção, seu comprimento e sua massa molar dependem do número de unidades de dissacarídeos presentes

na cadeia (Hascall & Laurent, 1997).

Segundo Lapčák e colaboradores (1998), a massa molar do AH varia entre 10^4 e 10^7 Da e depende da fonte de obtenção e dos procedimentos de extração e purificação utilizados (Lapčák *et al.*, 1998). O AH presente em tecidos saudáveis apresenta massa molar média entre 5 e 10 milhões de Daltons a qual frequentemente decresce em pacientes com doenças articulares tais como a osteoartrite (OA) (Romagnoli & Belmontesi, 2008).

Além da estrutura primária, o AH apresenta estruturas secundárias e terciárias. A estrutura secundária do AH envolve as ligações de H intra- e intermoleculares formadas em solução aquosa. Estas ligações de H são formadas pelos grupos acetamida, carboxilato e hidroxílico da molécula e por moléculas de água do solvente (Figura 2.2).

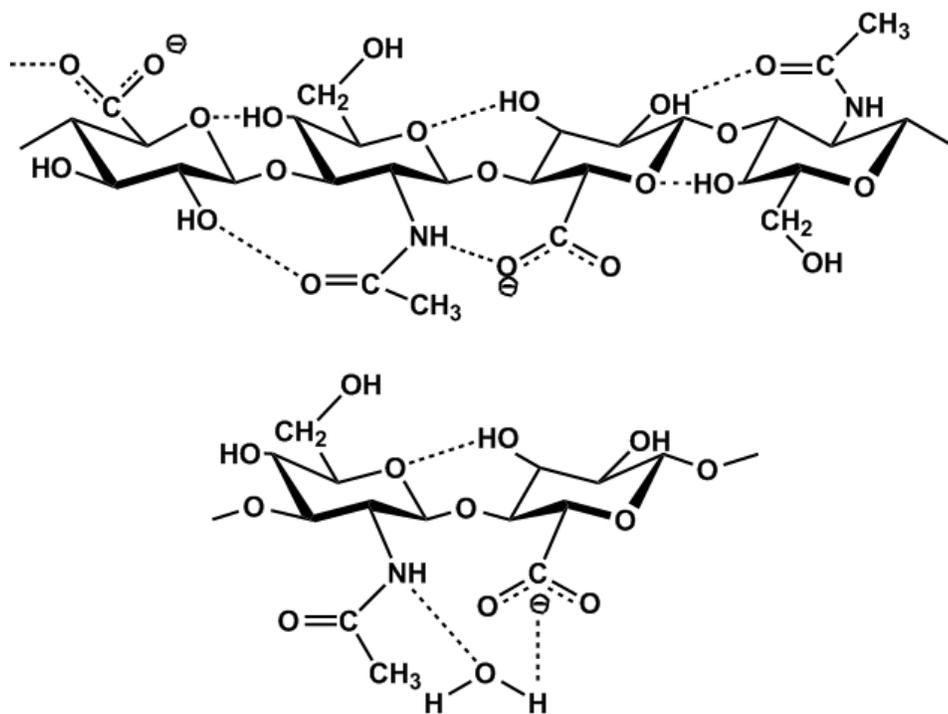


Figura 2.2. Estrutura secundária do AH (Adaptado de Almond *et al.*, 1998).

A estrutura tridimensional do AH, que representa sua estrutura terciária, é formada por duas cadeias antiparalelas que se enovelam formando uma estrutura de fita torcida (Figura 2.3),

estabilizada através de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Brown & Jones, 2005, Hascall & Laurent, 1997).

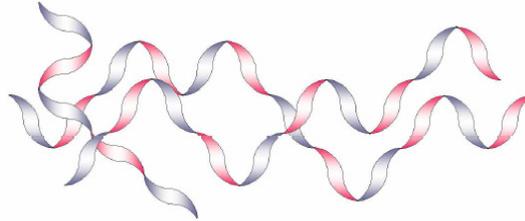


Figura 2.3. Estrutura terciária do AH: Estrutura de fita torcida da molécula de AH em solução, com faces hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (vermelhas) (Macedo, 2006, adaptado de Hascall & Laurent, 1997).

No AH, ambos os açúcares presentes (Figura 2.4(B)) estão relacionados espacialmente com a glicose (Figura 2.4(A)) explicando assim, a alta estabilidade energética da estrutura. Na glicose, assim como no AH, a configuração *beta* permite que todos os grupos hidroxílicos e carboxílicos presentes, e também os carbonos anoméricos do açúcar adjacente, estejam em posições equatoriais estericamente estáveis; e que todos os pequenos átomos de hidrogênio da cadeia ocupem as posições axiais estericamente menos favoráveis (Hascall & Laurent, 1997).

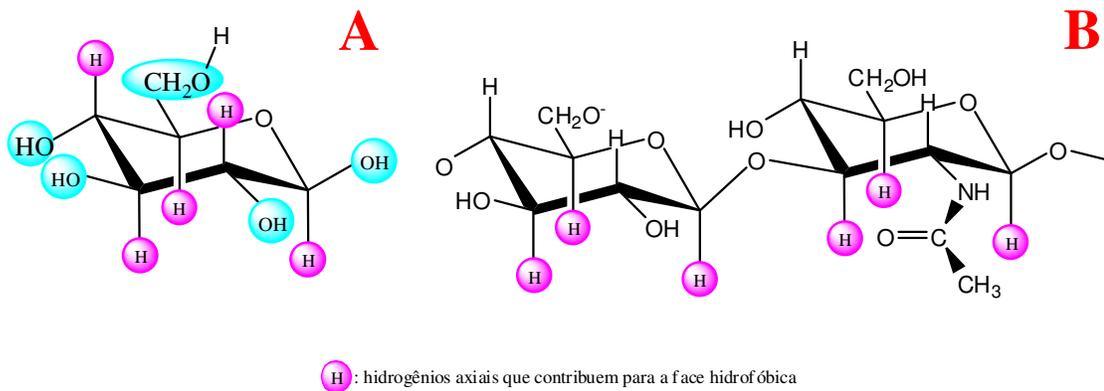


Figura 2.4 - Relação entre a estrutura da beta D-glicose (A) e a estrutura dissacarídica do AH (B) (Adaptado de Hascall & Laurent, 1997).

Em solução fisiológica, o esqueleto da molécula de AH é reforçado por uma combinação da estrutura química do dissacarídeo (estrutura primária), das ligações internas de hidrogênio e de interações com o solvente (estrutura secundária). Os átomos axiais de hidrogênio formam uma

face relativamente hidrofóbica, não polar, enquanto que o lado equatorial da cadeia forma uma face hidrofílica mais polar, criando assim uma estrutura de fita enovelada (estrutura terciária) expandida aleatoriamente que ocupa um grande domínio hidrodinâmico (Hascall & Laurent, 1997).

O AH é um polímero altamente hidrofílico com um grupo carboxílico por unidade de ácido glicurônico, o que lhe confere caráter polianiônico em pH fisiológico (pH 7). *In vivo*, todos os grupos carboxílicos do ácido D-glicurônico e da N-acetilglicosamina estão completamente ionizados, tornando a molécula de AH altamente polar e, conseqüentemente, altamente solúvel em água. Na presença de água, as cadeias de AH podem expandir em volume até 1000 vezes e formar matrizes imensamente hidratadas. (Romagnoli & Belmontesi, 2008, Laurent & Fraser, 1992).

Soluções de AH tem pronunciadas propriedades viscoelásticas e seu comportamento não-ideal tem sido fonte de muito interesse e especulação. Em solução aquosa, o comportamento do AH passa de Newtoniano para não-Newtoniano com o aumento da massa molar, da concentração ou da taxa de cisalhamento. Além disso, os aumentos de massa molar e de concentração de AH aumentam a viscoelasticidade da solução. Esta, por sua vez, é dependente do pH e é afetada pela força iônica do meio. O pKa dos grupos carboxílicos dos resíduos de ácido D-glicurônico encontra-se entre 3 e 4, dependendo das condições iônicas. Variações no pH afetam a extensão da ionização da cadeia de AH e essas variações conseqüentemente alteram as interações inter- e intramoleculares e conseqüentemente suas propriedades reológicas (Brown & Jones, 2005).

De acordo com Gatej e colaboradores (2005), o comportamento das soluções de ácido hialurônico em diferentes valores de pH apresenta ligeira degradação na massa molar média em condições ácidas (abaixo de pH 1,6) e em meio básico (pH 12,6), entretanto, o comportamento reológico não é consideravelmente influenciado. Em pH = 2,5, entretanto, um comportamento de gel é observado e pode ser atribuído as interações cooperativas intercadeias devido à redução das cargas do polímero e protonação dos grupos acetamida. Em pH alcalino (pH>12), a diminuição da viscosidade é atribuída principalmente a uma redução da rigidez da cadeia do polímero devido à quebra parcial da rede de ligações de H (Gatej *et al.*, 2005).

2.1.3. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS

Devido a suas propriedades físicas, o AH tem funções no preenchimento de espaços, na lubrificação, na absorção de choque e na exclusão de proteínas. Além disso, suas propriedades bioquímicas incluem a modulação da inflamação das células, a interação com os proteoglicanos da matriz extracelular e a captura de radicais livres (Monheit & Coleman, 2006).

Na pele, além do AH servir como matriz para as células, ele desempenha outras importantes funções. O AH pode imobilizar água no tecido e assim, alterar o volume dérmico e sua compressibilidade, pode influenciar a proliferação e a diferenciação celular e atuar no reparo dos tecidos.

No fluido sinovial, a alta concentração de AH fornece a lubrificação necessária para as articulações e atua como amortecedor, reduzindo a fricção dos ossos durante o movimento e diminuindo assim, o desgaste das articulações.

Estudos também mostraram que o AH ligado a proteínas e a receptores específicos desempenha importante papel na embriogênese, na transdução de sinais, na motilidade celular e está ainda associado ao câncer e a metástase (Kogan *et al.*, 2007).

2.1.4. FONTES DE ÁCIDO HIALURÔNICO

O AH é encontrado naturalmente nos tecidos conjuntivos de mamíferos e pode ser extraído do fluido sinovial, dos tendões, do humor vítreo dos olhos e do cordão umbilical. Atualmente, a principal fonte comercial de ácido hialurônico de origem animal é a crista de galo que apresenta em torno de 7500 µg/mL.

No corpo humano, a concentração média de AH é de 200 mg/kg e estima-se que um terço da quantidade total de AH do corpo esteja na pele, tanto na derme quanto epiderme (Romagnoli & Belmontesi, 2008, Brown & Jones, 2005).

Como a associação do AH de origem animal a antígenos limita as suas aplicações na área médica, a produção deste polímero por processos fermentativos com microrganismos do gênero

Streptococcus vem sendo estudada e proposta como opção aos processos convencionais de extração (Pires, 2009).

Embora os tecidos animais, tais como os de crista de galo, ainda sejam utilizados na produção de materiais empregados clinicamente, e sejam aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*); várias toneladas/ano de AH excretado por microorganismos de certas linhagens atenuadas (*Streptococcus zooepidemicus*, *S. equi*, etc.) são comercializados por diversas companhias. Os produtos de AH obtidos por fermentação bacteriana encontram demanda devido principalmente a sua massa molar (vários MDa). Entretanto, o risco de mutação da linhagem bacteriana e a possibilidade de co-produção de várias toxinas, de pirogênicos e de imunogênicos, dificultam uma aplicação mais ampla do AH obtido desta fonte na área médica. Esta é também a razão pela qual, as amostras de AH originadas de cristas de galo ainda são frequentemente preferidas nos tratamentos de humanos, principalmente em casos em que o produto de AH é aplicado por meio de injeções, isto é, nos olhos e nas articulações. Mesmo assim, esta ainda não é a fonte ideal de AH para aplicação médica uma vez que os produtos obtidos de crista de galo podem ser alergênicos a pessoas que tenham alergia a produtos originados de aves (Kogan *et al.*, 2007).

Segundo Kogan e colaboradores (2007), uma fonte promissora de AH é a linhagem bacteriana geneticamente modificada, *Bacillus subtilis*, que é capaz de produzir AH de massa molecular em torno de 10^5 Da. Além disso, esta linhagem tem a vantagem de ser facilmente cultivável em larga escala e de não produzir exo- e endotoxinas. Vários produtos manufaturados deste microorganismo já receberam a designação de segurança GRAS (*generally recognized as safe*). Outra vantagem é que estes microorganismos não produzem *hialuronidase* a qual pode degradar o AH sintetizado (Kogan *et al.*, 2007).

2.2. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DO AH

Uma variedade de modificações químicas do AH natural tem sido verificada visando melhorar suas propriedades mecânicas e químicas; e principalmente aumentar seu tempo de residência nos tecidos. Como o AH nativo apresenta um tempo de residência de apenas 1 a 2 dias e a maioria das aplicações médicas desse biopolímero requer um tempo de residência maior,

modificações químicas do AH tem se tornados essenciais na preparação de produtos para aplicações médicas e cosméticas (Monheit & Coleman, 2006, Romagnoli & Belmontesi, 2008).

A molécula de AH apresenta quatro grupos funcionais que podem ser modificados quimicamente: *carboxílico*, *hidroxílico*, *acetamida* e o *terminal reduzido* do polímero. Além disso, as ligações glicosídicas também podem ser hidrolisadas para formar cadeias menores ou oligossacarídeos, conforme apresentado na Figura 2.5.

Embora as modificações nos *terminais reduzidos* do polímero e nos grupos *acetamida* tenham sido realizadas, grande parte dos estudos de modificação está focada nos grupos *carboxílico* e *hidroxílicos*. A pequena quantidade de exemplos preparados a partir do grupo *acetamida* resulta da baixa reatividade deste grupo funcional.

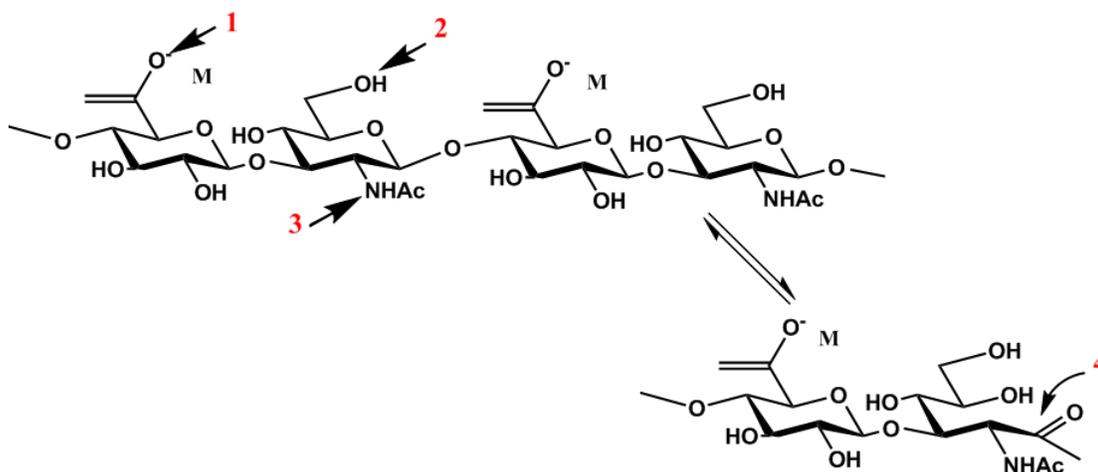


Figura 2.5. Grupos de Modificação Química: (1) *carboxílico*, (2) *hidroxílico*, (3) *acetamida*, (4) *Terminal Reduzido do Polímero* (Adaptado de Garg & Hales, 2004).

Duas estratégias têm sido empregadas para a modificação das propriedades físico-químicas do AH: reticulação e/ou adição de compostos na cadeia polimérica (adição de grupos pendentes).

A reticulação é a estratégia mais usada e modifica as propriedades físicas pelo aumento do tamanho das moléculas ou pela formação de uma rede reticulada das cadeias de AH que se intumescem em água sem solubilizar.

Vários métodos diferentes têm sido usados para reticular o AH e pelo controle da extensão da reticulação, tipo de ligação covalente e grupo funcional envolvido é possível criar uma grande quantidade de diferentes materiais (Band, 1998).

Já a adição de grupos pendentes ao AH modifica suas propriedades pela conjugação de cadeias hidrofílicas, por redução do caráter polianiónico ou pela modificação da agregação das cadeias (Band, 1998).

Além disso, após modificação ou reticulação, o AH pode ser conjugado a diferentes moléculas tais como proteínas (Hahn *et al.*, 2006), lipídios, ácidos graxos, fosfolipídios (Schnitzer *et al.*, 2000) e outros polímeros (Mason *et al.*, 2000) gerando estruturas que ampliam a gama de aplicação deste biopolímero, particularmente na área médica.

As reações de modificações químicas do AH serão discutidas brevemente a seguir dando ênfase as reações que foram utilizadas nesse trabalho.

2.2.1. MODIFICAÇÃO DO GRUPO CARBOXÍLICO

As modificações do grupo *carboxílico* do AH podem ser realizadas através de reações de *Esterificação* (Campodoccia *et al.*, 1998) ou por *Reações mediadas por carbodiimidas* (Kuo *et al.*, 1991).

2.2.1.1. ESTERIFICAÇÃO

Para criar formas mais hidrofóbicas do AH, com maior rigidez e menor susceptibilidade a degradação enzimática, pesquisadores têm esterificado o grupo *carboxílico* do AH. A modificação é realizada através da *alquilação* do AH com um haleto de alquila e posterior *esterificação* com alcoóis (Leach & Schmidt, 2004).

Uma série de alcoóis pode ser usada na *esterificação* e, portanto, uma variedade de polímeros pode ser gerada com a variação dos grupamentos ésteres introduzidos, ou pela porcentagem de grupos *carboxílicos* esterificados.

Altas porcentagens de esterificação resultam em materiais insolúveis em água, chamados

HYAFF® (Fidia Advanced Biopolymers), que podem ser extrudados para produzir membranas e fibras; liofilizados para produzir esponjas; ou tratados em “*spray-drying*”, extração e evaporação para produzir microesferas (Campodoccia *et al.*, 1998). Os grupamentos ácidos do AH podem também ser convertidos em ésteres ativados afim de posterior acoplamento com marcadores fluorescentes, conjugação droga-polímero e preparação de hidrogéis reticulados (Garg & Hales, 2004).

2.2.1.2. REAÇÕES MEDIADAS POR CARBODIIMIDA

As reações mediadas por carbodiimidas são bastante versáteis, pois permitem o acoplamento de drogas terapêuticas, de grupos marcadores, de agentes reticulantes e de outros grupos bioativos ao AH. Ela acontece através do acoplamento controlado de hidrazidas ou de outros grupos amina aos grupos *carboxílicos* de um número pré-definido de ácidos glicurônicos do polímero de AH, mediado por carbodiimidas (Prestwich *et al.*, 1998).

Tentativas para conjugar drogas a polímeros solúveis em água têm sido geralmente realizadas com o intuito de melhorar seu tempo de residência no sangue, sua estabilidade e solubilidade, e de reduzir a antigenicidade de drogas de baixa massa molar e de drogas conjugadas a peptídeos ou a proteínas. Particularmente, PEG tem sido largamente utilizado devido a suas propriedades inertes e também porque ele é capaz de prevenir a adsorção de proteínas a uma droga *in vivo*. Porém, o PEG não é biodegradável, e quando conjugado a proteínas permanece acumulado no corpo após um longo tempo de administração. Além disso, pesquisadores reportaram que o acúmulo de PEG no corpo, principalmente nas extremidades dos dedos, é anormalmente acelerado em *lipossomas-PEG*. Sendo assim, outra promissora aplicação do AH é a sua derivatização com fosfolipídios em substituição ao PEG, para gerar lipossomas furtivos (Yasugi *et al.*, 2007).

Para isso, diversos autores têm utilizado a ativação do AH com carbodiimidas e posterior conjugação a diferentes fosfolipídios.

Yerushalmi e Margalit (1998) modificaram lipossomas através de ativação de AH com carbodiimidas visando melhorar as propriedades bioadesivas e/ou de biodeteção. Para isso, AH foi pré-ativado por incubação com carbodiimida em pH 4,0 e adicionado a uma suspensão de

lipossomas multilamelares de *phosphatidylcholine* (PC), *phosphatidylethanolamine* (PE) e colesterol (Yerushalmi & Margalit, 1998).

De acordo com Surance e colaboradores (2009), AH pode ser pré-ativado com 1-etil-3-[3-dimetil aminopropil]carbodiimida (EDCA) e adicionado ao fosfolípido *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine* (DOPE) para produzir o conjugado AH-DOPE, o qual pode ser introduzido durante o passo de hidratação de filmes lipídicos no procedimento de preparação de lipossomas. Os lipossomas formados com este conjugado de AH podem ser complexados com o plasmídeo DNA pCMV-luc sem modificação da citotoxicidade. Estes autores concluíram que os lipossomas catiônicos contendo o conjugado AH-DOPE promovem boa transfecção das linhagens das células estudadas na expressão de CD44 (Surance *et al.*, 2009).

Taetz e colaboradores (2009) utilizaram o lipossoma catiônico composto de DOTAP (*1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane*)/DOPE modificado com o conjugado AH-DOPE para o carregamento de anti-telomerase siRNA a células cancerígenas do pulmão que expressam o receptor CD44. Eles observaram que a modificação não influencia a capacidade do lipossoma DOTAP/DOPE de se ligar eficientemente e de proteger o siRNA. Pelo contrário, a modificação aumenta a estabilidade no meio de cultura celular com elevada concentração salina, reduz a citotoxicidade e permite o direcionamento da expressão do CD44 de células pulmonares cancerígenas (Taetz *et al.*, 2009).

2.2.1.2.1. MECANISMO DE REAÇÃO DE CONJUGAÇÃO AH-DPPE

Carbodiimidas têm sido largamente usadas para ativação de grupos carboxílicos de glicosaminoglicanos. A ativação ocorre através da protonação dos nitrogênios da carbodiimida em meio ácido. Após a ativação, o ataque nucleofílico do ânion carboxilato ao carbono central gera um intermediário *O-acil-uréia* que pode ser capturado por nucleófilos ou pode se rearranjar no não-reativo *N-acil-uréia*. As modificações químicas da função carboxílica do AH pelas carbodiimidas são geralmente realizadas em água e em pH 4,75.

O conjugado AH-DPPE é preparado através da ligação amídica entre o grupo amina do fosfolípido e os resíduos carboxílicos do AH pré-ativados com EDAC.

Na primeira etapa da reação, o agente de condensação (EDAC) é adicionado à solução aquosa de ácido hialurônico em pH 4, uma vez que a carbodiimida só reage com os grupos carboxílicos do AH para dar o intermediário *O*-*acil*-*uréia* em pH ácido. Então o fosfolípídio (DPPE) é introduzido na mistura, e o pH ajustado para 8,6, pois a reação entre o grupo amino do DPPE (nucleófilo) e o resíduo carboxílico ativado do AH (*intermediário O*-*acil*-*uréia*) é favorecida em meio alcalino; gerando assim o conjugado AH-DPPE.

A Figura 2.6 apresenta o mecanismo da reação utilizada neste trabalho para a preparação do derivado AH-DPPE:

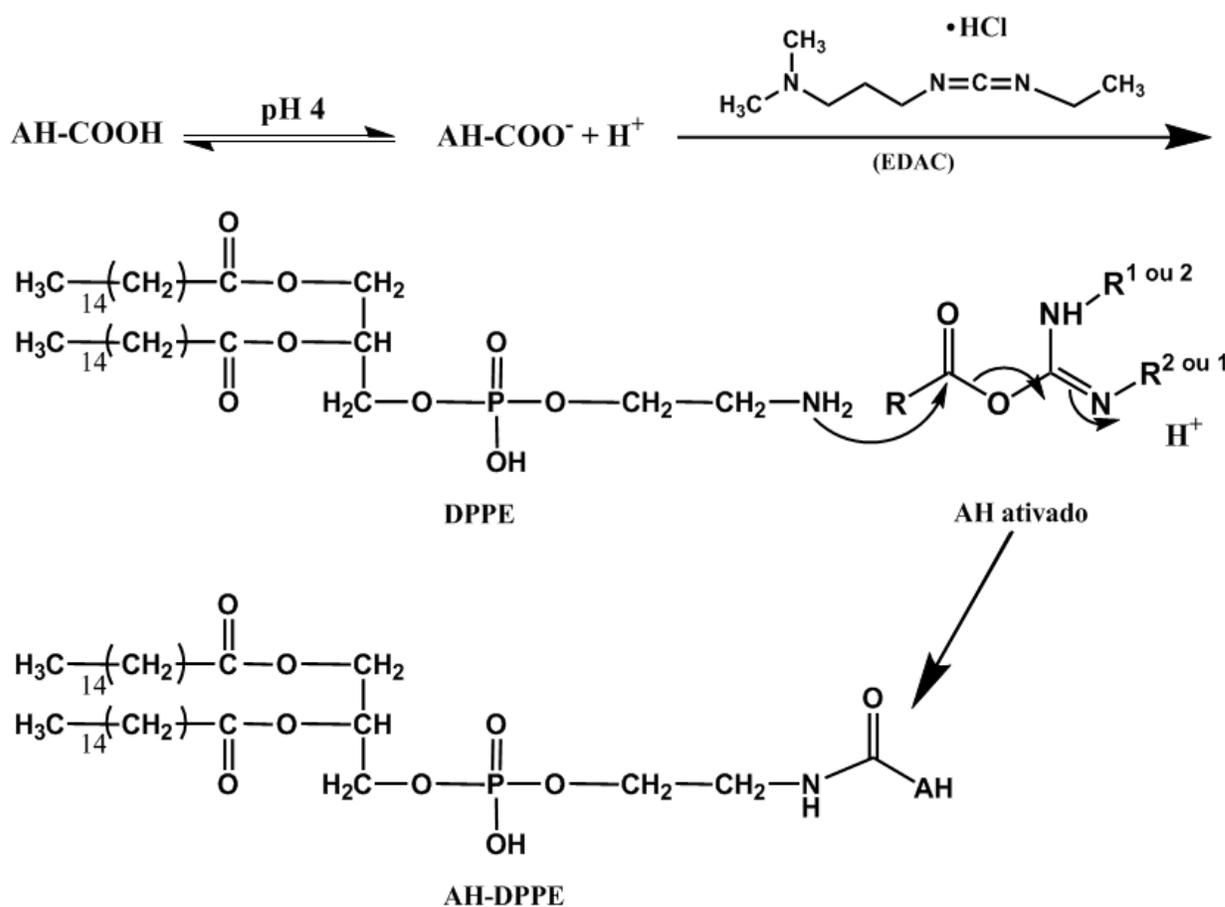


Figura 2.6. Mecanismo da reação entre AH e fosfolípídio (DPPE) mediada por carbodiimida (EDAC) (Adaptado de Kuo *et al.*, 1991).

2.2.2. MODIFICAÇÃO DO GRUPO HIDROXÍLICO

As modificações do grupo *hidroxílico* do AH podem ser realizadas através de reações de **Sulfatação** (Magnani *et al.*, 1996, Barbucci *et al.*, 1998); através de reações de **Esterificação** (Coradini *et al.*, 1999); por **Acoplamento com isouréia**; **Oxidação com Periodato**; ou através de reações de **Esterificação**.

2.2.2.1. SULFATAÇÃO

Pesquisadores têm modificado os grupos *hidroxílicos* do AH com grupos sulfato para criar moléculas compatíveis com o sangue e que mimetizem a heparina utilizada como anticoagulante (Leach & Schmidt, 2004).

A sulfatação do AH com complexos de trióxido de enxofre - piridina em DMF (dimetilformamida) produz HyalS_x com diferentes graus de sulfatação, onde x=1-4 por dissacarídeo. A introdução de grupos sulfato torna a macromolécula resistente à degradação por *hialuronidase* e *condroitinase*. Além disso, derivados HyalS_x apresentam baixa citotoxicidade e boa citocompatibilidade. Superfícies cobertas com HyalS_x mostraram redução da aderência celular e do crescimento bacteriano quando comparadas a superfícies não revestidas (Garg & Hales, 2004, Magnani *et al.*, 1996).

2.2.2.2. ESTERIFICAÇÃO

A potencialidade clínica do butirato de sódio, um composto natural conhecido por inibir a diferenciação celular e o crescimento de uma variedade de tumores, é prejudicada principalmente devido à dificuldade de se adquirir concentrações efetivas *in vivo*. O curto tempo de meia vida (aproximadamente 5 minutos) do butirato de sódio resulta do seu rápido metabolismo e excreção. Para aumentar a disponibilidade do butirato de sódio por um período de tempo maior, Coradini e colaboradores (1999) ligaram covalentemente ácido butírico ao AH. Ácido butírico foi acoplado ao AH via reações entre anidrido butírico e sal de *sym*-colidíneo de AH de baixa massa molar em DMF contendo dimetilamino-piridina.

Butirato de AH oferece um novo sistema de administração de drogas especificamente

direcionadas para células tumorais. A maior vantagem deste sistema como carreador de drogas consiste em sua alta biocompatibilidade e de sua habilidade em se ligar ao CD44, uma membrana receptora específica frequentemente expressada na superfície de células tumorais (Coradini *et al.*, 1999).

Hidrogéis fotopolimerizados também podem ser obtidos pela esterificação dos grupos *hidroxílicos* do AH com anidrido metacrilato (Smeds *et al.*, 1999).

2.2.2.3. ACOPLAMENTO COM ISOURÉIA

Antibióticos antraciclina e daunomicina são acoplados ao AH por ativação com brometo de cianogênio (CNBr). Esta reação é normalmente usada para ativar oligossacarídeos para produzir matrizes de afinidade via um intermediário isouréia altamente reativo. Entretanto, as condições severas da reação podem comprometer a integridade e a biocompatibilidade do AH (Garg & Hales, 2004).

2.2.2.4. OXIDAÇÃO COM PERIODATO

O grupo funcional reativo bis-aldeído pode ser gerado dos grupos *dióis* vicinais do AH por oxidação com periodato de sódio. Com o AH ativado com periodato, o acoplamento redutivo com aminas primárias podem resultar em reticulação, agregação de peptídeos contendo células ligadas em seu domínio, ou em materiais imobilizados.

2.2.2.5. ETERIFICAÇÃO

Grupos funcionais epóxi e vinil sulfona reagem com os grupos *hidroxílicos* do AH sob condições básicas para produzir ligações éter. Os processos convencionais usados para reticular o AH e preparar hidrogéis deste biopolímero normalmente utilizam 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) e divinilsulfona (DVS) como agentes reticulantes (Garg & Hales, 2004).

2.2.3. OUTRAS MODIFICAÇÕES

2.2.3.1. MODIFICAÇÃO DO TERMINAL REDUZIDO

O *terminal reduzido* do AH não tem sido muito usado para a obtenção de biomateriais uma vez que há somente um ponto de modificação por glicosaminoglicano. Isto limita severamente a reticulação e as propriedades de encapsulação do AH de alta massa molar.

Entretanto, segundo Asayama e colaboradores (1998), o terminal reduzido do AH de baixa massa molar e os grupos ϵ -amino da poli(L-lisina) (*PLL*) podem ser covalentemente ligados por aminaçãõ redutiva para obter o copolímero *PLL-AH*. Esse copolímero apresenta um sítio de ligação para DNA e, portanto, tem potencial como carreador de DNA (Asayama *et al.*, 1998).

Mochizuli e colaboradores (2006), conjugaram fragmentos de AH de 8 a 24 unidades dissacarídicas com ovoalbumina (OVA) por aminaçãõ redutiva entre o terminal reduzido do AH e o grupo amina da OVA usando cianoborohidreto do sódio (NaBH_3CN) como agente redutor (Mochizuki *et al.*, 2006).

O fosfolípido DPPE também foi conjugado ao AH por aminaçãõ redutiva utilizando NaBH_3CN para a preparação de lipossomas furtivos com doxirrubicina (DOX) encapsulada (Eliaz & Szoka Jr., 2001, Aoki *et al.*, 1999).

Entretanto, a toxicidade do agente redutor e as condições severas da reação podem comprometer a integridade e a biocompatibilidade do AH limitando sua aplicação.

2.2.3.2. MODIFICAÇÃO DA AMIDA

As modificações do grupo amida do AH são realizadas através de hidrazinólise dos grupos *N-acetil* do AH. Essas modificações geram glicosaminas livres que podem ser usadas para posteriores reações de acoplamento. Porém, estas reações são usualmente realizadas em altas temperaturas e em soluções básicas causando a degradação da massa molar do AH por clivagem do polímero (Garg & Hales, 2004).

Visando a preparação de novos biomateriais, Oerther e colaboradores (2000) investigaram a associação de alginato-AH a diferentes polímeros. Para isso, clivaram parcialmente a função acetamida do AH com hidrazina a altas temperaturas, gerando grupos amino livres para possíveis reações com os grupos carboxílicos das cadeias de alginato (Oerther *et al.*, 2000).

2.2.4. RETICULAÇÃO

Além das modificações do AH através da adição de moléculas em sua cadeia, o AH pode ser modificado através de reações de reticulação.

A reticulação pode ser realizada através da exposição direta do AH ao agente reticulante, ou através da reação de um derivado de AH altamente reativo primariamente sintetizado, com o agente reticulante em uma reação secundária. A maioria dos métodos reportados para reticular o AH emprega reagentes polifuncionais tais como bis-epóxidos, carbodiimidas, dihidrazidas e divinilsulfona (Band, 1998).

O processo de reticulação pode ser realizado usando um método heterogêneo, onde a reação ocorre no AH sólido na forma de filmes ou membranas; ou usando método homogêneo com soluções de AH. O primeiro método tem a vantagem de permitir a modelagem do produto antes da reticulação, entretanto o método homogêneo oferece a vantagem de um melhor controle da reação química proporcionando assim, produtos com maior homogeneidade (Collins & Birkinshaw, 2008).

A reticulação do AH fornece moléculas maiores e mais estáveis, com biocompatibilidade similar a do AH não modificado. O polímero pode ser reticulado através de ligações covalentes irreversíveis (reticulação química), ou através da formação de várias ligações iônicas reversíveis (reticulação física).

A reticulação química altera principalmente a solubilidade e as propriedades físicas e reológicas da molécula de AH gerando géis com alta capacidade de intumescimento. Os principais agentes reticulantes utilizados para a preparação de preenchedores dérmicos e de viscosuplementos de AH usados atualmente no mercado mundial são divinilsulfona e 1,4-butanodiol diglicidil éter. Ambos os reagentes de reticulação reagem com os grupos *hidroxílicos*

do AH para fornecer ligações éter quimicamente estáveis. Essas ligações aumentam significativamente o tempo de residência no sítio de inserção e os produtos formados são mais resistentes ao calor e a degradação enzimática quando comparados ao AH não modificado (Larsen *et al.*, 1993, Bergeret-Galley, 2004).

A Figura 2.7 apresenta as principais reações de reticulação do AH.

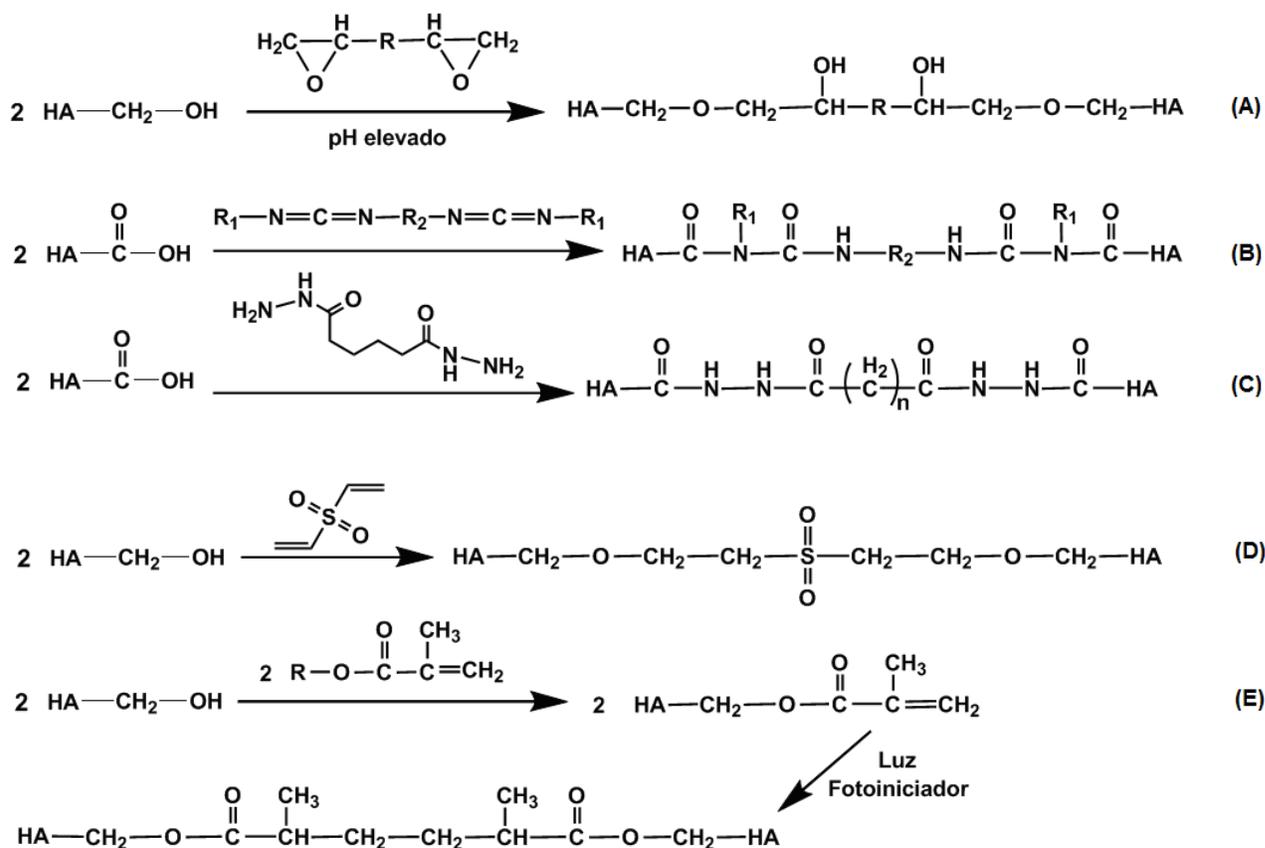


Figura 2.7. Reações de reticulação do AH (A) Com diepóxido, (B) Com biscarbodiimida, (C) Com dihidrazida mediada com carbodiimida (D) Com divinilsulfona, (E) Fotoreticulação de derivados metacrilados de AH (Leach & Schimdt, 2004).

2.2.4.1. HYLANS

Balazs e colaboradores (1987, 1989 e 1991), desenvolveram uma família de derivados reticulados de AH denominados *Hylans*. Os *Hylans* são divididos em dois grupos distintos: os derivados de AH solúveis em água (*Hylan A*) e os géis viscoelásticos de AH (*Hylan B*).

Para a preparação de *Hylan A*, formaldeído é usado em pH neutro para produzir uma ligação permanente entre o grupo hidroxílico do polissacarídeo e o grupo amino ou imino de uma proteína com tamanho molecular relativamente pequeno e afinidade específica com a cadeia de AH. Esta reação é normalmente realizada *in situ* através do tratamento de uma fonte rica em AH (geralmente crista de galo) com o aldeído. Sob condições apropriadas, o processo de reticulação gera uma rede molecular consistindo da associação permanente de duas a oito moléculas de AH. A massa molar média dos produtos obtidos varia entre 2 a 26×10^6 Da.

Hylan B é um derivado de AH reticulado com divinilsulfona. A reticulação através de pontes *bis(etil) sulfonil* produz um gel viscoelástico, insolúvel em água, altamente hidratado (95,5% de água), mas que pode sofrer digestão enzimática com *hyaluronidase*. De acordo com Balazs e Leschchiner (1986), divinilsulfona (DVS) reage prontamente com AH em solução alcalina aquosa a temperatura ambiente fornecendo o gel de AH reticulado. A razão de intumescimento depende do grau de reticulação do gel. E este, por sua vez, pode ser controlado por vários fatores incluindo massa molar do AH, sua concentração na mistura reacional, a concentração de álcali, a razão polímero/ DVS e a adição e concentração de sais neutros. A reação é muito rápida e na maioria dos casos, um gel forte pode ser obtido em alguns minutos. A razão de intumescimento dos géis produzidos com DVS pode variar entre 20 a 8000 e depende dos parâmetros de reação (Balazs & Leschchiner, 1986).

Além disso, dependendo dos parâmetros de reação utilizados na preparação do *Hylan B* é possível criar desde géis *soft* deformáveis até membranas sólidas e tubos, com elevados tempos de residência (Band, 1998).

Os dois processos de reticulação utilizados para a preparação dos *Hylans* retêm a biocompatibilidade e a funcionalidade do AH não modificado, porém os parâmetros físico-químicos tais como massa molar, tamanho molecular e propriedades reológicas são substancialmente afetados.

Embora o *Hylan A* permaneça solúvel em água assim como o AH nativo, sua viscoelasticidade é aumentada em aproximadamente uma ordem de magnitude na mesma concentração (Tabela 2.2). Já o *Hylan B* é altamente elástico na faixa de frequência entre 0,001 e

10 Hz, apresentando em torno de 10 vezes a elasticidade do *Hylan A* na mesma concentração (Band, 1998).

Tabela 2.2. Comparação entre as propriedades reológicas do AH e *Hylans* (Adaptado de Band, 1998).

	Forma Física	Viscosidade (Pas) (0,001 s ⁻¹)	Módulo de Elasticidade - G' (Pa) (0,01 Hz)
AH 1% (MM = 3 x 10 ⁶ Da)	Solução Aquosa	242	4
<i>Hylan A</i> 1% (MM = 6 x 10 ⁶ Da)	Solução Aquosa	2190	22
<i>Hylan B</i> 0,5%	Gel hidratado (<i>slurry</i>)	NA	69

* O meio aquoso consiste de tampão salino fosfato (PBS). NA= não analisado.

Além das diferenças nas propriedades reológicas do AH e dos *Hylans*, seus tempos de residência em diferentes tecidos também são afetados pelo processo de reticulação. A Tabela 2.3 apresenta o efeito da reticulação no tempo de residência em diferentes tecidos.

Tabela 2.3. Efeito da reticulação no tempo de residência nos tecidos. Comparação entre AH e *Hylan B* (Adaptado de Band, 1998).

	Tempo de Residência	
	AH 1%	<i>Hylan B</i> 0,5%
Joelho	12 horas (<i>Rabbit</i>)	9 dias (<i>Rabbit</i>)
Pele	24 horas (<i>Rabbit</i>)	> 9 meses (<i>Guinea pig</i>)
Vítreo	7 dias (<i>Owl monkey</i>)	>10 anos (<i>Owl monkey</i>)

Sendo assim, *Hylans* são extremamente versáteis e podem ser usados em aplicações para as quais altas massas molares e elevados tempos de residência são necessários, tais como viscosuplementação para tratamento de osteoartrite dos joelhos (Balazs *et al.*, 1987, 1989, 1991, Milas *et al.*, 2001).

2.2.4.1.1. MECANISMO DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO

A Figura 2.8 apresenta o mecanismo da reação de reticulação do AH com DVS utilizada neste trabalho para a preparação dos géis.

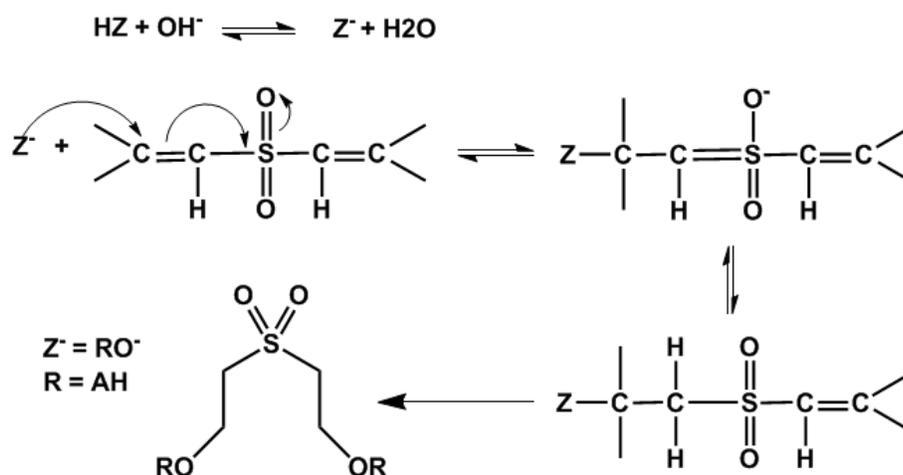


Figura 2.8. Mecanismo da reação de reticulação de AH com DVS (Adaptada de Leshchiner *et al.*, 2007).

A função da base, que no caso é hidróxido de sódio, consiste em retirar um próton do grupo hidroxílico do AH gerando o carbânion alcóoxido (alcoolato) que atua como reagente nucleófilo atacando o sistema conjugado da DVS e formando a ligação éter. A presença do grupo sulfona do agente reticulante aumenta a facilidade de adição nucleofílica à dupla ligação carbono-carbono devido ao seu alto poder de atrair os elétrons da olefina.

2.3. APLICAÇÕES DO AH

A alta massa molar e as propriedades reológicas e viscoelásticas do AH fazem com que ele tenha um importante papel fisiológico nos organismos vivos e seja, portanto um biomaterial atrativo para várias aplicações médicas (Kogan *et al.*, 2007).

O ácido hialurônico (AH) é não imunogênico e, portanto possui um grande potencial para aplicações médicas e cosméticas nas áreas de oftalmologia, em cirurgias oftálmicas (Balazs, 1983); ortopedia, em terapia de artrite (Balazs & Denlinger, 1993), implante de próteses; cicatrização de feridas; prevenção de adesão de tecidos em cirurgias; oncologia e dermatologia (Holmström & Ricici, 1967). Além disso, devido a suas propriedades físico-químicas e funções biológicas, o ácido hialurônico e seus derivados modificados têm sido amplamente utilizados para administração de fármacos (Kim *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2006; Vercruyssen & Prestwich, 1998), engenharia de tecidos (Ohri *et al.*, 2004; West *et al.*, 1985), na prevenção de envelhecimento (Haruo & Yoshiriro, 2000, Tae-Seok *et al.*, 2004) e no preenchimento facial.

O ácido hialurônico usado para aplicações médicas deve em todos os casos ter um elevado grau de pureza e apresentar a faixa de massa molar mais adequada para a aplicação desejada (Ogrodowski, 2006).

2.3.1. APLICAÇÕES MÉDICAS E COSMÉTICAS

A classificação realizada por *Balazs* em 2004, das áreas básicas de aplicação clínica do AH e de seus derivados está apresentada de forma sucinta na Tabela 2.4 (Kogan *et al.*, 2007, Garg & Hales, 2004).

As áreas de aplicação do AH serão discutidas brevemente a seguir dando ênfase a viscosuplementação, objeto deste estudo.

Tabela 2.4. Áreas de aplicação clínica do AH e de seus derivados descrita por Balazs (2004) (Adaptada de Kogan *et al.*, 2007).

Viscocirurgia	Protege os tecidos delicados e fornece espaço durante manipulações cirúrgicas, tais como cirurgias oftalmológicas.
Viscoamento	Preenche e aumenta tecidos traumatizados por procedimentos cirúrgicos ou danos, prevenindo adesão e formação de excessivas cicatrizes.
Viscosuplementação	Repõe ou suplementa os fluidos de tecidos, tais como reposição de fluido sinovial em artrite dolorosa e alívio da dor.
Viscoproteção	Protege os tecidos saudáveis, feridos ou danificados, de ressecamento ou de agentes ambientais nocivos, promovendo a cicatrização de tais superfícies.
Viscosseparação	Separa a superfícies de tecidos conectivos traumatizados por procedimentos cirúrgicos ou danos, para prevenir adesão e formação de excesso de cicatrizes.

2.3.1.1. VISCOCIRURGIA (Oftalmologia)

O AH é o maior componente do corpo vítreo dos olhos sendo, portanto, uma macromolécula chave na oftalmologia. Devido a suas propriedades viscoelásticas, o AH é utilizado em um grande número de cirurgias oftalmológicas. Os produtos de AH protegem o delicado tecido dos olhos e ainda fornecem espaço durante a manipulação cirúrgica. É utilizado principalmente como substituto ou suplemento do fluido vítreo perdido durante procedimentos tais como cirurgias de catarata ou implante de lentes (Garg & Hales, 2004).

2.3.1.2. VISCOSSUPLEMENTAÇÃO (Ortopedia e reumatologia)

A segunda maior aplicação do AH está na viscosuplementação das articulações afetadas pela artrite.

A osteoartrite (OA) e a artrite reumatóide são as doenças das articulações mais comuns na população. A OA é uma doença degenerativa da cartilagem e dos ossos que resulta em rigidez e dor das articulações afetadas. Já a artrite reumatóide é classificada como uma doença inflamatória sistêmica, na qual a dor nas articulações é frequentemente acompanhada de variações degenerativas de outros órgãos, tais como pulmão, coração e vasos sanguíneos. Estima-se que acima de 10% da população com mais de 55 anos seja afetada pela OA.

Desde o final da década de 1980, aplicações de AH intra-articular (viscosuplementação) têm sido realizadas com sucesso em milhares de pacientes afetados pela osteoartrite. Os principais produtos disponíveis no mercado para o tratamento da osteoartrite são o *Healon*® (Pfizer, New York, NY) e o *Synvisc*®, também conhecido como *Hylan G-F 20* (Genzyme, Cambridge, MA) que apresentam massas molares entre 2 e 7 MDa, e os produtos *Hyalgan*® (Fidia, Abano Terme, Itália) e *Artz*® (Seikagaku, Tóquio, Japão) que contém AH de menor massa molar (cerca de 1 MDa) (Kogan *et al.*, 2007).

2.3.1.2.1. OSTEOARTRITE

A osteoartrite é uma doença comum que afeta principalmente as cartilagens. A cartilagem é composta de condrócitos, fibras colágenas e matriz, a qual é formada por ácido hialurônico, proteoglicanos, agreganos, água e eletrólitos (da Silva *et al.*, 2008). A cartilagem é o tecido que cobre as extremidades dos ossos das articulações. Quando saudável, permite que ossos deslizem uns sobre os outros e, portanto a cartilagem desempenha a função de amortecedor.

A osteoartrite é uma doença crônica, multifatorial, que leva a incapacidade funcional progressiva e é frequentemente encontrada nos quadris, nos joelhos, nas falanges distais e nas articulações intervertebrais (Coimbra *et al.*, 2002).

A OA é denominada primária ou secundária, e ao final da fase secundária, a doença é

caracterizada pela deterioração e descolamento do rolamento das articulações e da proliferação de tecidos osteoarticulares ao redor das articulações (Barbucci *et al.*, 2002). A OA é o tipo mais comum e mais dispendioso de artrite. Comparado a outros tipos de artrite tais como artrite reumatóide, lúpus e esclerodermia, a OA não está associada com um aumento crítico da mortalidade. Porém, um aumento na mortalidade tem sido relatado principalmente na população de baixa classe sócio-econômica e educacional que não possui informações adequadas sobre o tratamento (Adams *et al.*, 2000). As principais causas da osteoartrite são doenças hereditárias, doenças endócrinas, desarranjos articulares e doenças inflamatórias.

Atualmente, seu tratamento é conservador e visa principalmente à manutenção da mobilidade das articulações por fisioterapia e o alívio da dor (Barbucci *et al.*, 2002). A OA é comumente tratada com drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSAIDs) que possuem propriedades analgésicas, mas que não retardam ou revertem o processo da doença. Além disso, o tratamento da OA com NSAIDs está associado a um número muito grande de casos de sangramento gastrointestinal, que levam por ano nos Estados Unidos a 16.500 mortes por sangramento induzido por NSAIDs. Estes distúrbios gastrointestinais são atribuídos a habilidade destas drogas em inibir a síntese da prostaglandina gástrica. Para evitar que os riscos do tratamento de doenças benignas como a OA sobreponham seus benefícios, vários estudos tem sido realizados para o desenvolvimento de novos tratamentos e de terapias que sejam eficazes e menos agressivas (Adams *et al.*, 2000, Wobing *et al.*, 1998).

Embora muitas das pesquisas sobre osteoartrite estejam focadas na cartilagem das articulações e nos ossos, sabe-se há algum tempo, que o fluido sinovial (FS) presente nas articulações com artrite apresenta menor elasticidade e menor viscosidade que nas articulações normais. O fluido sinovial é composto principalmente por AH de alta massa molar, e é responsável pela lubrificação e proteção das articulações. A concentração de AH no FS das articulações de humanos saudáveis é de aproximadamente 3 mg/mL. O AH do FS normal presente nas articulações contém cerca de 12.500 unidades dissacarídicas de N-acetil-D-glicosamina e ácido D-glicurônico com massa molar em torno de 5 MDa. Em pacientes com OA, o decréscimo nas propriedades reológicas do FS resulta da diminuição da massa molar e da concentração de ácido hialurônico no fluido (capacidade de lubrificação) (François, 2006). A combinação da deterioração da cartilagem e da perda de lubrificação contribui para a dor, rigidez,

edema articular, crepitação, inflamação (vermelhidão e inchaço) dos joelhos, deformidades e incapacidade funcional. Sendo assim, utiliza-se o conceito da terapia de viscosuplementação, ou seja, o tratamento da OA com injeções de ácido hialurônico de alta massa molar ou de seus derivados. A viscosuplementação baseia-se na hipótese que o produto utilizado irá: melhorar as propriedades lubrificantes do líquido sinovial, reduzir ou parar a dor originada da doença e melhorar a mobilidade do paciente fornecendo um nível de atividade mais confortável. Os parâmetros reológicos do FS em indivíduos jovens e idosos e em pacientes com osteoartrite estão apresentados na Tabela 2.5 (Adams, 2000).

Tabela 2.5. Parâmetros reológicos do fluido sinovial em indivíduos jovens e idosos e em pacientes com AO (Adams, 2000).

Grupo de Pacientes	Viscosidade Complexa (Pas a 0,02 Hz)	% Elasticidade (a 3Hz)
Jovens	137	94
Idosos	33	71
Com OA	0,4 – 0,5	36-73

Greenberg e colaboradores (2006) sugeriram quatro modos de atuação do AH na terapia para o tratamento da OA:

- Restauração de propriedades elásticas e viscosas do líquido sinovial;
- Efeito estimulatório biossintético do AH exógeno nas células, o AH injetado pode induzir a síntese endógena de AH por células sinoviais, estimular a proliferação de condrócitos e inibir a degradação da cartilagem;
- Ação antiinflamatória do AH, uma vez que a terapia está associada à redução da contagem de células inflamatórias no líquido sinovial, a modulação da expressão de citocina e a redução de espécies reativas ao conteúdo de oxigênio;
- Efeito analgésico da administração de AH (Greenberg *et al.*, 2006).

A terapia de viscosuplementação pode ser considerada principalmente em pacientes que não encontraram alívio da dor após: exercícios, fisioterapia, perda de peso, utilização de

crioterapia ou termoterapia, ou uso de analgésicos antiinflamatórios não-esteroidais ou de injeções de corticosteróides. E deve ser realizada nos casos em que o paciente não está recebendo suficiente alívio da dor no tratamento atual; não pode tomar ácido acetilsalicílico ou outros antiinflamatórios como o *ibuprofeno*; necessita de vários medicamentos ao mesmo tempo ou não é um candidato adequado para a cirurgia do joelho.

Os benefícios da viscosuplementação são mais eficazes principalmente no início da doença, porém os viscosuplementos podem ser utilizados em qualquer fase.

O suplemento é injetado diretamente no joelho e as injeções podem ser dadas em apenas um joelho ou em ambos ao mesmo tempo, conforme prescrito pelo médico. A injeção é administrada em consultório médico e o processo leva apenas alguns minutos para ser concluído. Para ajudar a tornar a sua administração o mais confortável possível, o médico pode aplicar um anestésico tópico antes do procedimento (<http://my.clevelandclinic.org>, acesso em 10/02/2011).

Atualmente, um grande número de viscosuplementos baseados em AH estão disponíveis no mercado e novos produtos estão sendo desenvolvidos. Estes produtos variam de acordo com as seguintes características: a fonte do AH utilizado (animal ou bacteriana), sua concentração e massa molar, e o tipo e o grau de reticulação química do AH (François, 2006).

A viscosuplementação com AH e seus derivados é bastante segura e efetiva para o tratamento de OA, porém requer em alguns casos um grande número de aplicações, de 6 a 10 injeções, para a obtenção de resultados satisfatórios. Usualmente, a maioria dos viscosuplementos contém entre 5 e 20 mg/mL de AH e uma vez injetados, estes produtos tem um tempo de residência entre algumas horas a vários dias. Em alguns casos, o alívio da dor ocorre em poucos dias, progride por semanas e dura por vários meses e até por um ano. O uso de uma menor quantidade de injeções oferece vantagens em relação ao uso de múltiplas injeções durante o tratamento, incluindo a diminuição dos riscos de efeitos adversos, a redução de custos, e a melhor aceitação do paciente (François, 2006, Adams, 1993).

As propriedades elastoviscosas inadequadas do AH para a restauração das propriedades reológicas do FS, a possibilidade de rápida degradação do AH após sua injeção e/ ou sua rápida

remoção das articulações são as principais hipóteses para a necessidade de várias injeções e, portanto para a baixa eficácia do AH (Adams, 1993).

Atualmente, as injeções de AH são aprovadas para o tratamento de osteoartrite dos joelhos, cintura e ombros em pacientes que não respondem às terapias convencionais (Campbell & Ruddock, 2007).

Estudos da eficácia de AH intra-articular com o viscosuplemento comercial *Synvisc®* ou *Hylan G-F 20* para o tratamento de OA das articulações metatarsofalangeal dos pés (*hallux limitus*) estão sendo realizados por Munteanu e colaboradores (2009) desde junho de 2008, porém os resultados finais ainda não estão disponíveis (Munteanu *et al.*, 2009).

2.3.1.2.2. VISCOSSUPLEMENTOS COMERCIAIS

Atualmente, várias formulações utilizando AH estão em uso para tratamento de OA. Entre elas estão *Hyalgan®*, *ARTZ®*, *Orthovisc®* e os derivados reticulados *Durolane®* e *Synvisc®* (em ordem crescente de massa molar).

Hyalgan® é uma solução 1% de AH extraído de crista de galo que apresenta massa molar entre 0,5-0,7 MDa. É uma mistura estéril, altamente purificada que é quimicamente similar ao ácido hialurônico encontrado normalmente nas articulações dos joelhos. O tratamento indicado para esse produto consiste de 5 injeções de 2 mL dadas uma vez por semana. Como consequência de sua relativamente baixa massa molar, suas propriedades viscoelásticas mostram-se inferiores a outros produtos e ao FS de indivíduos saudáveis. A duração de atuação deste gel pode variar de acordo com a resposta individual dos pacientes. *Hyalgan®* tem sido usado clinicamente durante 18 anos em 42 países, e mais de 18 milhões de injeções já foram utilizadas. Casos sérios de reações alérgicas com *Hyalgan®* têm sido reportados raramente (Adams, 2000).

Orthovisc® é uma mistura estéril viscosa obtida a partir de AH (1,55 MDa) altamente purificado dissolvido em solução salina isenta de tampões ou de outros conservantes. Também é preparado a partir de AH de crista de galo. Sua concentração é levemente maior que de outras preparações, porém suas propriedades viscoelásticas ainda são inferiores as do AH do FS em indivíduos saudáveis.

ARTZ® (Supartz®) é uma solução 1% de ácido hialurônico extraído de crista de galo com massa molar de 0,6-0,8 MDa. O tratamento recomendado com este viscosuplemento consiste de 3 injeções de 2,5 mL dadas uma vez por semana. Foi o primeiro produto de AH utilizado como viscosuplemento aprovado para o tratamento de osteoartrite. Desde 1987, mais de 143 milhões de injeções de *ARTZ®* têm sido vendidas em todo o mundo, superando todos os outros produtos usados para terapia de articulações (Adams, 2000).

Uma combinação particular de *hylans*, *Hylan G-F 20* ou *Synvisc® (Genzyme Corporation)* foi desenvolvida especialmente para a terapia de viscosuplementação em OA de joelhos (Adams, 2000). *Hylan G-F20* é um fluido elastoviscoso, altamente purificado com propriedades reológicas similares as do FS presente nas articulações dos joelhos de pessoas jovens e saudáveis (Wobing *et al.*, 1998). *Synvisc®* é uma mistura de 80% em volume de *Hylan A* fluido e 20% em volume de *Hylan B* gel. *Synvisc®* apresenta alta massa molar (6MDa) e é produzido a partir de ácido hialurônico obtido de crista de galo. É atualmente uma das melhores opções nos tratamentos de osteoartrite das articulações de humanos como viscosuplemento, pois o módulo de elasticidade do *Synvisc®* é maior que o do fluido sinovial e seu tempo de residência nas articulações ou nos tecidos é maior que o do AH natural (Adams *et al.*, 2000). *Synvisc®* é normalmente injetado diretamente nas articulações doentes, onde fornece elasticidade e viscosidade. O tratamento completo com *Synvisc®* exige a aplicação de três injeções (cada dose contém 2 mL) com espaço de uma semana entre elas. Experimentos mostraram que *Synvisc®* é seguro, bem tolerado, com reações locais ocasionais brandas, e é efetivo no tratamento de osteoartrite das articulações principalmente quando aplicado nas articulações dos joelhos (Adams *et al.*, 2000, Wobing *et al.*, 1998). Segundo Zardawi e Chan (2001), apenas 10% dos pacientes que receberam injeções intra-articulares seguidas de *Synvisc®* apresentaram dores locais e inchaços com seqüelas adversas em longo prazo (Zardawi & Chan, 2001).

Atualmente, os principais concorrentes do *Synvisc®* no mercado são o *Hyalgan®*, produzido pela Fidia S.A. e comercializado nos Estados Unidos pela Sanofi-Synthelabo; o *Orthovisc®*, produzido e comercializado fora dos Estados Unidos pela Anika Therapeutics, Inc. e comercializado nos Estados Unidos pela Ortho Biotech; e o *ARTZ®* ou *Supartz®*, um produto fabricado pela Seikagaku Kogyo que é vendido no Japão pela Kaken Pharmaceutical Co., e nos Estados Unidos pela Smith & Nephew Ortopedia sob o nome *Supartz®*. Estes produtos não são

reticulados e possuem massa molar, viscosidade e elasticidade inferiores as do *Synvisc*[®]. Dois outros produtos potencialmente competitivos que tem autorização de utilização no mercado europeu e estão em processo de aprovação nos Estados Unidos são *Durolane*[®], fabricado pela Q-Med AB, e *Arthrease*[®], de propriedade e fabricado por Savient.

Durolane[®] é um viscosuplemento de AH não-animal estabilizado (*NASHA*[®]), altamente purificado, reticulado com BDDE que possui alta concentração de AH (20 mg/mL) e um longo tempo de residência. O processo de estabilização de *NASHA*[®] permite que *Durolane*[®] resista à degradação e, portanto tenha um efeito mais duradouro, o qual permite que o número de injeções seja reduzido durante o tratamento quando comparado a outras preparações. O regime terapêutico com apenas uma única injeção, tanto para OA do joelho quanto do quadril, é a principal vantagem de produtos obtidos de *NASHA*[®]. Os altos níveis de AH no *Durolane*[®], que prolongam o tempo de residência e a eficácia do produto, justificam a necessidade de apenas uma única aplicação. Cada injeção de 3 mL de *Durolane*[®] fornece 60 mg de AH. As altas concentrações de AH no produto mimetizam os efeitos do AH natural, repondo os níveis de AH, que são naturalmente diminuídos durante a progressão da doença. O AH mantém a homeostase normal do fluido na articulação e ajuda a restaurar sua função normal. Além do mais, o tratamento com *Durolane*[®] pode ser repetido quando necessário. A tecnologia *NASHA*[®] patenteada pela companhia Q-Med's, foi desenvolvida durante os anos 90 e sua principal vantagem é que a modificação do AH é mínima. Além disso, os géis são produzidos a partir de AH purificado por processos bem controlados que garantem que eles contêm um mínimo de substâncias estranhas e, portanto, apresentem um menor risco de reações alérgicas nos pacientes (<http://www.q-med.com>, acesso em 10/02/2011).

A extensa modificação utilizando produtos químicos tóxicos tais como divinilsulfona (DVS) para a produção de géis de AH reticulados pode potencialmente levar a reações inflamatórias e, por conseguinte, a um aumento da taxa de degradação intra-articular. Não há evidências de reações inflamatórias atribuídas a *Durolane*[®], provavelmente devido à fonte não-animal de AH e à suavidade do processo de estabilização. *Durolane*[®] tem sido utilizado seguramente em mais de 1 milhão de tratamentos de OA de joelhos e cinturas (<http://www.medisave.ca>, <http://www.durolane.com>, acesso em 10/02/2011).

Arthrease® é um gel de AH com massa molar de cerca de 3 MDa e concentração de AH de 10 mg/mL, comercializado em seringas de 5 mL (Forsey *et al.*, 2006).

A produção de AH através de fermentação bacteriana e o tratamento com um reduzido número de injeções dos produtos *Durolane*® e *Arthrease*® podem representar vantagens bastante competitivas para esses produtos se forem aprovados e lançados nos Estados Unidos. Entretanto, embora existam vários outros produtos para viscosuplementação no mercado ou em desenvolvimento, ainda não se têm conhecimento de quaisquer produtos que tenham as propriedades de viscosidade, elasticidade e de massa molar, comparáveis as dos *Synvisc*®. Além disso, a empresa Genzyme Corporation colocou recentemente no mercado o produto *Synvisc One*® que possui a mesma formulação e as mesmas propriedades reológicas do *Synvisc*®, e tem a vantagem ser aplicado apenas uma vez (<http://www.synvisc.com>, acesso em 10/02/2011).

2.3.1.3. VISCOAUMENTO (Dermatologia e Cirurgia Plástica)

O desenvolvimento de técnicas não invasivas para a correção de rugas e para o aumento de volume tem movimentado fortemente a indústria mundial de tecidos “soft” e de preenchedores dérmicos. Desde o início dos anos 80, com a comercialização do *Zyderm*®, de origem bovina, inúmeras técnicas para correção de rugas e para aumento de tecidos foram desenvolvidas (Monheit & Coleman, 2006).

Atualmente, o mercado internacional apresenta uma grande variedade de preenchedores injetáveis incluindo produtos sintéticos e produtos derivados de substâncias naturais ou extraídos de células humanas ou animais (Bergeret-Galley, 2004).

A busca por produtos biocompatíveis, que não necessitam de testes preliminares para sua aplicação levou ao desenvolvimento dos preenchedores dérmicos de ácido hialurônico.

Uma variedade de preenchedores dérmicos a base de AH estão disponíveis no mercado mundial, principalmente nos Estados Unidos e na Europa. Esses produtos apresentam diferentes concentrações de AH, viscosidade, tamanhos de partículas e aditivos (Monheit & Coleman, 2006).

O desenvolvimento recente de géis de ácido hialurônico para implantes dérmicos tem fornecido aos médicos novas alternativas para tratamentos eficazes neste campo.

Atualmente, os produtos de AH estabilizados ou reticulados são os preenchedores dérmicos mais utilizados. Desde sua primeira comercialização em 1996, muitas moléculas tem sido exploradas. Elas diferem principalmente pelos processos de reticulação ou de estabilização e pela massa molar média do AH utilizado que pode variar entre 0,5 a 6 MDa (Romagnoli & Belmontesi, 2008, Kablik *et al.*, 2009).

As características físicas tais como dureza do gel, tamanho de partícula, concentração de AH e capacidade de intumescimento determinam o comportamento individual de cada produto e suas aplicações clínicas para o aumento de tecidos “*soft*” (Monheit & Coleman, 2006). Já a segurança dos produtos que visa obter produtos puros, não tóxicos e biocompatíveis está baseada principalmente nos processos de lavagem desses géis e, portanto, na retirada de resíduos de agentes reticulantes. A pureza do AH após extração bacteriana também é um ponto chave na preparação dos géis utilizados como preenchimento dérmico (Romagnoli & Belmontesi, 2008).

A maioria das aplicações para os produtos disponíveis comercialmente são a correção de rugas e de imperfeições faciais tais como cicatrizes de acne; e aumento de volume. Porém, os produtos usados no preenchimento dérmico também apresentam potencial para fornecer correção mecânica de outros tecidos “*soft*” do corpo tais como cordas vocais (Garg & Hales, 2004).

Os produtos baseados em AH oferecem uma significativa vantagem em relação ao colágeno bovino, pois podem ser utilizados na pele sem testes preliminares de sensibilidade (Garg & Hales, 2004). Mesmo assim, injeções de preenchedores dérmicos de AH podem provocar algumas reações inflamatórias. Estas reações podem variar em intensidade e duração de acordo com os produtos usados, técnicas de injeção e resposta individual do paciente. As reações podem ocorrer devido a diversas razões incluindo reação da pele ao produto utilizado para a desinfecção aplicado antes da injeção, reações a agulha utilizada, técnicas não ideais de injeção ou a presença de proteínas residuais não removidas durante os processos de purificação do AH (Judodihardjo & Dykes, 2008).

Nos anos 80, a empresa Biomatrix Inc. desenvolveu o produto *Hylaform*® (Genzyme-Inamed Corporation) utilizado como o primeiro *preenchedor* dérmico de AH, porém este produto foi liberado na Europa somente em 1996.

Existem atualmente vários derivados de AH usados como preenchedores dérmicos que já são vendidos na Europa e nos Estados Unidos, entre eles estão: *Hylaform*®, *Restylane*®, *Perlane*®, *Juvederm*®, *Captique*® e *Teosyal*® (Garg & Hales, 2004, Monheit & Coleman, 2006).

As diferenças nos produtos de diferentes empresas são geralmente atribuídas ao estado físico do gel intumescido após a reticulação do AH. Os produtos podem ser reticulados uma única vez ou duas vezes, podem ser particulados ou não, e podem ser mono- ou bifásicos. As concentrações de AH nas diferentes formulações variam entre 5 e 24 mg/mL. Embora as informações clínicas não possam ser correlacionadas com as propriedades reológicas dos produtos avaliados, estas informações mostram que existe uma correlação linear entre o tempo de residência no sítio de injeção e a concentração do polímero, e em menor extensão, entre o tempo de residência e a elasticidade (Falcone & Berg, 2008).

2.3.1.4. VISCOPROTEÇÃO

O primeiro produto elastoviscoso de ácido hialurônico disponível no mercado para uso terapêutico, o *Healon*®, mostrou-se bastante efetivo no alívio do ressecamento dos olhos. Sua principal função é hidratar e agir como barreira elastoviscosa de proteção entre a córnea e o epitélio conjuntival, e fatores ambientais nocivos. AH elastoviscoso e também as soluções de *Hylans*, além de serem eficazes no tratamento de pacientes com ressecamentos dos olhos, também servem como proteção entre as córneas e lentes de contato. *Hylashield*®, produzido pela empresa Biomatrix Inc., foi o primeiro colírio contendo AH disponível no mercado. Esse produto é preparado a partir de uma solução 0,15% de *Hylan A* com massa molar média de 6 MDa.

A importância da elasticidade dos colírios de AH ou de *Hylan* é demonstrada pelo seu tempo de residência na superfície dos olhos. O rápido e freqüente movimento das pálpebras durante o piscar dos olhos remove da sua superfície quaisquer soluções que sejam simplesmente viscosas, mas não elásticas. Entretanto, soluções de AH de alta massa molar (~6 MDa) e de

concentração apropriada ($\geq 1\%$) são altamente elásticas na frequência de movimento das pálpebras, e embora sejam deformadas elasticamente, não são removidas da superfície dos olhos (Garg & Hales, 2004).

2.3.1.5. VISCOSSEPARAÇÃO OU VISCOADESÃO

Embora o processo de formação da adesão seja considerado uma consequência normal de processos de cicatrização de tecidos traumatizados, vários estudos têm sido realizados para reduzir sua formação, uma vez que a adesão de tecidos pode resultar em infertilidade, obstrução intestinal e dores pós-cirúrgicas. Além disso, as adesões são as maiores causas de morbidade e mortalidade pós-cirúrgica e implicam em um substancial prejuízo econômico na área médica. Tem sido reportado que 79% a 93% dos pacientes de cirurgias abdominais sofrem de adesão e que acima de 90% dos pacientes de procedimentos ginecológicos pélvicos apresentam adesão intraperitoneal (Garg & Hales, 2004).

Embora a diminuição do trauma durante a operação seja um dos mais importantes componentes na redução da formação da adesão, é impossível eliminar os traumas causados nos tecidos. Sendo assim, a proteção dos tecidos com materiais biocompatíveis para a prevenção da adesão pós-cirúrgica tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisa.

O material ideal para a prevenção da adesão de tecidos deve ser biocompatível, ter propriedades aderentes, ter velocidade de reabsorção relativamente lenta sob condições fisiológicas e ser capaz de evitar ou minimizar a formação de tecidos fibrosos. Devido às propriedades do AH, vários grupos de pesquisa tem testado seus efeitos na redução da formação de adesão, entretanto, nas operações pélvicas e abdominais, o AH solúvel tem mostrado somente efeitos preventivos na adesão quando aplicado antes da intervenção cirúrgica. A redução da adesão usando uma barreira requer que esta barreira resida no sítio de aplicação por 3 a 7 dias mantendo os tecidos danificados separados e permitido assim, que ocorra uma cicatrização normal. O AH não modificado não permanece no sítio de aplicação tempo suficiente para manter os tecidos separados e, portanto, modificações químicas do AH são necessárias para prolongar este tempo de residência. Sendo assim, para modificar a solubilidade e o tempo de residência do AH *in vivo*, derivados quimicamente modificados têm sido investigados (Himeda *et al.*, 2004,

Garg & Hales, 2004).

Entre os produtos comerciais disponíveis no mercado estão o *Seprafilm*® (Genzyme Corp.) preparado a partir de AH derivatizado quimicamente com EDC e carboximetilcelulose (CMC); o *Seprak*® que é uma espuma preparada do mesmo material do *Seprafilm*®; o *Sepragel*®, preparado a partir de *Hylan B* e o produto *Merogel*®, que é um derivado esterificado do AH (Garg & Hales, 2004).

2.4. PROPRIEDADES REOLÓGICAS

A análise reológica é uma poderosa ferramenta para explorar a relação entre o comportamento mecânico, a estrutura, a concentração e a massa molar de soluções de biopolímeros (Ambrosio *et al.*, 1999).

A **reologia** é o estudo da deformação e do escoamento da matéria, enquanto que a resistência de um fluido ao escoamento é chamada **viscosidade** (Steffe, 1996).

Em resposta a uma força externa, os materiais podem apresentar comportamento ideal de um sólido elástico ou de um líquido viscoso. O primeiro é descrito pela *Lei de Hooke*, enquanto que um líquido viscoso ideal obedece à *Lei de Newton*. No entanto, todos os sistemas de biopolímeros têm comportamento intermediário, com elementos de sólido elástico e de líquido viscoso em resposta a deformação. Esses sistemas são chamados de **viscoelásticos** (Chronakis & Kasapis, 1995).

Os equipamentos que medem as propriedades viscoelásticas de sólidos, semi-sólidos e fluidos são chamados **reômetros**, que são normalmente rotacionais. Os equipamentos limitados apenas à medida do comportamento de fluxo viscoso são denominados **viscosímetros**. Eles podem ser rotacionais, capilares e do tipo “queda de bola” (Schramm, 2006).

A determinação das propriedades viscoelásticas de materiais pode ser realizada através de testes estáticos ou dinâmicos.

Grande parte das caracterizações reológicas é realizada em escoamento em estado estacionário, já que convencionalmente, a viscosidade é vista como a propriedade mais

importante do material. Nos testes estáticos, uma tensão é imposta e mantida constante durante o teste, e a variação da deformação é medida em função do tempo.

Quando um fluido Newtoniano é submetido a um escoamento, a viscosidade (η) é a constante de proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento (τ) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) como apresentado na Equação (1) (Barnes *et al.*, 1989).

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

Equação (1)

Desde que as unidades de τ (Força/ Área) e $\dot{\gamma}$ são respectivamente, Pa e s^{-1} , a unidade da viscosidade é Pa.s no S.I. (Sistema Internacional).

No entanto, diversos fluidos não seguem a lei de Newton, sendo então chamados de fluidos não-Newtonianos. A constante de proporcionalidade apresentada na *Equação (1)* passa a ser conhecida então como viscosidade aparente. No caso de fluidos não-Newtonianos a viscosidade é dependente da taxa de deformação, existindo diversos modelos reológicos para caracterizar tal fluido. Os tipos de curvas de escoamento obtidas pelos modelos mais simples e mais difundidos na literatura são apresentados na Figura 2.9.

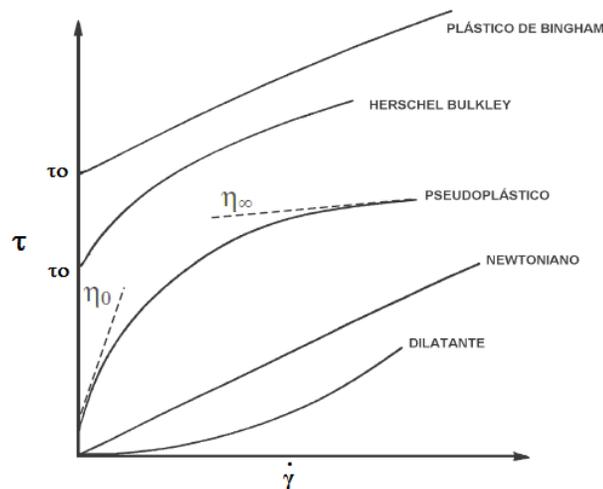


Figura 2.9. Curvas de escoamento para fluido Newtonianos e não-Newtonianos (Adaptado de Braga, 2006).

Nos testes dinâmicos, uma variação senoidal da deformação, ou da tensão, é imposta ao material. A variação da tensão necessária à imposição da deformação, ou a deformação conseqüente da tensão aplicada são observadas como resposta. Em ambos os casos, a tensão de

cisalhamento e a taxa de deformação devem oscilar de acordo com uma curva senoidal com um deslocamento de fase entre 0 e $\pi/2$. Se o material for puramente elástico (*Hookeano*), o deslocamento de fase será 0, mas se o material for líquido (*Newtoniano*), o deslocamento será de $\pi/2$ (90°) (Figura 2.10).

Dentre as propriedades viscoelásticas determinadas nos testes dinâmicos estão o módulo de armazenamento ou de elasticidade (G'), o módulo de perda ou de viscosidade (G'') e o ângulo de fase, normalmente calculado como $\tan \delta = G''/G'$ (Mendieta-Taboata *et al.*, 2008).

O módulo de elasticidade (G') e o módulo de perda (G'') representam, respectivamente, os graus relativos em que um material consegue se recuperar com uma resposta elástica ou com uma resposta viscosa, à medida que a taxa de deformação (frequência) muda. G' e também G'' aumentam linearmente com o aumento da frequência, mas um aumenta mais rapidamente que o outro. No ponto onde $G' = G''$, a frequência é denominada frequência cruzada (f_c).

Já o ângulo de fase (δ) expressa a capacidade de um material em converter energia mecânica em calor, e é considerado muito útil na caracterização de sistemas poliméricos, pois indica o quanto um material é mais caracteristicamente elástico ou viscoso.

Sendo assim, em um gel perfeitamente elástico, G'' e $\tan \delta$ devem ambos ser zero, e a tensão e a taxa de cisalhamento devem estar exatamente em fase (Mendieta-Taboada, 2008).

A maioria dos géis utilizados nas áreas médica e cosmética são viscoelásticos, e podem ser avaliados usando testes dinâmicos também através do módulo complexo (G^*), que define a resistência total do material. A deformação G^* pode ser definida como a soma dos módulos G' e G'' .

Nos géis, a resposta elástica (G') predomina sobre o fluxo viscoso (G''), nenhum módulo apresenta dependência significativa da frequência, e $\log \eta^*$ (viscosidade complexa) decresce linearmente com o aumento do \log de ω (frequência angular), com uma inclinação de -1 quando G' e G'' são constantes.

A Figura 2.11 apresenta o espectro mecânico e a curva de fluxo característicos de géis.

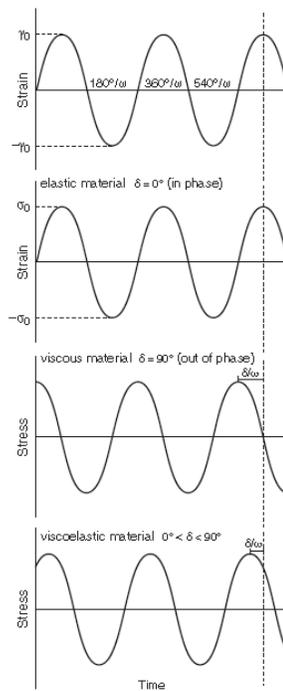


Figura 2.10. Respostas de um material ideal elástico, de um material ideal viscoso e de um material viscoelástico a uma deformação senoidal (ângulo de fase δ , taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$, tensão de cisalhamento σ e frequência angular ω) (Steffe, 1996).

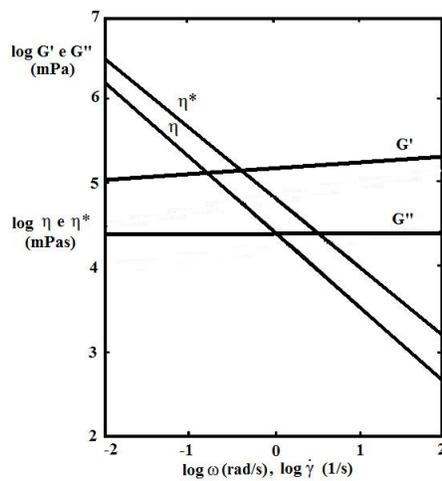


Figura 2.11. Espectro mecânico e curva de fluxo típicos de géis (Adaptado de Chronakis & Kasapis, 1995).

O grau de reticulação e a concentração do gel desempenham um importante papel na definição de G' , G'' , e muitas empresas utilizam estes parâmetros para avaliar a dureza de seus produtos.

Géis mais concentrados produzem maior emaranhamento molecular e, portanto, aumentam o módulo G^* . Um gel com um baixo grau de reticulação, mas com alta concentração de polímero pode apresentar um módulo similar ao de um gel de baixa concentração e alto grau de reticulação. O aumento do grau de reticulação torna a rede mais emaranhada, as ligações mais próximas e, portanto o gel mais rígido ($> G'$). Géis de AH com grupos pendentes não formam uma rede reticulada e assim, apresentam um pequeno efeito no módulo G^* (Kablik *et al.*, 2009).

Os valores de G' e G'' quando plotados como função da frequência podem fornecer importantes informações sobre a estruturas do gel. O grau de dependência da frequência pode ser determinado pelos parâmetros da Lei de Potência (*Equação 2*):

$$G' = A \omega^B$$

Equação (2)

Onde G' é o módulo de elasticidade, ω é a frequência de oscilação e A é uma constante. O expoente B é a inclinação da curva log-log de G' versus ω .

De acordo com Khondkar e colaboradores (2007), o valor B está diretamente relacionado à força e a natureza do gel. *Géis covalentes* apresentam $B=0$ e *géis físicos* apresentam $B>0$ (Khondkar *et al.*, 2007).

Através dos valores de G' e G'' também é possível classificar os géis em *géis convencionais (fortes)* ou em *géis fracos*. O espectro mecânico dos *géis fracos* são levemente diferentes dos espectros dos *géis convencionais* em dois aspectos: os módulos G' e G'' são levemente dependentes da frequência e a magnitude de G' é frequentemente menor que 10 vezes G'' . Isto é, quando os valores de $\tan \delta (=G''/G')$, que é a medida da relativa contribuição do componente viscoso nas propriedades mecânicas do material, são menores que 0,1 tem-se os *géis convencionais*; quando estes valores são maiores que 0,1 têm-se *géis fracos* (Ikeda & Nishinari, 2001).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PREPARAÇÃO DE GÉIS RETICULADOS DE AH

Os géis descritos nesse trabalho foram preparados a partir de ácido hialurônico obtido por fermentação bacteriana de acordo com protocolo descrito por Pires (2009). A fermentação bacteriana foi realizada com a cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 (*American Type Culture Collection*), pertencente ao grupo C de Lancefield e selecionada previamente por Ogradowski (2006). A cepa nativa foi obtida na forma de cultura liofilizada e depositada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) (Campinas, São Paulo, Brasil).

Os reagentes usados neste trabalho são da marca *Synth* exceto quando mencionado.

3.1.1. PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO

O meio fermentado foi centrifugado a 12.745 g (10.000 rpm) em centrífuga da marca Hettich Zentrifugen, modelo Rotina 380R por 10 minutos para remoção das células. O ácido hialurônico presente no meio de cultura livre de células foi então, precipitado com etanol P.A. a 4°C por 1 hora e ressuspensão em solução de NaCl 0,15 mol.L⁻¹ por 3 vezes. A remoção das proteínas, ácidos nucleicos e endotoxinas foi realizada de acordo com Won e colaboradores (2008) através de adsorção em carvão 3% (massa/volume) e γ -alumina 1,5% (massa/volume) por

16 horas. O carvão utilizado neste estudo foi fornecido pela marca *Synth* e apresenta granulometria entre 1 a 2 mm. A γ -alumina utilizada foi fornecida pela Empresa Evonik Degussa Brasil Ltda. e apresenta granulometria de 1,7 a 2,2 mm, área superficial de 213 m²/g e volume de poros de 0,6 cm³/g. A remoção do carvão e da γ -alumina foi realizada por centrifugação a 12.745 g por 10 minutos. O AH foi novamente precipitado com etanol, separado por centrifugação a 1.310 g por 5 minutos e seco a vácuo a 25°C em dessecador com sílica gel por 48 horas.

3.1.2. RETICULAÇÃO COM DIVINILSULFONA

Os géis reticulados com divinilsulfona (97%, *Aldrich*) foram preparados de acordo com protocolo de preparação do produto comercial *Hylastan SGL-80*® descrito por Leshchiner (2006).

A reação de reticulação foi realizada através da adição do agente reticulante DVS a uma solução 3% (g/100g) de AH dissolvido em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ contendo NaCl 3% (g/100g). A reação de reticulação foi efetuada a 25°C por um período de 4 horas. O produto obtido foi lavado por 2 dias em agitador recíproco a 200 rpm com as seguintes soluções: (1) solução de NaCl 0,15 mol.L⁻¹ contendo 2% (mL/100 mL) de uma solução de HCl 1 mol.L⁻¹ (16 horas), (2) solução de NaCl 0,15 mol.L⁻¹ (16 horas) e (3) solução de NaCl 0,15 mol.L⁻¹ contendo 0,4% (mL/100 mL) de uma solução de NaOH 1 mol.L⁻¹ (16 horas). Após drenagem das soluções de lavagem o gel foi agitado por mais 16 horas em solução tampão de fosfato salino (PBS) 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2 ± 0,1) da marca *LB Laborclin*.

3.1.3. DESINTEGRAÇÃO DO GEL

Os géis foram homogeneizados e desintegrados em Ultra-Turrax IKA-T-25 a 24.000 rpm. O tempo de agitação foi definido com base no tamanho de partícula desejado. Após desintegração, os géis foram centrifugados a 12.745 g por 10 minutos para a retirada do PBS.

Os diâmetros médios das partículas foram padronizados em 75-100 µm exceto quando mencionado (item 3.1.6.2).

3.1.4. PREPARAÇÃO DE FLUIDO DE AH (1-1,25 g/100g)

Ácido hialurônico seco purificado de acordo com o item 3.1.1 foi misturado com solução tampão de fosfato salino 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2 ± 0,1) e agitado por 24 horas em agitador recíproco a 200 rpm.

3.1.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO

Os parâmetros avaliados neste trabalho foram selecionados baseado no trabalho descrito por Balazs e Leshchiner (1986) e estão descritos na Figura 3.1.

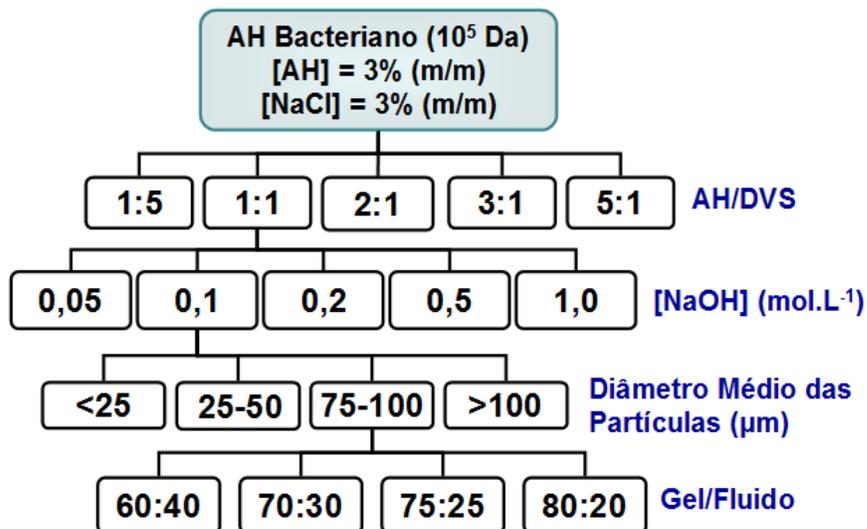


Figura 3.1. Parâmetros da reação de reticulação de AH com DVS avaliados neste trabalho.

A influência da massa molar média não foi verificada, pois um dos objetivos do trabalho é utilizar o AH produzido no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP para produção do gel reticulado com DVS. O AH produzido apresenta massa molar média da ordem de 10⁵ Da.

A influência da concentração de AH na mistura reacional também não foi verificada, pois comercialmente o aumento da concentração de AH aumenta os custos do processo e, portanto do produto final. Sendo assim, a concentração de AH na mistura reacional foi padronizada em 3% (g/100g).

3.1.5.1. EFEITO DA RAZÃO MÁSSICA AH/DVS

Para investigar o efeito da razão mássica AH/DVS na reação de reticulação, géis de AH reticulados com DVS foram preparados de acordo com o item 3.1.2 usando as razões mássicas AH/DVS 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 e 1:5, concentrações de AH e NaCl padronizadas em 3% (g/100g) e concentração de NaOH de 0,1 mol.L⁻¹.

Os géis preparados neste item foram avaliados quanto a suas propriedades reológicas, grau de reticulação, teor de AH e de proteínas, razão de intumescimento, perfil térmico, força de extrusão e caracterização estrutural (infravermelho).

3.1.5.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH

Para avaliar o efeito da concentração de NaOH na mistura reacional, géis de AH reticulados com DVS foram preparados de acordo com o item 3.1.2 usando concentrações de NaOH de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 e 1 mol.L⁻¹, concentrações de AH e NaCl padronizadas em 3% (g/100g) e razão mássica AH/DVS 1:1.

As misturas reacionais foram avaliadas quanto à viscosidade, pH e massa molar média do AH. As medidas de viscosidade foram realizadas a 23 ± 0,5°C em Equipamento SV-10-AND Vibro Viscosimeter (0,3 ~ 10.000 mPas) (Malvern Instruments Ltd.) e as medidas de massa molar média foram realizadas por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) em sistema cromatográfico da Shimadzu (item 3.1.6.4). O pH foi medido em equipamento DM-32 Digimed usando eletrodo combinado de pH DME-CV1.

Os géis preparados neste item foram avaliados quanto as suas propriedades reológicas.

3.1.5.3. EFEITO DA RAZÃO MÁSSICA GEL/ FLUIDO

Embora o aumento da porcentagem de fluido facilite a injeção do produto, este aumento pode ocasionar alteração das propriedades reológicas e, conseqüentemente a diminuição da eficácia e do tempo de residência do produto no sítio de aplicação já que o AH presente no fluido não é reticulado.

Para avaliar o efeito da razão mássica gel/fluido nas propriedades estruturais e reológicas do produto final, foram preparadas misturas com proporções gel/fluido de 80:20, 75:25, 70:30 e 60:40 em massa. Os géis utilizados nas misturas foram preparados conforme o item 3.1.2 usando concentração de NaOH de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, concentrações de AH e NaCl padronizadas em 3% (g/100g) e razão mássica AH/DVS 1:1. O fluido foi preparado conforme item 3.1.4 e a concentração de AH foi padronizada em 1-1,25 g/100g. As misturas foram realizadas em agitador recíproco a 200 rpm por 24 horas.

As misturas gel/fluido foram avaliadas quanto a suas propriedades reológicas e força de extrusão.

Foi também avaliada a estabilidade reológica da mistura gel/fluido 75:25 em geladeira com 60 e 120 dias.

3.1.5.4. EFEITO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS

Para avaliar o efeito do diâmetro médio das partículas nas propriedades reológicas dos géis de AH reticulados com DVS, foram preparados géis com tamanhos de partículas nas seguintes faixas de diâmetro médio: <25, 25-50, 75-100 e >100 μm .

Os géis utilizados neste item foram preparados conforme o item 3.1.2 usando concentração de NaOH de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, concentrações de AH e NaCl padronizadas em 3% (g/100g) e razão mássica AH/DVS 1:1.

O tempo de desintegração dos géis em Ultra-Turrax a 24.000 rpm foi definido com base no tamanho de partícula desejado.

Os géis preparados neste item foram avaliados quanto a suas propriedades reológicas.

3.1.5.5. EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO

Como os processos de esterilização normalmente utilizados degradam a cadeia polimérica de AH com conseqüente diminuição de massa molar média, o efeito do processo de esterilização

utilizando autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm²) foi investigado no AH produzido por fermentação bacteriana, nos géis de AH reticulados com DVS e nas mistura gel/fluido.

3.1.5.5.1. EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO NO AH SECO (MATÉRIA-PRIMA)

Amostras de AH seco foram esterilizadas em Autoclave Vertical Phoenix a 126°C (1,5 kgf/cm²) por 0, 2,5, 5, 10 e 15 minutos. A secagem do AH foi realizada em dessecador sob vácuo à 25°C por 48 horas.

O efeito da esterilização nas propriedades estruturais do biopolímero foi avaliado através da determinação da massa molar média por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (item 3.1.6.4). As massas molares médias foram calculadas a partir dos tempos de retenção através de curva de calibração determinada com AH de diferentes massas molares médias.

3.1.5.5.2. EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO EM SOLUÇÕES DE AH

Para verificar o efeito da esterilização em soluções aquosas, soluções de AH com concentrações de 1 e 7% (massa/volume) foram esterilizadas em autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm²) por 0, 15, 30 e 60 minutos.

As massas molares médias foram calculadas a partir dos tempos de retenção obtidos por Cromatografia de Exclusão por Tamanho.

3.1.5.5.3. EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO NOS GÉIS DE AH RETICULADOS COM DVS E NAS MISTURAS GEL/FLUIDO

Os géis de AH reticulados com DVS e as misturas gel/fluido foram esterilizados em Autoclave Vertical Phoenix a 126°C (aproximadamente 1,5 kgf/cm²) por 2,5 minutos.

O efeito da esterilização nas propriedades estruturais dos géis e das misturas foi avaliado através da determinação de suas propriedades reológicas (item 3.1.6.1).

A eficácia do processo de esterilização foi avaliada por testes de plaqueamento para

contagem de bactérias (mesófilos totais) e de bolores e leveduras (item 3.1.6.11).

3.1.5.6. EFEITO DA PUREZA DA MATÉRIA-PRIMA NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DOS GÉIS

Para verificar o efeito da pureza do AH nas propriedades estruturais e reológicas dos géis de AH reticulados com DVS, foi também preparado um gel (*Gel Controle*) a partir de hialuronato de sódio (Hylumed, Genzyme Corporation Cambridge, Massachusetts, USA) de massa molar média em torno de 10^5 Da.

O *Gel Controle* foi preparado conforme o item 3.1.2 usando concentração de NaOH de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, concentrações de AH e NaCl padronizadas em 3% (g/100g) e razão mássica AH/DVS 1:1.

Através do *Gel Controle* também foi possível avaliar qualitativamente o efeito da massa molar média nas propriedades reológicas dos géis usando o produto comercial *Synvisc*® como referência.

3.1.6. CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS RETICULADOS DE AH

3.1.6.1. ANÁLISE REOLÓGICA

Os testes reológicos foram realizados em reômetro Haake, modelo RheoStress 1 (Haake Inc., Alemanha). Foram caracterizadas as propriedades do fluido em regime permanente e em regime oscilatório, empregando-se geometria de placas paralelas de 20 mm. O sistema foi termostatizado a 25°C por um banho circulatório modelo Thermo Haake DC-30, com uma variação de temperatura de $0,1^\circ\text{C}$. As medidas oscilatórias foram conduzidas na região viscoelástica linear, com uma tensão de oscilação de 1,188 Pa, em uma faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz. As medidas em regime permanente foram efetuadas com taxas de cisalhamento entre 0,1 a 50 s^{-1} . Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') e a viscosidade complexa (η^*) foram obtidos em função da frequência na região viscoelástica. A tangente do ângulo de fase (δ) foi calculada como a razão entre o módulo de perda (G'') e o módulo de estocagem (G') ($\tan \delta = G''/G'$).

3.1.6.2. DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULAS

Os diâmetros médios das partículas foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (Dynamic light scattering, DLS), utilizando equipamento “Light Scattering Particle Size Distribution Analyser” da marca Horiba, modelo LA-900. As leituras foram realizadas em triplicata usando água *Milli-Q*[®] como dispersante.

3.1.6.3. CONCENTRAÇÃO DE AH

A concentração de AH foi determinada pelo método do Carbazol Modificado de acordo com Bitter e Muir (1962). As leituras de absorvância foram realizadas a 530 nm em Espectrofotômetro Hitachi U 2001 e a concentração de AH foi determinada através de uma curva de calibração (ANEXO A) previamente construída com hialuronato de sódio NaH (Hylumed, Genzyme Corporation Cambridge, Massachusetts, USA).

3.1.6.4. MASSA MOLAR MÉDIA DE AH

As massas molares médias foram analisadas nas matérias-primas por Cromatografia de Exclusão por Tamanho em sistema cromatográfico da Shimadzu (bombas Shimadzu LC-10 AS, injetor manual Shimadzu 2D, detector de índice de refração Shimadzu RID-6A e integrador Shimadzu), usando pré-coluna Polysep-GFC-P (35 x 7,8 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA), coluna de filtração em gel Polysep-GFC-P6000 (300 x 7,8 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA); e nitrato de sódio (0,1 mol.L⁻¹) a uma vazão de 1 mL.minuto⁻¹ como fase móvel isocrática. As massas molares médias foram determinadas através de curva de calibração com padrões de AH (Hyalose, Oklahoma, USA) com as seguintes massas molares: 50, 150, 250, 500 e 1000 KDa.

A curva de calibração (ANEXO B) foi obtida com a linearização da curva exponencial e as massas molares médias foram determinadas com base no tempo de retenção das amostras injetadas.

3.1.6.5. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

O conteúdo de proteína solúvel foi determinado segundo método descrito por Bradford (1976). As leituras de absorvância foram realizadas a 595 nm em Espectrofotômetro Hitachi U 2001 e a concentração de proteínas foi determinada através de uma curva de calibração (ANEXO C) previamente construída com albumina de soro bovino 98% (BSA) da marca *Sigma*.

O conteúdo de proteínas totais foi determinado segundo método descrito por Lowry (1951) utilizando *SERVA Lowry Assay Kit*. As leituras de absorvância foram realizadas a 660 nm em Espectrofotômetro Hitachi U 2001 e a concentração de proteínas foi determinada através de uma curva de calibração (ANEXO D) previamente construída com albumina de soro bovino (BSA).

3.1.6.6. RAZÃO DE INTUMESCIMENTO

Após a síntese, os géis foram imersos em solução salina e em solução tampão de fosfato salino (PBS); e deixados intumescer até o equilíbrio, a 25,0°C por 72 horas. Os géis foram então pesados para a obtenção da massa de gel intumescido (m_i). A massa de gel seco (m_s) foi determinada após secagem dos géis a vácuo (1 mmHg) a 25°C por 72 horas de acordo com Shu e colaboradores (2004). A razão de intumescimento do polímero (RI_{AH}) e a razão de intumescimento do gel (Q) foram calculadas de acordo com as *Equações (3) e (4)*, respectivamente:

$$\text{Razão de Intumescimento do Polímero } (RI_{AH}) = \frac{(m_i - m_s)}{m_{AH}}$$

Equação (3)

$$\text{Razão de Intumescimento do Gel } (Q) = m_i / m_s$$

Equação (4)

Onde m_{AH} (em g) é a massa de AH no gel final colocada em cada reação (Zawko *et al*, 2009). O conteúdo total de água no equilíbrio (W_i) foi calculado de acordo com a *Equação (5)*.

$$\text{Conteúdo de Água Total no Equilíbrio } (\%) = \left[\frac{(m_i - m_s)}{m_i} \right] \times 100$$

Equação (5)

Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.1.6.7. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

A caracterização estrutural da molécula foi realizada nas amostras liofilizadas através de análises de infravermelho. As análises foram realizadas pela Empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., em Espectrofotômetro de Infravermelho Shimadzu IR Prestige-21.

Foram analisados o AH utilizado como matéria-prima, o gel de AH preparado com razão mássica AH/DVS 1:1 ($[AH]=3\%$ (g/100g), $[NaCl]=3\%$ (g/100g), $[NaOH]=0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e o produto comercial *Synvisc®* (*Hylan G-F 20*) (Genzyme Corporation). A liofilização das amostras foi realizada por 72 horas em liofilizador Liobras L101.

3.1.6.8. FORÇA DE EXTRUSÃO

As medidas de força de extrusão foram realizadas pelo Departamento de Plásticos (DEPLAS) do Colégio Técnico da UNICAMP (COTUCA) em equipamento EMIC DL-3000 usando uma célula de 10 kg. As seringas foram acopladas ao equipamento através do suporte apresentado na Figura 3.2.



Figura 3.2. Suporte para acoplamento das seringas usadas nas análises de força de extrusão.

Para as medidas de força de extrusão, foram utilizadas seringas hipodérmicas de 1 mL da marca BD Plastipak® Luer Slip equipadas com agulhas BD Precision Glide® 30G½ (0,30 x 13).

O êmbolo foi empurrado em uma velocidade constante de 50 mm.min^{-1} e a força do platô foi calculada e reportada em Newtons.

3.1.6.9. GRAU DE MODIFICAÇÃO

O grau de modificação estequiométrico dos géis de AH foi calculado através da estequiometria da reação onde cada unidade repetida de dissacarídeo do ácido hialurônico requer duas moléculas do agente reticulante (Figura 3.3).

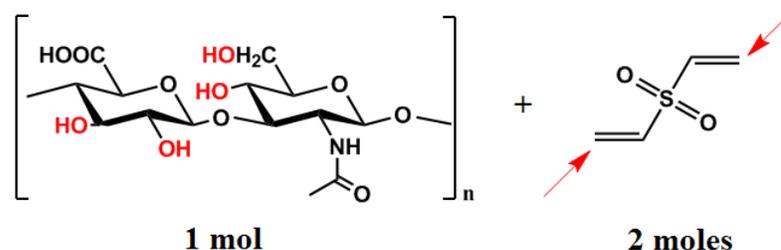


Figura 3.3. Estequiometria da reação de reticulação de AH com DVS.

O grau de modificação *real* foi obtido por Espectrometria de Emissão por Plasma Induzido (ICP) através da análise de enxofre nas águas de lavagem. As análises de Espectrometria de Emissão por Plasma Induzido foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP em Equipamento Perkin-Elmer 3100XL Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer através de curva de calibração.

3.1.6.10. PERFIL TÉRMICO

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*) foram realizadas em equipamento DSC 2920 modulated da TA Instruments.

Os perfis térmicos foram realizados nos géis secos em dessecador com sílica gel a vácuo, a 25°C por 72 horas, sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL.min⁻¹; razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, aquecimento da temperatura ambiente até 300 °C; cápsula de alumínio fechada hermeticamente e massa de amostra em torno de 10 mg.

A célula do DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrão de índio metálico ($T_{\text{fusão}} = 156,6 \text{ °C}$) com pureza de 99,99%. Para a quantidade de calor empregou-se o $\Delta H_{\text{fusão}}$ do índio metálico (28,7 J.g⁻¹).

A análise calorimétrica exploratória diferencial também foi empregada para avaliar o estado da água presente nos géis intumescidos.

Amostras de géis intumescidos selados em cadinho de Al foram resfriadas a -30°C e então aquecidas até 30°C a uma taxa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A endoterma associada com a perda de água foi obtida através das áreas dos picos normalizadas com as massas de amostra, e comparada com o valor teórico da água de acordo com Collins e Birkinshaw (2007). A fração de água livre ($W_f + W_{fb}$) foi calculada como a razão entre a área do pico endotérmico do gel intumescido (Q_{endo}) e o calor de fusão endotérmico para a água pura ($Q_f = -334\text{ J/g}$). A água ligada foi calculada como a diferença entre a água total e a água livre.

$$W_b (\%) = W_t - (W_f + W_{fb}) = W_t - (Q_{\text{endo}} / Q_f) \times 100$$

Equação (6)

Onde W_b é a quantidade de água ligada, W_f e W_{fb} são as quantidades de água livre e de água ligada por congelamento, respectivamente; e W_t é o conteúdo de água total no equilíbrio obtido pela *Equação (5)*.

3.1.6.11. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.1.6.11.1. CONTAGEM DE BACTÉRIAS (MESÓFILOS TOTAIS)

A contagem de bactérias ou dos mesófilos totais foi realizada para verificar a eficácia do processo de esterilização dos géis de AH preparados neste trabalho. Para tanto, foram plaqueadas as amostras de gel estéril e não estéril.

Para a contagem de bactérias foi utilizado o meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*) (*Oxoid*) que é um meio de enriquecimento para contagem total de microrganismos em placas, ou para manutenção de culturas de bactérias; e o plaqueamento em superfície utilizando o método de diluição seriada (Figura 3.4).

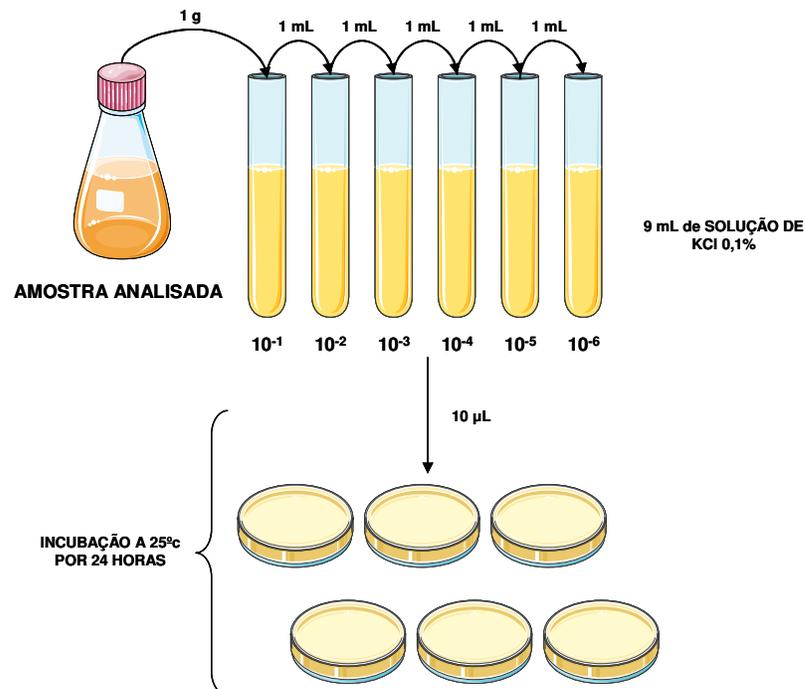


Figura 3.4. Procedimento para contagem de bactérias usando método da diluição seriada.

As diluições seriadas foram realizadas em solução de KCl 0,1% (massa/volume) usando 1 g de gel de AH. Em cada quadrante da placa foram depositados 10 µL de cada diluição (3 gotas). A contagem foi realizada após incubação das placas a 35°C por 24 horas.

Todos os materiais e reagentes usados para a realização do experimento foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

O número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL foi calculado de acordo com a *Equação (7)*:

$$UFC.mL^{-1} = \text{média do número de colônias} \times \text{fator de diluição da amostra} \times 10^2$$

Equação (7)

3.1.6.11.2. CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

A contagem de bolores e leveduras também foi realizada para verificar a eficácia do processo de esterilização dos géis de AH preparados neste trabalho.

Foram plaqueadas as amostras de gel estéril e não estéril.

Para contagem de bolores e leveduras foi utilizado o meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*) (*Oxoid*) acidificado com 0,2 mL de ácido tartárico 10%; e o plaqueamento em profundidade (“pour plate”), empregando-se o método de diluição seriada da amostra.

As diluições seriadas foram realizadas em solução de KCl 0,1% usando 1 g de gel de AH. Em cada placa foi depositado 1 mL de cada diluição. A contagem foi realizada após incubação das placas a 25°C por 5-7 dias.

Todos os materiais e reagentes usados para a realização do experimento foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

O número de unidades formadoras de colônia por mL foi calculado de acordo com a Equação (8).

$$UFC.mL^{-1} = \text{média do número de colônias} \times \text{fator de diluição da amostra}$$

Equação (8)

3.1.6.12. TESTE *IN VITRO*

Todos os testes *in vitro* foram realizados pelo Laboratório de Biomateriais em Ortopedia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Os testes adotados neste estudo são recomendados pela ISO 10993-5 I 1992 e NBR ISO 10993 como padrão para avaliação da citotoxicidade de biomateriais de acordo com normas internacionais vigentes.

Os testes *in vitro* foram realizados na mistura de gel de AH reticulado com DVS (AH/DVS 1:1, [AH] e [NaCl] = 3 g/100g, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹) e fluido ([AH] = 1 g/ 100g) na proporção 75:25 que apresentou melhor desempenho nos testes reológicos, com módulo elástico (G') próximo ao do fluido sinovial.

3.1.6.12.1. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

Os testes de viabilidade celular foram realizados através do Método de incorporação do vermelho neutro (ANEXO E) e do Método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium) (ANEXO F).

Para o ensaio foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos originária de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*). As células VERO foram obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP. Esta linhagem celular foi adotada por ser uma linhagem recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais.

As leituras de absorvância foram realizadas em leitor de Microplacas (Microplate Reader DNM 9602, Beijing Perlong New Technology Co, Ltd.) em comprimento de onda de 540 nm.

A análise estatística foi feita usando One Way Anova, com nível de significância de 0,05.

3.2. PREPARAÇÃO DO CONJUGADO AH-DPPE (DIPALMITOIL FOSFATIDIL ETANOLAMINA)

O fosfolipídio *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine* (DPPE) foi obtido da empresa Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), e o reagente *1-ethyl-3-[3-dimethyl)aminopropyl] carbodiimide hydrochloride* (EDAC) da Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, França).

Os conjugados descritos nesse trabalho foram preparados a partir de ácido hialurônico com as seguintes massas molares: 10^4 Da fornecido pela Empresa Lifecore Biomedical (Chaska, MN, USA); AH 10^5 Da obtido através de fermentação bacteriana de acordo com protocolo descrito por Pires (2009), com a cepa de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 (*American Type Culture Collection*), pertencente ao grupo C de Lancefield (ATCC 39920); AH 10^6 Da fornecido pela Empresa Galena Química e Farmacêutica Ltda. e produzido pela Empresa Nikkol Group Companies (Tokyo, Japão).

Os reagentes usados neste trabalho são marca *Synth* exceto quando mencionado.

3.2.1. PREPARAÇÃO DO CONJUGADO AH-DPPE

O conjugado AH-DPPE foi preparado através da reação descrita por Yerushalmi e Margalit (1998) modificada.

AH (140 mg) foi dissolvido em 50 mL de água Milli-Q® e pré-ativado por incubação sob

agitação a 37°C por 2 horas com 60 mg de EDAC. O pH foi ajustado a 4,0 por titulação com HCl 0,1 mol.L⁻¹. Subsequentemente, uma suspensão aquosa de DPPE (3 mg) foi adicionada à solução de AH e o pH foi novamente ajustado a 8,6 com uma solução de tampão borato 0,05 mmol.L⁻¹. A mistura reacional foi mantida sob incubação a 37°C por mais 24 horas. A solução contendo o conjugado AH-DPPE foi então purificada por ultra-filtração em membranas de 10.000 e 100.000 (MWCO 10.000 e 100.000 Da) (Amicon Ultrafiltration, Millipore Corporate, Saint Quentin em Yvelines, França), conforme a massa molar do AH utilizado na reação. Após separação, o conjugado AH-DPPE foi completamente retido na membrana, enquanto que o EDAC, o fosfolipídio que não reagiu e os outros subprodutos da reação foram eliminados no filtrado. O conjugado foi liofilizado (Liobras L101) por 72 horas.

3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO AH-DPPE

A pureza do conjugado foi verificada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) em sílica utilizando uma mistura CHCl₃:MeOH:H₂O (65:25:2) como fase móvel e vapor de iodo como revelador.

A concentração de fosfolipídio presente no produto foi determinada através de ensaio fosfato segundo protocolo descrito por Chen e colaboradores (1956). As leituras de absorbância foram realizadas a 830 nm em Espectrofotômetro Hitachi U 2001 e a concentração de fosfato foi determinada através de uma curva de calibração (ANEXO G) previamente construída com fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Na₂HPO₄.7 H₂O) (Ecibra).

A concentração de AH foi determinada pelo método do Carbazol Modificado de acordo com Bitter e Muir (1962) (item 3.1.6.3).

A caracterização estrutural do conjugado AH-DPPE foi realizada por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (¹H RMN) pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP em Espectrômetro de RMN Bruker 250 MHz usando D₂O como solvente.

3.2.3. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Lipossomas compostos de fosfatidilcolina de ovo (Lipoid E-80) e DPPE foram preparados pelo método de Banghan por hidratação do filme lipídico (New, 1990). Para preparação do filme seco, os lipídios foram solubilizados em uma mistura $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 e o solvente foi então evaporado sob vácuo. A concentração total de lipídios utilizada foi de $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e as razões molares foram de 80% do Lipoid E-80 para 20% de DPPE. Para preparação do lipossoma convencional, o filme lipídico foi hidratado a temperatura ambiente com uma solução de NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$. Para preparar os lipossomas contendo o conjugado AH-DPPE, os filmes lipídicos foram hidratados com NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 5%, 10% e 15% da concentração do lipídio DPPE em massa. Os lipossomas foram então extrudados por 10 vezes em extrusora (Extrusora em Aço Inox, Lipex Biomembranes Inc., modelo T001) com duas membranas de policarbonato de 100 nm sobrepostas a 15 atm de pressão. Durante o processo de extrusão, a formulação foi mantida à 60°C uma vez que a temperatura de transição vítrea do DPPE é 63°C . Os lipossomas foram avaliados quanto tamanho, polidispersidade e potencial zeta em equipamento ZetaSizer Nano ZS da marca Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PREPARAÇÃO DE GÉIS RETICULADOS DE AH

4.1.1. PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO

A pureza do AH usado como matéria-prima é um parâmetro que deve ser controlado para obtenção de géis com características específicas para as aplicações requeridas.

Inicialmente, o AH bacteriano produzido no LDPB foi purificado apenas por múltiplas precipitações com solventes (etanol) gerando valores de pureza em torno de 30%.

Para a aplicação pretendida foi necessário estudar novos procedimentos de purificação, pois a pureza do AH usado para preparação dos géis é um fator que influencia diretamente a reação de reticulação com DVS já que proteínas e outras moléculas também podem ser reticuladas com este reagente.

Sendo assim, foram investigadas as etapas do procedimento de purificação descrito por Won e Seo (2008) (Figura 4.1(a)). A eficácia deste procedimento foi avaliada através da determinação da pureza do AH seco pelo método do Carbazol Modificado (Bitter & Muir, 1962) e dos teores de proteína através do método de Bradford (1976).

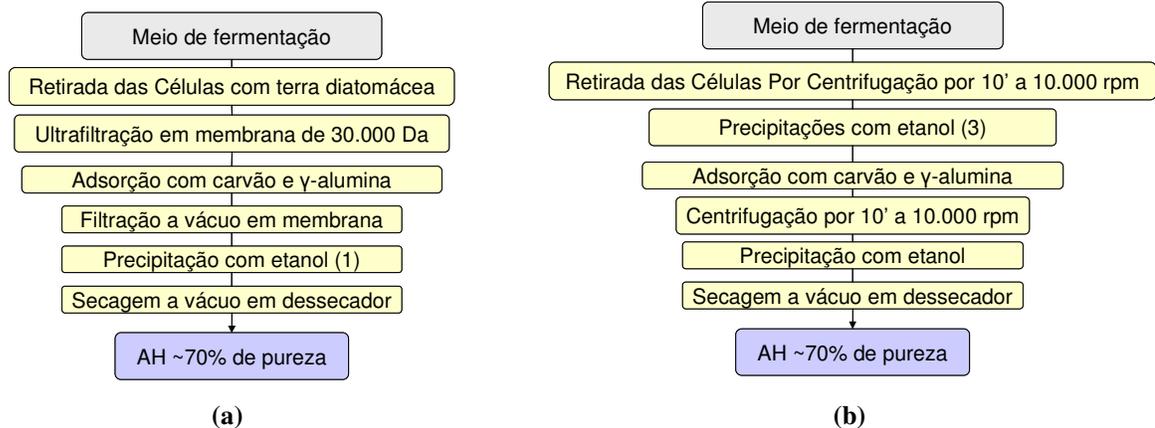


Figura 4.1. Protocolos de purificação do AH. **(a)** Protocolo descrito por Won & Seo (2008). **(b)** Protocolo usado neste trabalho.

O AH obtido pelo procedimento descrito por Won e Seo (2008), descrito no item 3.1.1, apresentou um valor de pureza de 70% (g/100g) e de 0,4% (g/100g) de proteínas. A Figura 4.2 apresenta o meio fermentado obtido em cada etapa do procedimento de purificação.

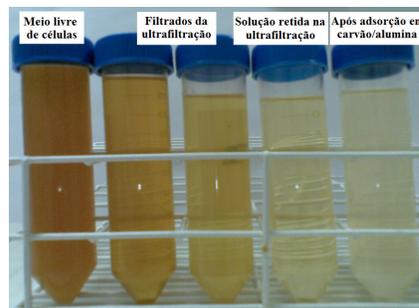


Figura 4.2. Meio fermentado após etapas de purificação segundo Won e Seo (2008).

Embora os resultados de pureza e teores de proteínas obtidos por este procedimento sejam aceitáveis, algumas alterações foram realizadas visando a aplicação pretendida, posterior escalonamento do processo e maior produtividade.

A etapa de retirada das células do meio fermentado através da adição de terra diatomácea foi substituída por centrifugação a 12.745 g para evitar a adição de produtos químicos que possam afetar a reação de reticulação.

Devido à lentidão da etapa de ultrafiltração e o alto custo das membranas, esta etapa foi substituída por três precipitações com etanol.

O AH obtido pelo procedimento modificado apresentou valores de pureza entre 68% e 72% (g/100g) e teores de proteínas entre 0,4% e 2,4% (g/100g). A Figura 4.3 apresenta imagens de soluções de AH (3% m/m) preparadas com AH de 30% e 70% (g/100g) de pureza.

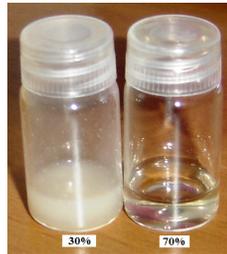


Figura 4.3. Soluções 3% (g/100g) preparadas a partir de AH com 30% e 70% (g/100g) de pureza.

Baseado nos resultados obtidos foi estabelecido o procedimento para purificação do AH utilizado para preparação dos géis reticulados com divinilsulfona apresentados neste trabalho. O fluxograma apresentado na Figura 4.1 (b) detalha as etapas deste procedimento.

4.1.2. RETICULAÇÃO COM DIVINILSULFONA

De acordo com Balazs e Leschiner (1986), divinilsulfona (DVS) reage prontamente com AH em solução alcalina aquosa a 25°C fornecendo um gel de AH reticulado. A razão de intumescimento e as propriedades reológicas dependem do grau de reticulação do gel. E este, por sua vez, pode ser controlado por vários fatores incluindo massa molar do AH, sua concentração na mistura reacional, a concentração de álcali, a razão polímero/ DVS e a adição e concentração de sais neutros. (Balazs & Leschiner, 1986).

As diferentes propriedades reológicas e estruturais dos géis obtidos possibilitam aplicações específicas destes nas áreas médica e cosmética. Sendo assim, visando uma posterior aplicação do gel preparado neste trabalho como viscosuplemento para o tratamento de pacientes com doenças degenerativas das articulações; os seguintes parâmetros da reação de reticulação foram avaliados: razão mássica AH/DVS e concentração de NaOH na mistura reacional.

Além desses parâmetros, foram verificados os efeitos do diâmetro médio das partículas, da razão mássica gel/ fluido, da pureza do AH e da esterilização nas propriedades estruturais e reológicas dos géis.

Foi também avaliada a estabilidade reológica da mistura gel/fluido em geladeira com 60 e 120 dias.

4.1.2.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

A caracterização estrutural dos géis preparados neste trabalho foi realizada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) através da comparação entre os espectros dos géis com os espectros do AH não reticulado e do produto comercial Synvisc® (Figura 4.4).

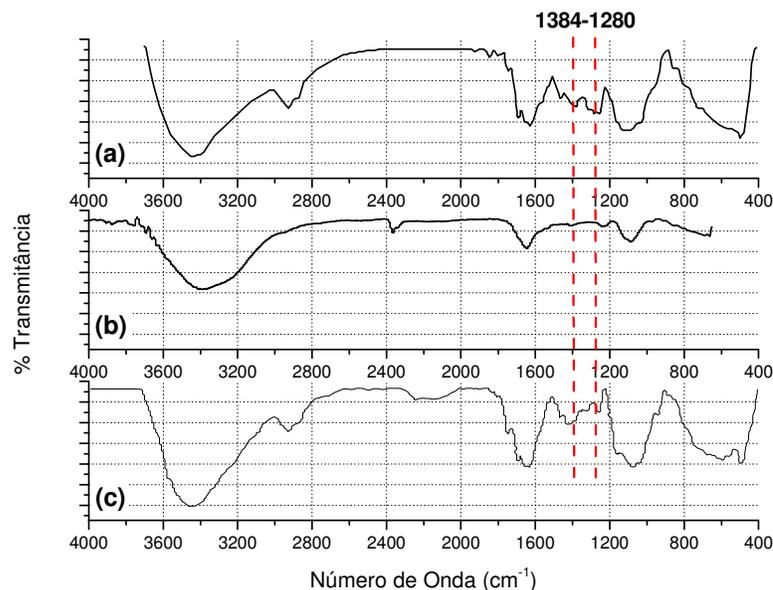


Figura 4.4. Espectros de Infravermelho: (a) Gel de AH reticulado com DVS preparado neste estudo ([AH] e [NaCl]=3%, AH/DVS 1:1, [NaOH]=0,1 mol.L⁻¹), (b) Ácido hialurônico bacteriano, (c) Synvisc® - Transmitância versus número de onda (cm⁻¹).

As bandas de absorção do ácido hialurônico obtidas por espectroscopia no infravermelho foram caracterizadas de acordo com Haxaire e colaboradores (2002):

- 600 cm⁻¹ (strong): corresponde às vibrações rotacionais das moléculas de água residual;

- 950-1200 cm⁻¹ (strong): correspondem às vibrações de estiramento (ν C-OH) dos alcoóis; e o ombro em 1160 cm⁻¹ é atribuído ao ν C-O-C antissimétrico dos grupos glicosídicos;
- 1400 cm⁻¹: corresponde ao ν^s COO⁻ simétrico no grupo carboxilato simétrico COO⁻ ou corresponde ao ν C-O⁻ no mesmo grupo que mostra assimetria, permitindo assim, distinguir entre C=O e C-O⁻;
- 1500-1700 cm⁻¹ (strong): correspondem à superposição entre as bandas amida I e II e as várias bandas dos grupos carbonila e carboxila (ν C=O);
- 2900 cm⁻¹: corresponde ao estiramento C-H;
- 2500-3600 cm⁻¹ (broad, strong): atribuídas às bandas de estiramento dos grupos ν N-H... / ν O-H... pertencentes aos grupos N-H e O-H envolvidos nas ligações de hidrogênio. O ombro em 3100 cm⁻¹ é característico de uma ressonância de Fermi de ν N-H... com um *overtone* da banda da amida II.

Quando comparado ao espectro de infravermelho do ácido hialurônico nativo (Figura 4.4(b)) observa-se que a amostra de gel reticulada com DVS apresenta bandas de absorção na região de 1280-1380 cm⁻¹. Estas bandas podem ser atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo SO₂ da divinilsulfona (ν SO₂ 1300-1350 e 1120-1160 cm⁻¹) e/ou ao estiramento -CH=C- do grupo vinil (ν -CH=C- 1290-1300 cm⁻¹).

Não foi possível avaliar com clareza a presença de grupos pendentes ou de DVS “livre”, pois não foi possível identificar as bandas referentes ao grupo vinil do agente reticulante: -CH=C- (1290-1300 cm⁻¹), -C=CH₂ (1410-1420 cm⁻¹), *trans* (-CH=CH-) (960-970 cm⁻¹) e *cis* (-CH=CH-) (690 cm⁻¹). Estas bandas apresentaram-se encobertas pelas bandas do AH e possivelmente pela banda da sulfona (Silverstein & Bassler, 1963).

Também não foi possível identificar a banda de absorção da ligação éter formada na reação de reticulação, referente ao estiramento assimétrico do C-O-C (1250-1060 cm⁻¹), devido à presença das bandas entre 950-1200 cm⁻¹ do AH (ν C-OH dos alcoóis e ν C-O-C antissimétrico dos grupos glicosídicos).

A comparação entre os espectros de infravermelho do gel preparado neste estudo e do gel comercial *Synvisc*® não apresentaram diferenças significativas indicando se tratar do mesmo produto. Nos dois géis é possível identificar a banda de absorção referente ao estiramento ν SO₂

simétrico e assimétrico e/ou ao -CH=C- do grupo vinil entre 1280 e 1380 cm^{-1} .

4.1.3. DESINTEGRAÇÃO DOS GÉIS

Visando verificar o melhor procedimento para desintegração dos géis obtidos, foram avaliados os seguintes procedimentos:

- Passagem por seringa (1 vez utilizando uma seringa equipada com uma agulha de 22 Gauge e em seguida 2 vezes utilizando uma agulha de 26 Gauge);
- Agitação a 1.000 rpm por 1 hora em agitador mecânico com impelidor de fluxo radial;
- Passagem por extrusora sem membrana (Extrusora em Aço Inox, Lipex Biomembranes Inc., modelo T001);
- Agitação a 10.000 rpm em Ultra-Turrax IKA T-25 por 50 minutos.

A Figura 4.5 apresenta as curvas de distribuição de tamanhos de partículas do gel reticulado de AH (AH/DVS 1:1, $[\text{NaOH}] = 0,2\text{ mol.L}^{-1}$) após desintegração pelos métodos descritos acima:

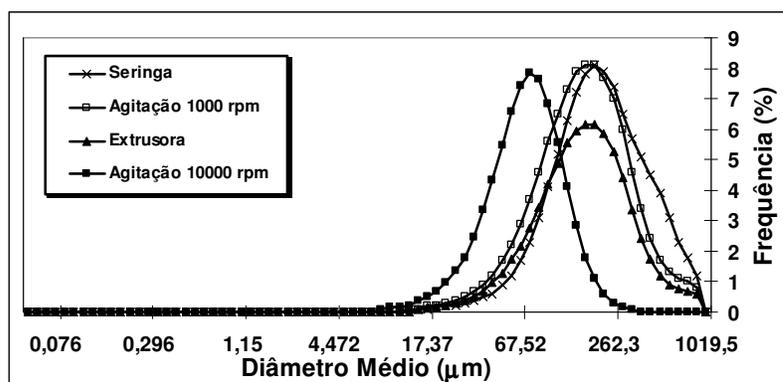


Figura 4.5. Curvas de distribuição de tamanhos de partículas (em volume) do gel reticulado de AH obtidas por diferentes métodos de desintegração do gel.

As curvas de distribuição de tamanhos de partículas obtidas após passagem por seringa; após agitação mecânica por 1 hora a 1.000 rpm e após passagem por extrusora sem membrana, mostraram a existência de partículas maiores que a faixa de operação do equipamento ($0,05\text{-}1000$

μm), não sendo possível a determinação de um valor de diâmetro médio confiável. Qualitativamente os diâmetros médios obtidos foram maiores que $200 \mu\text{m}$.

O diâmetro médio obtido após agitação a 10.000 rpm por 50 minutos foi de $77,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$.

Visando diminuir o tempo de agitação, o gel reticulado de AH (AH/DVS 2:1, $[\text{NaOH}] = 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) foi agitado em Ultra-turrax a 24.000 rpm . A Figura 4.6 apresenta os tamanhos de partículas obtidos em função do tempo de agitação nesta rotação para o gel preparado nas condições descritas acima:

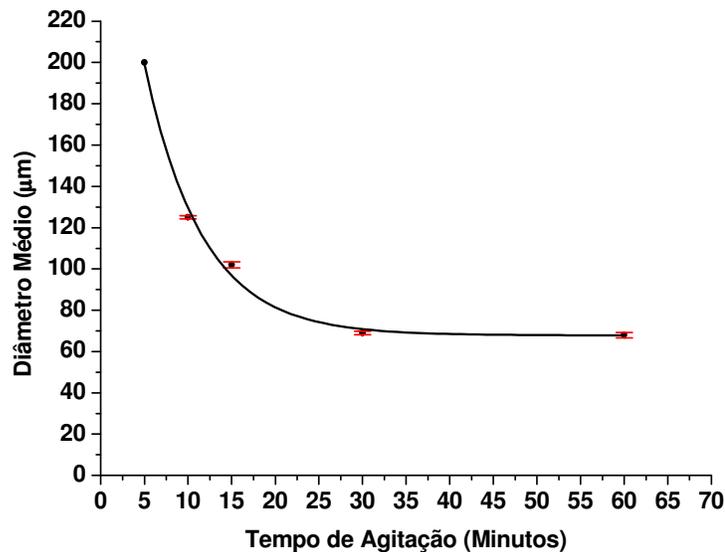


Figura 4.6. Diâmetros médios de partículas (em volume) do gel reticulado de AH (AH/DVS 2:1, $[\text{NaOH}] = 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) em função do tempo de agitação em turrax a 24.000 rpm . Médias referentes a 3 leituras.

Com 5 minutos de agitação não foi possível determinar um diâmetro médio confiável, pois a curva de distribuição de tamanhos de partículas obtida mostrou a existência de partículas maiores que a faixa de operação do equipamento ($0,05\text{-}1000 \mu\text{m}$). Qualitativamente os diâmetros médios obtidos foram maiores que $200 \mu\text{m}$.

Com 15 minutos de agitação a 24.000 rpm, foi possível atingir a faixa de diâmetros de partículas requerida para a aplicação desejada (50-125 μm) para o gel preparado com razão mássica AH/DVS 2:1 e concentração de NaOH de 0,2 mol.L⁻¹.

Já para o gel com maior grau de reticulação, preparado com razão mássica AH/DVS 1:1 e concentração de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, é necessário um tempo de agitação em torno de 40-50 minutos a 24.000 rpm para atingir a mesma faixa de diâmetro de partícula.

Sendo assim, através deste estudo ficou estabelecido um protocolo para a desintegração dos géis que permita a obtenção de diâmetros médios de partículas dentro da faixa requerida e com baixa polidispersidade, através de um procedimento rápido, simples e escalonável.

4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO

4.2.1. EFEITO DA RAZÃO MÁSSICA AH/ DVS

Neste item, são apresentados os principais resultados referentes ao efeito da razão mássica AH/DVS nas propriedades reológicas dos géis. A avaliação das propriedades reológicas foi realizada nos géis de AH reticulados com DVS nas seguintes razões mássicas AH/DVS: 1:5, 1:1, 2:1, 3:1 e 5:1, de acordo com item 3.1.6.1.

A razão AH/DVS na mistura reacional é um parâmetro que pode ser convenientemente usado para controlar a razão de intumescimento e o grau de reticulação do gel de AH. Um aumento na razão AH/DVS resulta em um gel “*soft*” altamente intumescido (razão de intumescimento de aproximadamente 4000), entretanto, géis duros e menos intumescidos, são obtidos quando esta razão é diminuída. Em geral, a razão AH/DVS pode ser de 15:1 até 1:5 (Balazs & Leshchiner, 1986).

As imagens dos géis de AH reticulados com as razões mássicas AH/DVS estudadas estão apresentadas na Figura 4.7.

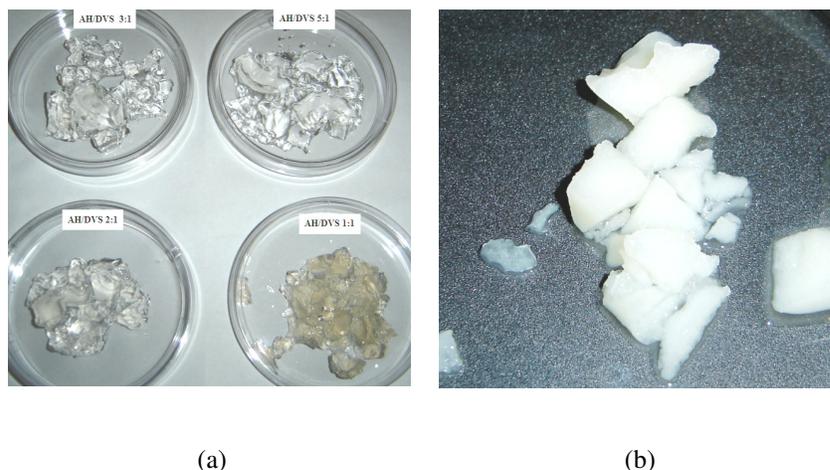


Figura 4.7. Géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS. (a) AH/DVS 1:1, 2:1, 3:1 e 5:1. (b) AH/DVS 1:5.

A diminuição da razão mássica AH/DVS forneceu géis mais duros e com maior opacidade devido ao menor grau de intumescimento causado pelo aumento do grau de reticulação.

As propriedades físico-químicas dos géis de AH com diferentes razões mássicas AH/DVS preparados neste item estão mostradas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Propriedades físico-químicas dos géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl] = 3g/100g e [NaOH]= 0,1 mol.L⁻¹).

Razão Mássica AH/DVS	1:5	1:1	2:1	3:1	5:1
Razão Molar AH/DVS*	0,06	0,32	0,64	0,96	1,60
Aspecto	quebradiço	gelatinoso	gelatinoso	gelatinoso	gelatinoso
Coloração	branca opaco	amarelada translúcida	transparente	transparente	transparente
Grau de Reticulação Teórico (%)*	772,0	154,5	77,3	51,5	30,9
Grau de Reticulação Real (%)**	421	90	39	26	14
Diâmetro Médio de Partícula (µm)	59 ± 2	83,5 ± 0,6	88 ± 1	88 ± 2	85 ± 1

* Valores calculados a partir da massa molar do dissacarídeo de AH (MM=365 g.mol⁻¹).

** Valores obtidos indiretamente por ICP através dos teores de enxofre nas águas de lavagem.

Nesta etapa, os tamanhos médios das partículas dos géis foram padronizados no intervalo entre 75 e 100 μm , de acordo com Leshchiner e colaboradores (2007).

Esta faixa de diâmetro médio de partículas foi selecionada, pois géis de AH reticulados aplicados como viscosuplementos devem possuir tamanhos de partículas suficientemente pequenos para serem injetados facilmente através de agulhas de diâmetro apropriado. Visando a redução de efeitos colaterais indesejáveis, tais como dor, hematoma, hemorragia e edema, agulhas de pequeno calibre (27 Gauge e 30 Gauge) são normalmente empregadas. Sendo assim, as partículas de gel devem ser adequadamente dimensionadas para serem capazes de passar através dessas finas agulhas com uma força de extrusão aceitável (Kablik, 2008).

Não foi possível padronizar o tamanho médio das partículas do gel de AH/DVS reticulado com razão mássica 1:5 devido a sua consistência “quebradiça”. A consistência quebradiça do gel preparado nestas condições pode ser atribuída à baixa densidade de intumescimento decorrente do alto grau de modificação deste gel.

4.2.1.1. CONCENTRAÇÃO DE AH

A concentração de AH é um dos principais parâmetros que influencia o tempo de residência e a efetividade dos géis usados como viscosuplementos.

A concentração total de AH destes produtos consiste do AH presente na fase gel (insolúvel) e na fase fluida (solúvel). Muitos fabricantes utilizam uma fase fluida para facilitar a aplicação do produto. A fase fluida solúvel consiste de AH não reticulado e, portanto, é facilmente metabolizada e não contribui para a efetividade e a duração do produto no sítio de aplicação. Somente o AH reticulado, gel, resiste à degradação enzimática e por radicais, contribuindo na efetividade do produto.

Os teores totais de AH nos géis reticulados com DVS foram determinados através do método espectrofotométrico do Carbazol modificado e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.2.

A concentração teórica de AH foi calculada através da massa de AH colocada em cada reação de reticulação:

$$[AH]_{teórica} = massa_{AH} (mg) / massa_{gel\ intumescido} (g)$$

Equação (9)

Tabela 4.2. Teores de AH encontrados nos géis reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl]= 3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L⁻¹).

Razão AH/DVS	Concentração total de AH (mg AH/g gel)	Concentração teórica de AH (mg AH/g gel)
1:5	25 ± 4	60,9
1:1	14 ± 2	18,8
2:1	7,7 ± 0,6	12,4
3:1	5,2 ± 0,4	9,3
5:1	3,0 ± 0,1	7,0

Baseado nas diferenças entre os resultados de AH obtidos pelo método do Carbazol e os resultados teóricos, foram analisados os teores de AH também nas águas de lavagem (Tabela 4.3) para o fechamento do balanço mássico.

Tabela 4.3. Balanço mássico da reação de reticulação com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl]= 3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L⁻¹).

Razão AH/DVS	m _{AH} adicionado na reação (mg)	m _{AH} do gel (mg)	m _{AH} das águas de lavagem (mg)	m _{AH} recuperado* (mg)	Recuperação de AH (%)
1:5	94,1	42,1855	33,0040	75,1895	80
1:1	310,4	236,1956	4,9143	241,1099	78
2:1	163,9	100,8018	21,0454	121,8472	74
3:1	162,0	90,4394	22,6112	113,0506	70
5:1	164,2	70,6338	31,2610	101,8948	62

* m_{AH} recuperado = m_{AH} do gel + m_{AH} das águas de lavagem

Embora o valor de recuperação da amostra preparada com a razão AH/DVS 1:5 tenha sido maior (80%) que as demais, observou-se que grande parte do AH ficou nas águas de lavagem. As águas de lavagem provenientes deste gel apresentaram coloração esbranquiçada e partículas em suspensão justificando a presença da grande quantidade de AH encontrada.

Os rendimentos das reações de reticulação (Tabela 4.4) foram calculados a partir das massas de AH provenientes dos resultados das análises de Carbazol nas amostras de géis, segundo a *Equação (10)*.

$$\frac{\text{Rendimento da Reação de Reticulação (\%)}}{\text{Rendimento da Reação de Reticulação (\%)}} = \frac{m_{AH \text{ gel}}}{m_{AH \text{ adicionado na reação}}} \times 100$$

Equação (10)

Onde *mAH gel* é a massa de AH (mg) obtida pelo método do Carbazol.

Tabela 4.4. Rendimentos das reações de reticulação realizadas com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl]= 3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L⁻¹).

Razão AH/DVS	Rendimentos da reação de reticulação (%)
1:5	44,8
1:1	76,1
2:1	61,5
3:1	55,8
5:1	43,0

Exceto no gel preparado com razão mássica AH/DVS 1:5, onde o gel mesmo reticulado ficou na água de lavagem, o rendimento da reação de reticulação diminui com o aumento da razão mássica AH/DVS, sugerindo que as razões mássicas estudadas não correspondem às razões estequiométricas da reação de reticulação. Além disso, segundo Leshchiner e colaboradores (2007), quanto mais baixa a concentração inicial do polímero (ICP), mais alta será a quantidade de DVS necessária para formação do gel. Em soluções diluídas, as cadeias poliméricas são separadas por longas distâncias e a interação entre as moléculas do polímero é mínima dificultando a entrada do agente reticulante. Há uma tendência de que apenas um dos grupamentos vinílicos do DVS reaja com o polímero e forme grupos pendentes, ou que o DVS seja hidrolisado e não participe da reação de reticulação. Portanto, o uso de grandes quantidades de agente reticulante com soluções de baixa ICP é desejável (Leshchiner *et al.*, 2007). No caso dos géis preparados neste trabalho, foi utilizada uma concentração inicial de AH (ICP_{AH}) padronizada em 3% que é próxima do limite inferior (2%) indicado por Balazs e Leshchiner (1986), justificando a necessidade de maiores quantidades de agente reticulante para efetividade da reação de reticulação.

4.2.1.2. TEOR DE PROTEÍNAS

Segundo Melander e Tømmeraas (2008), há diversos métodos disponíveis para determinação da quantidade total de proteínas em uma amostra e há várias publicações onde estes métodos são comparados. Os métodos de Lowry, BCA e Coomassie Blue (Bradford) são alguns dos métodos mais comuns. A maioria dos métodos são frequentemente baseados na reação entre um diferente resíduo *amino* das proteínas com um reagente colorimétrico específico. Entretanto, muitos destes métodos são também sensíveis a outros componentes da amostra tais como ácidos nucleicos, lipídios, açúcares, entre outros. Além disso, muitos métodos têm uma faixa linear limitada, baixa precisão e baixa reprodutibilidade. Adicionalmente, o BSA (albumina de soro bovino) que é o padrão de referência frequentemente utilizado, nem sempre é representativo para as proteínas presentes na amostra analisada. Devido à influência dos interferentes presentes na amostra alguns desses métodos fornecem resultados superestimados ou até mesmo errados. Sendo assim, a escolha do método apropriado para determinação dos teores de proteína de uma amostra deve ser abordada com cuidado, levando em consideração os principais componentes da mesma (Melander & Tømmeraas, 2008).

Neste estudo, as análises dos teores de proteínas totais do AH usado como matéria-prima foram realizadas pelo método espectrofotométrico de Coomassie Blue (Bradford, 1976) baseado nos resultados apresentados no trabalho de Melander e Tømmeraas (2008) que indicam este método como mais adequado para a análise de proteínas em AH.

O AH usado para preparação dos géis com razões mássicas 1:1, 2:1, 3:1 e 5:1 apresentou um teor de proteína igual a 0,44% (g/100g), enquanto que o AH usado na preparação do gel AH/DVS 1:5 apresentou um teor de proteína de 2,40% (g/100g). As diferenças na pureza do AH e, conseqüentemente, nos teores de proteínas decorrem das diferentes condições nutricionais e de cultivo empregadas na fermentação.

Não foi possível a determinação dos teores de proteínas totais pelo método de Bradford nos géis preparados neste trabalho devido à insolubilidade dos mesmos em água.

Sendo o teor de proteínas de géis utilizados como viscosuplementos um parâmetro importante, pois as proteínas oriundas dos processos de extração ou fermentação são as principais

responsáveis por reações adversas tais como alergias, foi utilizado o método de Lowry (1951) para as análises dos géis de AH conforme indicado pela literatura (Balazs *et al.*, 1987).

Na Tabela 4.5 são apresentados os teores de proteínas dos géis de AH obtidos pelo método de Lowry (1951).

Tabela 4.5. Teores de proteínas dos géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS ([AH] e [NaCl] = 3g/100g e [NaOH]= 0,1 mol.L⁻¹).

AH/DVS	Teor de Proteína (µg de proteína/g gel)
1:1	308 ± 13
2:1	293 ± 5
3:1	139 ± 8
5:1	64 ± 6

Não foi possível medir a concentração de proteínas no gel preparado com razão mássica AH/DVS 1:5 por problemas na amostragem devido novamente à consistência quebradiça do material.

Os teores de proteínas encontrados nos géis preparados neste trabalho estão dentro dos teores de proteínas (0,4 - 0,8% em massa) encontrados para outros viscosuplementos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e disponíveis no mercado (Balazs *et al.*, 1991).

4.2.1.3. RAZÃO DE INTUMESCIMENTO

Géis de AH reticulados quimicamente são capazes de absorver enormes quantidades de água e de solução salina. A capacidade de intumescimento dos géis de AH varia de produto para produto e é dependente da concentração, densidade de reticulação, e processo usado para hidratação do gel (Kablik, 2009).

Medidas de intumescimento são muito importantes, pois o carácter da água em um gel pode determinar a permeação de nutrientes e de produtos celulares (Hoffman, 2002).

As razões de intumescimento do polímero (RI_{AH}) e do gel (Q), bem como o conteúdo de água no equilíbrio (W_i), calculadas pelas *Equações (3), (4) e (5)*, respectivamente, estão apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Efeito das razões mássicas AH/DVS no intumescimento dos géis ([AH] e [NaCl]= 3g/100g, [NaOH]=0,1 mol.L⁻¹).

Razões Mássicas AH/DVS	Razão de Intumescimento (RI _{AH})	Razão de Intumescimento (Q)	Conteúdo de Água no Equilíbrio (%)
1:5	33 ± 1	7,0 ± 0,5	83 ± 3
1:1	62,1 ± 0,1	23,6 ± 0,9	95,8 ± 0,2
2:1	127,3 ± 0,2	38 ± 2	97,4 ± 0,1
3:1	189,0 ± 0,1	52 ± 2	98,07 ± 0,07
5:1	325,5 ± 0,1	73 ± 2	98,62 ± 0,04

De acordo com Zawko e colaboradores (2009), a razão de intumescimento de géis de AH alcança seu máximo de intumescimento em água. Entretanto, os géis preparados neste item foram intumescidos em solução salina e em solução tampão de fosfato salino (PBS) porque estas condições se aproximam das condições fisiológicas e são requeridas para géis utilizados como viscosuplementos (Zawko *et al.*, 2009).

A Figura 4.8 apresenta o comportamento de intumescimento de géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS.

Os resultados obtidos mostraram que a razão de intumescimento (Q) dos géis de AH diminui quando a razão mássica AH/DVS diminui, sugerindo aumento dos níveis de reticulação. O aumento do grau de reticulação diminui a disponibilidade dos grupos funcionais que interagem com a água através de pontes de hidrogênio, diminuindo assim o grau de intumescimento.

Os valores de intumescimento do polímero RI_{AH} obtidos para as amostras de gel estudadas mostraram que o AH presente nos géis consegue reter quantidades de água de até 300 vezes sua massa, e que novamente este parâmetro depende do grau de reticulação.

Os resultados do conteúdo de água total no equilíbrio mostraram que mais que 80% do gel é constituído de água e que os valores também aumentam com decréscimo da concentração de reticulante.

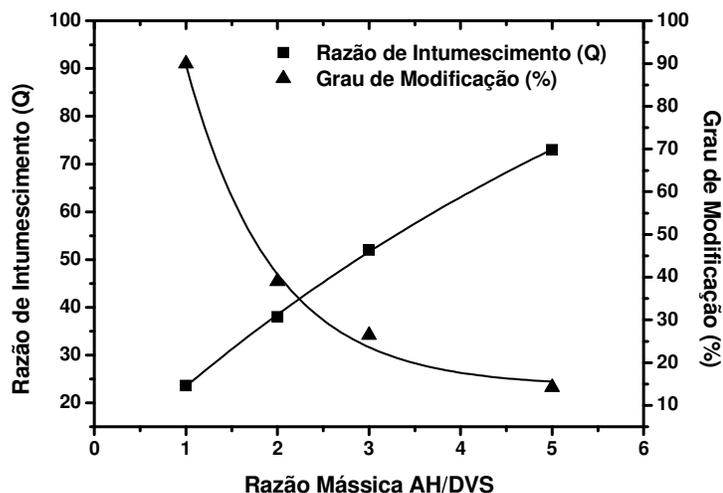
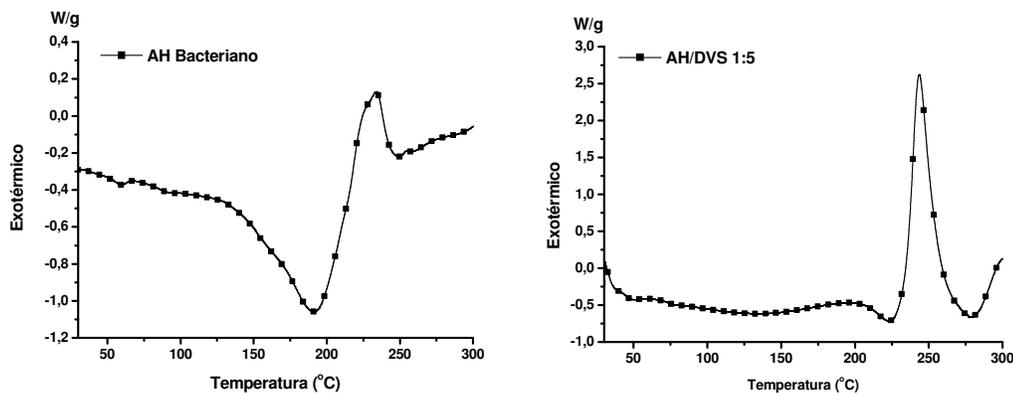


Figura 4.8. Razão de Intumescimento (Q) e grau de modificação de géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS (Concentração de AH na solução de partida 3% (g/100g), 25°C, 4 horas).

4.2.1.4. PERFIL TÉRMICO

O comportamento térmico das amostras de géis preparados neste item foi investigado por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Os termogramas para os géis de AH reticulados covalentemente com diferentes razões mássicas AH/DVS estão apresentados na Figura 4.9. As temperaturas dos picos mais importantes estão detalhadas na Tabela 4.7.



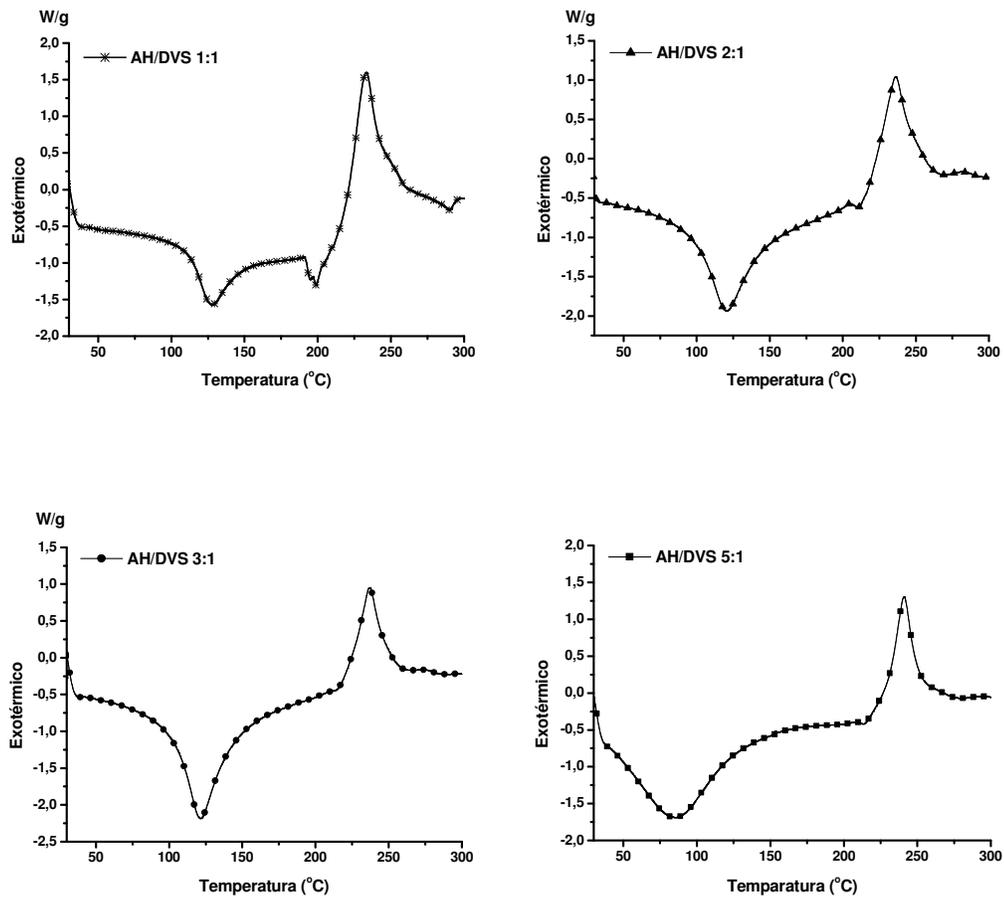


Figura 4.9. Termogramas dos géis de AH com diferentes razões mássicas AH/DVS .

Tabela 4.7. Informações de DSC de géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS após secagem a 25°C.

Razões Mássicas AH/DVS	Pico endotérmico (°C)	Temperatura de degradação (°C)
AH	-	233,14
1:5	-	244,35
1:1	129,08	234,46
2:1	121,9	237,5
3:1	121,87	238,04
5:1	85,96	242,12

Exceto para a amostra de gel preparada com razão mássica AH/DVS 1:5 que apresentou razão de intumescimento muito baixa, as demais amostras apresentaram um pico endotérmico largo em torno de 130°C associado à perda da umidade residual após o procedimento de secagem.

A ausência do pico endotérmico para a amostra com razão mássica AH/DVS 1:5 reflete sua menor retenção de água durante o período de secagem atribuída a um maior emaranhamento e compactação das cadeias devido ao maior grau de reticulação deste gel.

Além disso, foram observados picos exotérmicos em torno de 230°C atribuídos à decomposição dos géis (Collins & Birkshaw, 2007).

O perfil dos termogramas mostrou que após a reticulação do AH, os picos endotérmicos e exotérmicos são deslocados em relação aos picos do AH, indicando alterações em sua estrutura.

Os termogramas do AH Bacteriano produzido no LDPB com 70% de pureza e do AH usado no trabalho descrito por Barbucci e colaboradores (2000) estão apresentados na Figura 4.10.

Nos dois termogramas apresentados, observa-se um pico em 234°C referente ao pico de decomposição do AH, entretanto no AH Bacteriano produzido no LDPB observa-se uma queda da linha base atribuída ao histórico térmico da amostra e/ou a presença de impurezas presentes no AH avaliado.

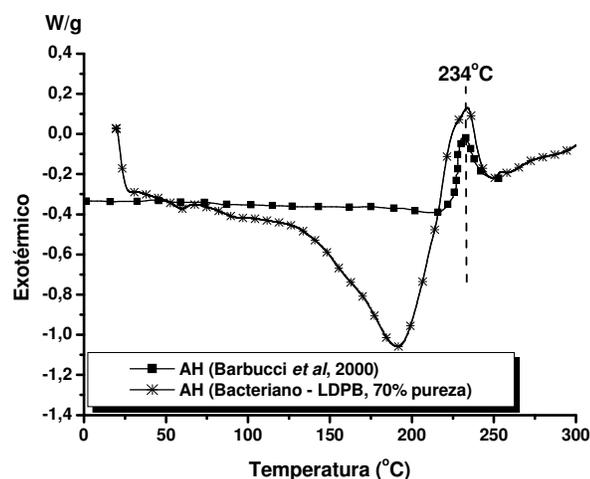


Figura 4.10. Termogramas do AH Bacteriano (LDPB) usado neste trabalho para a preparação dos géis e do AH usado por Barbucci e colaboradores (2000).

De acordo com Collins e Birkshaw (2007), através de análises térmicas de DSC é possível quantificar os três tipos de água normalmente encontrados em géis reticulados: *água ligada* (W_b), *água livre* (W_f) e *água de congelamento* (W_{fb}).

Quando um gel “zero” (sem água) é intumescido, as primeiras moléculas de água interagem fortemente com as cadeias do polímero resultando nas águas chamadas “águas ligadas”. Posterior intumescimento da rede polimérica ocorre como resultado da forças dirigentes da pressão osmótica devido à tendência de hidratação da rede hidrofílica na direção da diluição infinita. Este intumescimento é contraposto por forças retrativas da rede reticulada tridimensionalmente. Quando as duas forças se igualam, o processo de intumescimento para e o conteúdo de água no equilíbrio (“água total”) é alcançado.

O DSC é a técnica que permite a determinação quantitativa da “água livre” no gel intumescido. Este método é baseado na hipótese que somente a “água livre” do gel intumescido pode congelar, e que o pico endotérmico medido em torno de 0°C representa a fusão somente da “água livre” cristalizada (Collins & Birkshaw, 2007).

A Figura 4.11 apresenta os termogramas dos hidrogéis de AH completamente intumescidos em PBS.

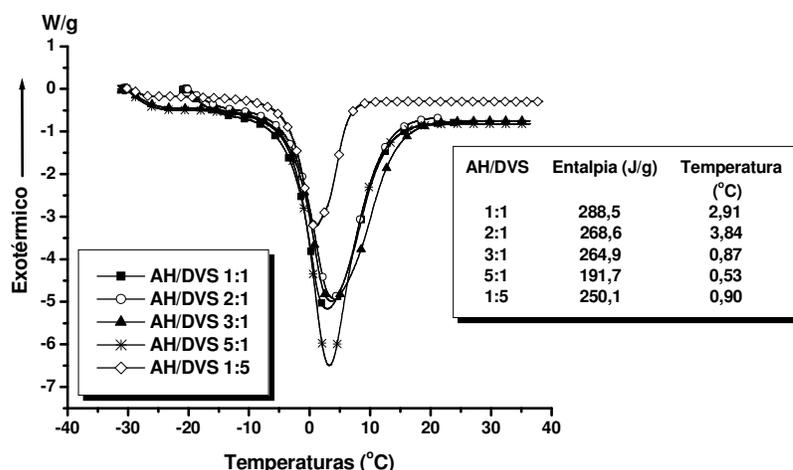


Figura 4.11. Termogramas dos géis de AH intumescidos preparados com diferentes razões mássicas AH/DVS.

A temperatura máxima dos picos endotérmicos dos géis intumescidos variou entre 0,5 e 3,8°C. A fração de “água livre” foi calculada como a razão da área do pico endotérmico do gel intumescido e o calor de fusão para a água pura (-334 J/g) conforme descrito por Mansor e Malcolm (1994). A água ligada foi expressa como a diferença entre a “água total” e a “água livre” (Equação 6).

Os valores do conteúdo de água no equilíbrio e de águas livres e ligadas estão apresentados na Tabela 4.8:

Tabela 4.8 - Conteúdo de água dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de DVS.

Razão Mássica AH/DVS	Conteúdo de Água no Equilíbrio (W_e) (%)	Água Ligada (W_b) (%)	Água Livre ($W_f + W_{fb}$) (%)
1:5	83,46	8,57	74,88
1:1	95,75	9,37	86,37
2:1	97,38	16,96	80,42
3:1	98,07	18,76	79,31
5:1	98,62	41,22	57,39

Os géis com menores razões mássicas AH/DVS apresentaram menores valores de “água total” e de “água ligada” indicando uma estrutura mais compacta e, portanto, com maior densidade de reticulação a qual diminui a disponibilidade dos grupos funcionais para formação das ligações de hidrogênio com as moléculas de água.

4.2.1.5. CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

A maioria dos géis de AH utilizados nas áreas médica e cosmética são viscoelásticos, contendo um componente elástico (sólido) e um viscoso (líquido) que podem ser avaliados usando testes dinâmicos. O módulo elástico G' é mais frequentemente usado para caracterizar a dureza do gel, uma vez que este parâmetro descreve a interação entre a elasticidade e a força. Sendo assim, a determinação de G' fornece um método quantitativo para caracterizar a dureza ou a “softness” do gel (Kablik, 2009)

Para avaliar o efeito da razão mássica AH/DVS nas propriedades reológicas dos géis de AH reticulados quimicamente com DVS, foram caracterizadas as propriedades do fluido em

regime permanente e em regime oscilatório.

Todas as medidas reológicas foram realizadas nos géis intumescidos em PBS com tamanhos médios de partículas da ordem de 75-100 μm .

A Figura 4.12 apresenta os módulos elásticos e viscosos plotados em função da frequência.

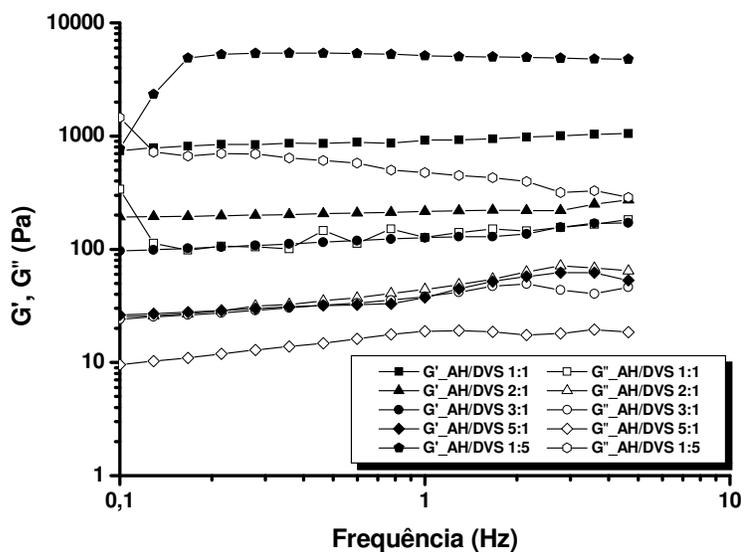


Figura 4.12. Espectro de oscilação dos géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS ($[\text{AH}]$ e $[\text{NaCl}] = 3\%$ (g/100g), $[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C , 4 horas).

De acordo com Kablik (2009), o grau de reticulação desempenha um importante papel na definição dos módulos de um gel. Um gel com um menor número de ligações covalentes (reticulação) apresenta moléculas de AH com maior comprimento entre as ligações, requerendo assim, menor força para deformar o gel (Gel “*Soft*”).

O aumento do grau de reticulação torna a rede mais emaranhada, as ligações mais apertadas e, portanto, o gel mais “*Firm*” (Figura 4.13) (Kablik, 2009).

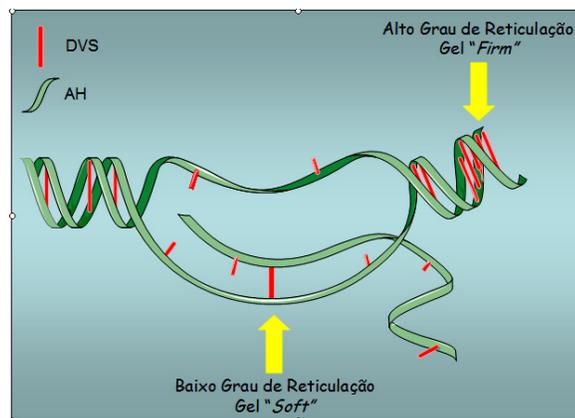


Figura 4.13. Cadeias de AH com diferentes graus de reticulação (Adaptado de Kablik *et al.*, 2009).

O espectro de oscilação dos géis de AH reticulados com diferentes razões mássicas AH/DVS (Figura 4.12) mostrou um pronunciado aumento do módulo G' com a diminuição da razão mássica AH/DVS, sugerindo maior densidade de reticulação. Estes resultados também estão de acordo com os resultados de razão de intumescimento apresentados anteriormente.

Os géis de AH preparados neste item exibiram espectros mecânicos típicos de géis onde os módulo elásticos G' são maiores que os módulos viscosos G'' em toda a faixa de frequência estudada, e as curvas são paralelas ao eixo de frequência pois os módulos dos géis são quase independentes da frequência.

A Figura 4.12 mostrou que G' e G'' aumentaram muito suavemente com a frequência na faixa de frequência estudada.

De acordo com Xuejun e colaboradores (2004), comportamento similar tem sido observado para muitos géis biológicos. Este comportamento demonstra um aumento da elasticidade dos géis em função da estabilização da rede. A forte reticulação covalente reduz a mobilidade intrínseca das cadeias e aumenta o tempo de relaxação característico do movimento. Conseqüentemente, as cadeias do polímero não liberam o *stress* durante o período de oscilação e mostram um comportamento elástico (Xuejun *et al.*, 2004).

Informações de G' e G'' plotados em função da frequência de oscilação (ω em $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) podem fornecer importantes informações sobre a estrutura do gel. O grau de dependência da

freqüência pode ser determinado pelos parâmetros da “Lei de Potência” descrita por Ramkumar e Bhattacharya (1996) apresentada na *Equação (2)*, item 2.4.

Os parâmetros da “Lei de Potência” (A e B) são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Constantes da “Lei de Potência” para a relação entre o módulo de estocagem e a freqüência para os géis reticulados de AH ($G' = A \omega^B$).

AH/DVS	A (Pas)	B (inclinação)
1:5	4470,9	0,04
1:1	794,5	0,08
2:1	192,3	0,07
3:1	99,2	0,15
5:1	24,9	0,24
Synvisc®*	88,9	0,15

*Mensitieri *et al.*, 1994, Hoefling *et al.*, 2002.

Os valores de B estão relacionados à força e a natureza do gel. É conhecido que para um gel covalente, $B = 0$, enquanto que para um gel físico, $B > 0$ (Khondkar *et al.*, 2007).

Os valores de B indicaram um aumento nas propriedades viscoelásticas para os géis com a diminuição da razão mássica AH/DVS. Além disso, os valores de B foram pequenos sugerindo géis covalentes (Khondkar *et al.*, 2007).

De acordo com Ikeda e Nishinari (2001), o espectro mecânico de géis fracos são um pouco diferentes dos espectros de géis convencionais em dois aspectos: os módulos G' e G'' são levemente dependentes da freqüência, e a diferença entre a magnitude de G' e de G'' é frequentemente menor que 10 vezes ($G'/G'' < 10$). Géis fracos tem G' maior que G'' com os módulos quase paralelos entre si. Géis fortes também tem G' maior que G'' entretanto G' tem uma inclinação de 0 e G'' mostra um mínimo em freqüências intermediárias (Clark & Ross-Murphy, 1987 in Ikeda & Nishinari, 2001).

A Tabela 4.10 apresenta os valores de $\tan \delta (=G''/G')$, que são as medidas das contribuições relativas dos componentes viscosos nas propriedades mecânicas do material.

A frequência de 4,6 Hz foi estabelecida de acordo com a frequência (5 Hz) apresentada por Leshchiner e colaboradores (2007) e devido à faixa de frequência fisiológica dos joelhos durante a corrida (3 Hz) (Barbucci *et al.*, 2002).

Tabela 4.10. Valores de $\tan \delta$ (em 4,6 Hz) para os géis de AH preparados nesta etapa do trabalho (Concentração de AH e NaCl na solução de partida 3% (g/100g), concentração de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, 25°C, 4 horas).

AH/DVS	$\tan \delta$
1:5	0,09
1:1	0,17
2:1	0,24
3:1	0,27
5:1	0,34
Fluido Sinovial	0,39
<i>Synvisc</i> ®*	0,20

*Mensitieri *et al*, 1994, Hoefling *et al*, 2002.

Géis convencionais apresentam comportamento predominantemente elástico apresentando valores de $\tan \delta < 0,1$. Entretanto, uma dependência entre os módulos e a frequência, acompanhada por valores de $\tan \delta > 0,1$, são características típicas de géis chamados géis fracos (Ikeda & Nishinari, 2001).

Os valores de $\tan \delta$ e as inclinações das curvas de G' dos géis preparados neste item mostraram um aumento da força dos géis com a diminuição da razão mássica AH/DVS.

Embora a maioria dos géis preparados neste item do trabalho ainda seja chamada de géis fracos ($B \neq 0$ and $\tan \delta > 0,1$), eles são mais fortes que o fluido sinovial e o produto comercial *Synvisc*®, sugerindo melhores propriedades viscoelásticas.

No caso do gel preparado com razão mássica AH/DVS 1:5 obteve-se um gel convencional com valores de $\tan \delta < 0,1$ (0,093) e $B \approx 0$ (0,039), sugerindo alta densidade de reticulação.

Como mostrado na Figura 4.14, os valores de $\log G'$ em 4,6 Hz obtidos para os géis de AH preparados neste item decrescem linearmente com o aumento do \log da razão mássica AH/DVS.

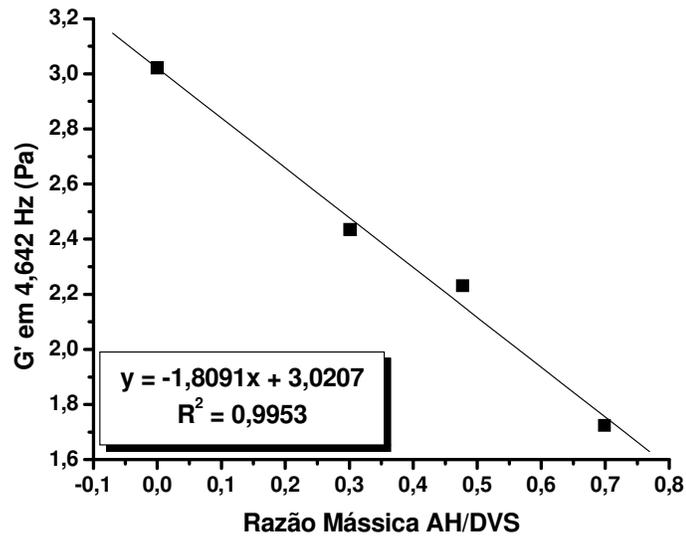


Figura 4.14. Módulo de estocagem (G') em função da razão mássica AH/DVS.

O valor de G' do gel preparado com razão mássica AH/DVS 1:5 não foi plotado devido às diferenças em suas características estruturais e reológicas (gel convencional).

A inclinação de $\log G'$ versus \log da razão mássica AH/DVS foi 1,81, próximo ao valor 2 frequentemente observado como inclinação das curvas log-log de G' versus concentração de biopolímeros com um grande número de potenciais sítios de ligação ao longo de cada cadeia (isto é, com alta funcionalidade) (Xu *et al.*, 2006). Este comportamento sugere emaranhamento das cadeias, bem como interações intra- e intermoleculares, conforme esperado (Bozzi *et al.*, 1996).

As curvas de fluxo dos géis de AH reticulados mostraram características não-Newtoniana pseudoplástica (Figura 4.15), com um significativo decréscimo da viscosidade em uma larga faixa de taxa de cisalhamento (“*shear thinning*”).

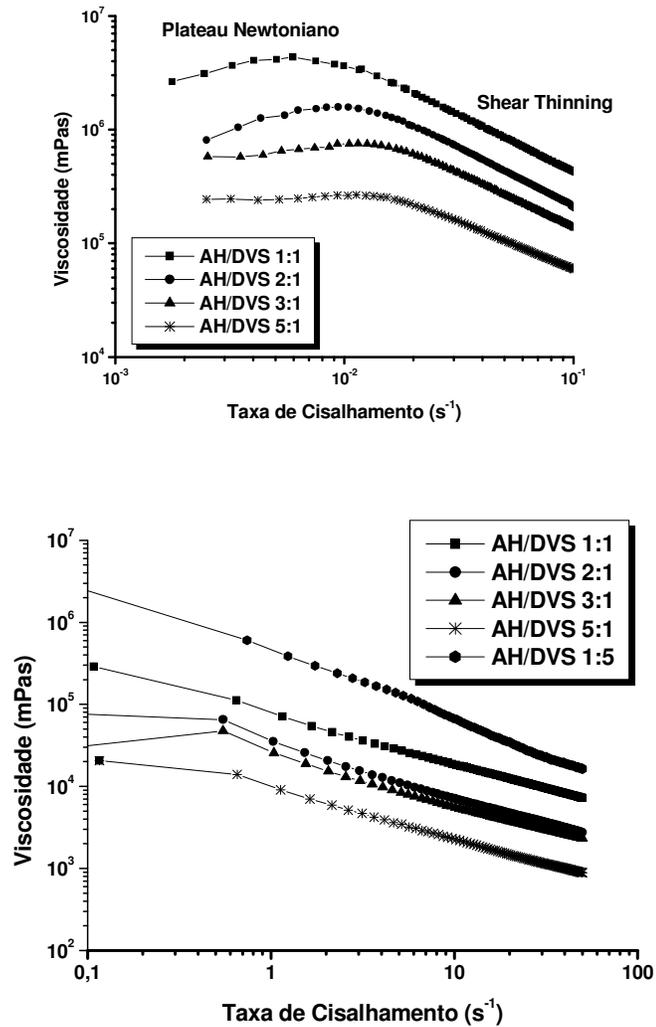


Figura 4.15. Curvas de fluxo dos géis de AH com diferentes razões mássicas AH/DVS.

Considerando a “Lei de Potência” descrita por Ostwald de Waele (*Equação 11*), os parâmetros K e n podem ser determinados. K é o índice de consistência do fluido e n é o índice de comportamento de fluxo.

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$$

Equação (11)

De acordo com os valores de n , tem-se que as inclinações das curvas de fluxo foram constantes até a razão mássica 5:1 e, portanto, mostraram um comportamento viscoelástico independente da razão mássica AH/DVS (Tabela 4.11).

Já na razão mássica AH/DVS 1:5 observou-se uma maior inclinação da curva de fluxo com um valor de n igual a 0,09. O valor mais baixo de n indica um comportamento pseudoplástico mais pronunciado para este gel em relação aos demais géis preparados neste item.

Tabela 4.11. Parâmetros determinados nas curvas de fluxo dos géis de AH reticulados com DVS.

AH/DVS	K (Pa.s ^{n})	n
1:1	70958	0,42
2:1	29478	0,39
3:1	21178	0,43
5:1	9019	0,40
1:5	538641	0,09

De qualquer forma, foi observado um aumento da viscosidade com o decréscimo da razão mássica AH/DVS nas curvas de fluxo, o que pode ser atribuído a um aumento do grau de reticulação e conseqüentemente um aumento do emaranhamento.

Através do detalhe da Figura 4.15 que mostra o “Plateau Newtoniano”, observa-se que a taxa de cisalhamento crítica (γ_c) que corresponde à transição do comportamento Newtoniano para viscoelástico, desloca-se para valores menores com a diminuição da razão mássica AH/DVS, isto é, com o aumento do grau de reticulação. Segundo Xu e colaboradores (2006), soluções poliméricas apresentam comportamento similar com o aumento da concentração de polímero, indicando aumento das interações inter- e intracadeias.

Análises reológicas também foram realizadas para comparar as propriedades mecânicas dos géis e de soluções de AH.

A Figura 4.16 apresenta o espectro dinâmico-mecânico de uma solução de AH 3% (massa/volume) e do gel de AH reticulado (AH/DVS 1:1) na faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz.

De acordo com Leshchiner e colaboradores (2007), para soluções poliméricas, ambos os módulos G' e G'' são funções lineares da frequência e são dependentes de sua estrutura. Neste caso, ambos G' e G'' aumentam com o aumento da frequência, mas um aumenta mais rapidamente que o outro. No ponto onde $G'=G''$, a frequência é denominada frequência cruzada ou “*cross-over*” (f_c). A frequência cruzada diminui com a massa molar ou com a concentração

crescente do polímero. Para uma solução polimérica, em baixas frequências, as tensões elásticas relaxam e as tensões viscosas dominam, e como resultado, G'' é maior que G' em frequências abaixo de f_c . Em contraste, para um gel, não há cruzamento entre G' e G'' , e G' é maior do que G'' em toda a faixa de frequência (Leshchiner *et al*, 2007).

A solução de AH estudada apresentou um comportamento predominantemente viscoso, com $G'' > G'$ até f_c (Figura 4.16), na faixa de frequência estudada. Por outro lado, para o gel, não foi observado “*cross-over*” entre G' e G'' , e G' foi maior que G'' em toda faixa de frequência estudada.

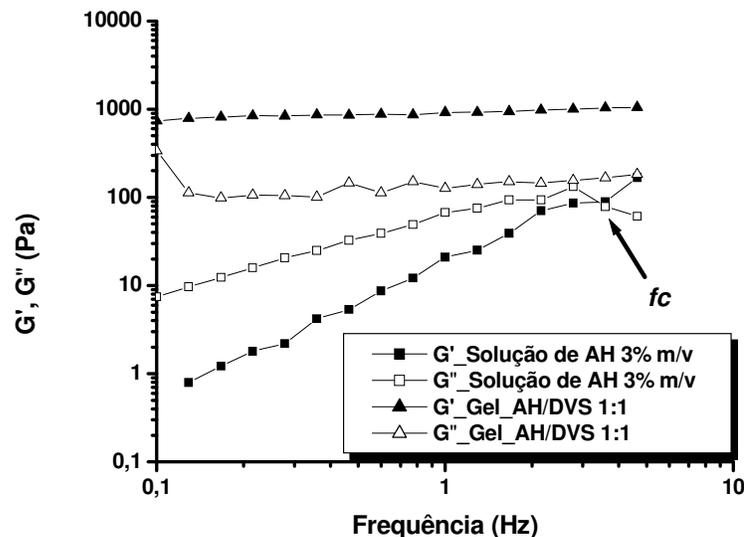


Figura 4.16. Espectro de oscilação da solução de AH 3% (massa/volume) e do gel de AH reticulado (AH/DVS 1:1).

Em soluções muito diluídas (acima da faixa de concentração apropriada para a determinação da viscosidade intrínseca), a viscosidade do biopolímero é essencialmente independente da taxa de cisalhamento (Comportamento Newtoniano). Com posterior aumento na concentração (c) ou do nível de reticulação, entretanto, a viscosidade (η) começa a mostrar apreciável dependência da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). Em baixas taxas de cisalhamento, η permanece constante em um valor fixo máximo (“*zero shear viscosity*”, η_0), mas em taxas de cisalhamento mais altas o “*shear thinning*” é observado.

Neste trabalho, a curva de fluxo da solução de AH (3%) mostrou um comportamento Newtoniano a baixas taxas de cisalhamento observadas pelo “Plateau Newtoniano”, mas uma

característica não-Newtoniana pseudoplástica com “*shear thinning*” a altas taxas de cisalhamento, como visto na Figura 4.17.

Entretanto, a curva de fluxo do gel de AH (AH/DVS 1:1) mostrou um comportamento pseudoplástico com um forte “*shear thinning*” em toda faixa de frequência estudada.

Os valores de n para a solução de AH e para o gel reticulado foram 0,58 e 0,42, respectivamente; e os valores de K foram 29758 e 70958 Pa.sⁿ.

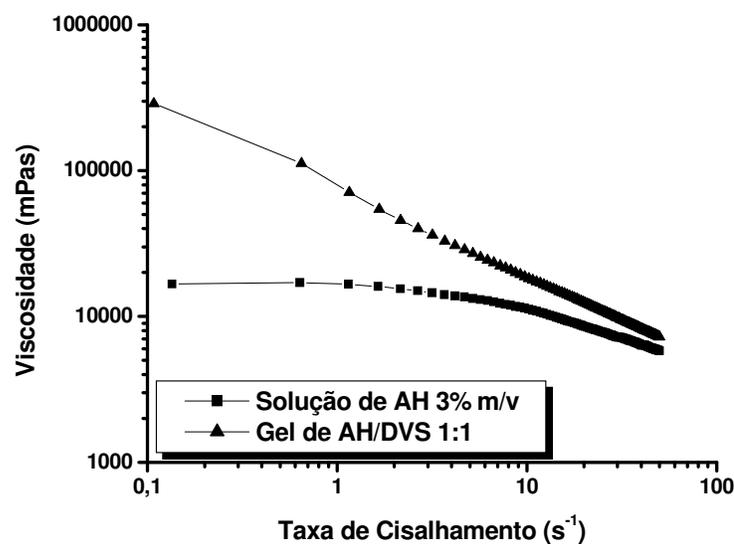


Figura 4.17. Comparação entre as curvas de fluxo da solução de AH 3% (m/v) e do gel de AH reticulado (AH/DVS 1:1).

4.2.1.6. GRAU DE MODIFICAÇÃO

A avaliação do grau de modificação do polímero é um importante parâmetro de caracterização dos géis de AH. É definido como a soma entre a porcentagem de polímero reticulado e a porcentagem de grupos pendentes, uma vez que nem todos os sítios de ligação de agentes reticulantes bi- e poli-funcionais reagem necessariamente com os pontos de ligação das cadeias do polímero (Kablik, 2009). Algumas vezes o agente reticulante liga somente uma ponta de sua molécula à cadeia de AH, deixando o outro lado pendente.

O grau de modificação pode ter um efeito significante nas propriedades dos materiais,

principalmente dos preenchedores dérmicos e viscosuplementos.

Quando a densidade de reticulação de um gel aumenta, a distância entre os segmentos reticulados torna-se menor, ocorrendo assim, um aumento no emaranhamento da rede. Esse emaranhamento, por sua vez, resulta no aumento da dureza e da força do gel. Porém, quando um gel apresenta vários grupos pendentes, uma baixa densidade de reticulação é obtida, resultando em géis “*soft*” (Kablik, 2009).

Sendo assim, neste trabalho foi medido o grau de modificação do AH com DVS. A Tabela 4.12 apresenta os graus de modificação obtidos por Espectrometria de Emissão por Plasma e calculados de acordo com item 3.1.6.9.

Tabela 4.12. Graus de modificação “*teóricos*” e “*reais*” dos géis de AH preparados com diferentes razões mássicas AH/DVS.

AH/DVS	Grau de modificação teórico (%)	Grau de modificação “ <i>Real</i> ” (%)
1:1	154,5*	90,0
2:1	77,3	39,0
3:1	51,5	26,4
5:1	30,9	14,2
1:5	772,0*	420,6

**excesso*

Os valores de grau de modificação mostraram que a diminuição da razão mássica AH/DVS aumenta o grau de modificação como esperado, atingindo um valor de modificação de 90% dos sítios de ligação na razão mássica AH/DVS 1:1. Por outro lado, com a razão mássica AH/DVS 5:1 apenas 14% dos sítios de ligação foram modificados, provavelmente devido à baixa ICP (concentração inicial do polímero) utilizada.

A razão mássica AH/DVS 1:5 não pode ser avaliada adequadamente, pois parte do gel ficou na água de lavagem.

Em relação ao grau de modificação teórico, calculado através da estequiometria da reação e da quantidade de DVS adicionado em cada gel, observa-se que apenas em torno de 50% do agente reticulante modifica efetivamente o polímero. O restante foi eliminado nas águas de

lavagem.

4.2.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH

Neste item, são apresentados os principais resultados referentes ao efeito da concentração de NaOH ou do pH da mistura reacional nas propriedades reológicas dos géis. A avaliação das propriedades reológicas foi realizada nos géis de AH reticulados com DVS com as seguintes concentrações de NaOH: 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 e 1 mol.L⁻¹.

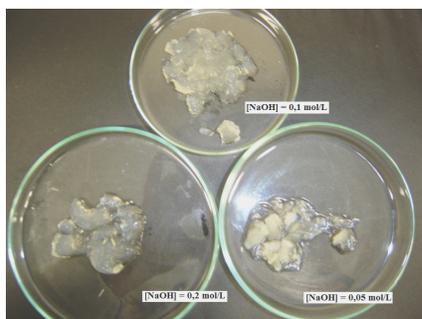
A concentração de álcali na mistura reacional também é um parâmetro que pode ser convenientemente usado para controlar a razão de intumescimento e o grau de reticulação do gel de AH.

Segundo Balazs e Leshchiner (1986), a concentração de álcali na mistura reacional pode variar entre 0,005 e 0,5 mol.L⁻¹ sendo que concentração mínima de álcali é ditada pela necessidade de um pH ($\text{pH} \geq 9$) que disponibilize os grupos -OH com formação do alcóxido. Já a concentração máxima de NaOH deve evitar a hidrólise do AH em solução alcalina com conseqüente diminuição da massa molar na etapa de dissolução do polímero (Balazs & Leshchiner, 1986).

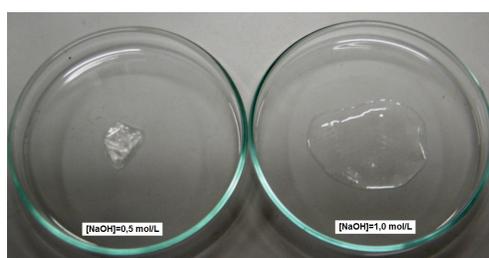
Realmente, de acordo com o mecanismo da reação de reticulação apresentado na Figura 2.8 do item 2.2.4.1-A, o pH, e portanto a concentração de NaOH da mistura reacional, influencia a disponibilização dos grupos hidroxílicos do AH para posterior reação com o agente reticulante. Além disso, segundo Cowman e Matsuoka (2005) a alta viscosidade de soluções de AH decresce drasticamente em soluções fortemente alcalinas também afetando a reação de reticulação.

A Figura 4.18 apresenta as imagens dos géis de AH reticulados com as diferentes concentrações de NaOH estudadas.

A diminuição da concentração de NaOH forneceu géis mais duros e com maior opacidade devido ao menor grau de intumescimento causado pelo aumento do grau de reticulação.



(a)



(b)

Figura 4.18. Géis de AH reticulados com DVS com diferentes concentrações de NaOH (a) 0,05, 0,1 e 0,2 mol.L⁻¹ e (b) 0,5 e 1 mol.L⁻¹ ([AH] e [NaCl]=3% e AH/DVS 1:1).

As propriedades dos géis de AH reticulados com DVS com diferentes concentrações de NaOH preparados nesta etapa estão mostradas na Tabela 4.13.

Tabela 4.13. Propriedades físico-químicas de géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (0,05, 0,1, 0,2, 0,5 e 1 mol.L⁻¹).

[NaOH] (mol.L ⁻¹)	0,05	0,1	0,2	0,5	1
Aspecto	gelatinoso	gelatinoso	gelatinoso	gelatinoso	gelatinoso
Coloração	branca opaca	amarelada translúcida	transparente	transparente	transparente
[AH] (mg AH/g gel)	20 ± 1	14 ± 2	14 ± 1	3 ± 0,5	2,3 ± 0,3
Diâmetro Médio de Partícula (µm)	93 ± 1	83,5 ± 0,6	86 ± 1	NA	NA

NA=não analisado.

Nesta etapa do trabalho, os géis foram preparados com a razão mássica AH/DVS de 1:1.

Os tamanhos médios das partículas dos géis foram padronizados no intervalo entre 75 e 100 μm exceto para os géis preparados com concentrações de NaOH de 0,5 e 1 mol.L^{-1} que após a desintegração em ultra-turrax mesmo a 10.000 rpm por 1-2 minutos foram totalmente solubilizados não sendo possível a determinação dos diâmetros médios das partículas e da realização das demais análises. Estes géis após as etapas de lavagem também apresentaram aspecto gelatinoso e transparente, entretanto apresentaram consistência bastante *soft*.

4.2.2.1. RAZÃO DE INTUMESCIMENTO

A Tabela 4.14 apresenta as razões de intumescimento do polímero (RI_{AH}) e do gel (Q), bem como o conteúdo de água no equilíbrio, calculadas pelas *Equações (3), (4) e (5)*, respectivamente.

Tabela 4.14. Efeito da concentração de NaOH no intumescimento dos géis.

[NaOH] (mol.L^{-1})	Razão de Intumescimento (RI_{AH})	Razão de Intumescimento (Q)	Conteúdo de Água no Equilíbrio (%)
0,05	$47,59 \pm 0,06$	$20,8 \pm 0,5$	$95,2 \pm 0,1$
0,1	$62,1 \pm 0,1$	$23,6 \pm 0,9$	$95,8 \pm 0,2$
0,2	$69,0 \pm 0,2$	29 ± 2	$96,6 \pm 0,2$
0,5	$325,5 \pm 0,7$	42 ± 4	$97,6 \pm 0,2$
1	$429,9 \pm 0,2$	64 ± 1	$98,43 \pm 0,04$

A Figura 4.19 apresenta o comportamento de intumescimento de géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH.

Os resultados obtidos mostraram que a razão de intumescimento (Q) dos géis de AH aumenta quando a concentração de NaOH aumenta sugerindo diminuição dos níveis de reticulação.

Também neste caso, o gel é constituído por mais de 90% de água e o AH presente nestes géis consegue reter quantidades de água de até 400 vezes sua massa.

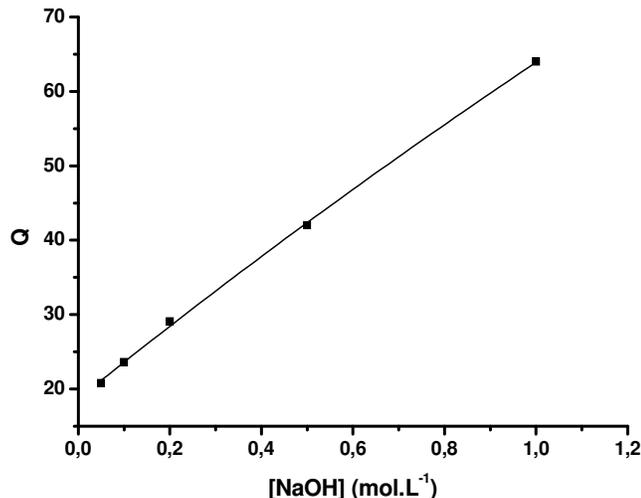


Figura 4.19. Razão de Intumescimento (Q) de géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (Concentração de AH na solução de partida 3% (g/100g), 25°C, 4 horas, AH/DVS 1:1).

4.2.2.2. PERFIL TÉRMICO

O comportamento térmico das amostras dos géis preparados neste item foi investigado por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Foram somente avaliadas as amostras de géis que puderam ser desintegradas.

Os termogramas para os géis de AH reticulados com DVS em diferentes concentrações de NaOH (0,05, 0,1 e 0,2 mol.L⁻¹) estão apresentados na Figura 4.20. As temperaturas dos picos mais importantes estão detalhadas na Tabela 4.15.

As amostras apresentaram um pico endotérmico de aproximadamente 130°C associado à perda da umidade residual após o procedimento de secagem. Não foi possível a determinação precisa da temperatura da amostra de gel preparada com concentração de NaOH igual a 0,05 mol.L⁻¹ que apresentou um pico largo endotérmico.

Além disso, foram observados significantes picos exotérmicos de aproximadamente 230°C atribuídos à decomposição dos géis (Collins & Birkshaw, 2007).

O perfil dos termogramas também mostrou que após a reticulação do AH, os picos

endotérmicos e exotérmicos são deslocados em relação aos picos do AH (Figura 4.10), indicando alterações em sua estrutura.

A temperatura máxima dos picos endotérmicos dos géis intumescidos variou entre 0,9 e 1,6 °C. A fração de “água livre” foi calculada como a razão da área do pico endotérmico do gel intumescido e o calor de fusão para a água pura (-334 J/g) conforme descrito por Mansor e Malcolm (1994). A água ligada foi expressa como a diferença entre a “água total” e a “água livre” (Equação 6).

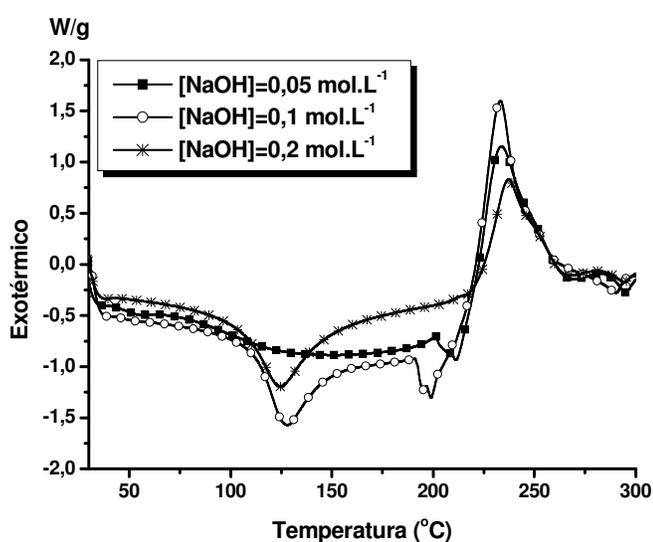


Figura 4.20. Termogramas dos géis de AH preparados com diferentes concentrações de NaOH (0,05, 0,1 e 0,2 mol.L⁻¹) (AH/DVS 1:1).

Tabela 4.15. Informações de DSC de géis de AH preparados com diferentes concentrações de NaOH, após secagem a 25°C.

[NaOH] (mol.L ⁻¹)	Pico endotérmico (°C)	Temperatura de degradação (°C)
0,05	-	235,05
0,1	129,08	234,46
0,2	126,35	238,70

Os valores do Conteúdo de Água no Equilíbrio e de águas livres e ligadas estão apresentados na Tabela 4.16:

Tabela 4.16. Conteúdo de água dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1).

[NaOH] (mol.L ⁻¹)	Entalpias (J/g)	Temperaturas (°C)	Conteúdo de Água no Equilíbrio (W ₀) (%)	Água Ligada (W _b) (%)	Água Livre (W _f + W _{fb}) (%)
0,05	305,7	1,58	95,19	3,66	91,53
0,1	288,5	1,91	95,75	9,37	86,38
0,2	281,4	0,42	96,55	12,30	84,25

Os géis preparados com menores concentrações de NaOH apresentaram menores valores de “água total” e de “água ligada” indicando uma estrutura mais compacta e, portanto, com maior densidade de reticulação e menor grau de intumescimento. Além disso, uma maior densidade de reticulação diminui a possibilidade de formação das ligações de hidrogênio com as moléculas de água, como mencionado anteriormente.

4.2.2.3. CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

Para avaliar o efeito da concentração de NaOH da mistura reacional na reação de reticulação foram caracterizadas as propriedades do fluido em regime permanente e em regime oscilatório. Foram avaliados somente os géis com diâmetros médios de partículas entre 75-100 µm. Todas as medidas reológicas foram realizadas nos géis intumescidos em PBS.

Os módulos elásticos e viscosos plotados em função da frequência estão apresentados na Figura 4.21.

Com o aumento da concentração de NaOH era esperado um aumento do grau de reticulação devido a maior disponibilização dos grupos –OH e maior conjugação com DVS.

Porém, o espectro de oscilação dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH, isto é em diferentes pH (Figura 4.21), mostrou um decréscimo do módulo G' com o aumento da concentração de NaOH, sugerindo menor densidade de reticulação. Estes resultados também estão de acordo com os resultados de razão de intumescimento apresentados anteriormente.

Sendo assim, foi verificada a influência do pH na viscosidade da mistura reacional ([AH]=3% (g/100g) e [NaCl]=3% (g/100g)) (Figura 4.22) e na massa molar média do polímero (Figura 4.23).

Os resultados mostraram uma diminuição brusca da viscosidade na faixa de pH estudada.

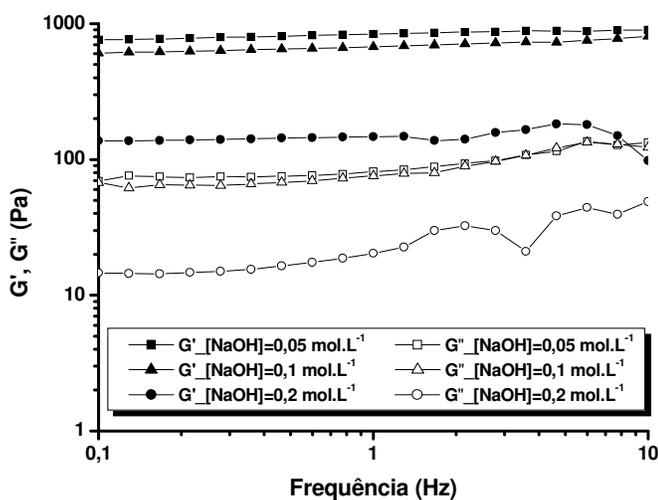


Figura 4.21. Espectro de oscilação dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH ([AH] e [NaCl]=3g/100g, AH/DVS 1:1).

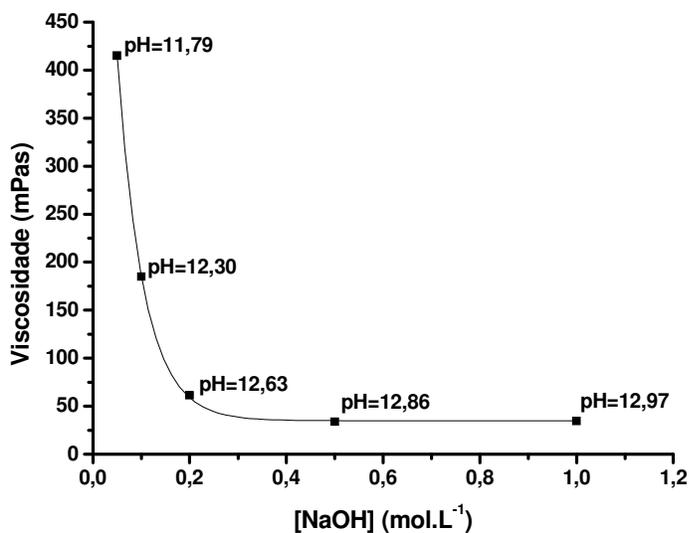


Figura 4.22. Viscosidade da mistura reacional em função da concentração de NaOH.

De acordo com Cowman e Matsuoka (2005), a adição de álcali altera a conformação da molécula de AH através da ruptura de algumas das ligações de hidrogênio, fazendo com que a molécula de AH fique mais contraída. Como resultado, a viscosidade é drasticamente reduzida.

Sob estas condições, o raio de giro e o segundo coeficiente virial também decrescem (Cowman & Matsuoka, 2005).

Segundo Gatej e colaboradores (2005), o decréscimo da viscosidade com o aumento do pH ocorre lentamente até pH 11,58 seguido por uma transição brusca em pH 12 o qual corresponde ao pK dos grupos $-OH$. Esta transição foi previamente descrita por Gosh e colaboradores (1993) que demonstraram um decréscimo do raio de giro das moléculas de AH sem qualquer alteração da massa molar média com a progressiva adição de NaOH.

Esta mudança na conformação da molécula pode justificar o menor grau de reticulação com maiores concentrações de álcali. A contração da molécula de AH dificultaria a entrada do agente reticulante nos pontos de ligação química através de impedimento estérico.

Outra hipótese seria o decréscimo da massa molar média por hidrólise alcalina do AH.

Para investigar o mecanismo envolvido no decréscimo da viscosidade em função do pH, as massas molares médias das misturas reacionais dissolvidas em diferentes concentrações de NaOH foram analisadas por SEC (Figura 4.23).

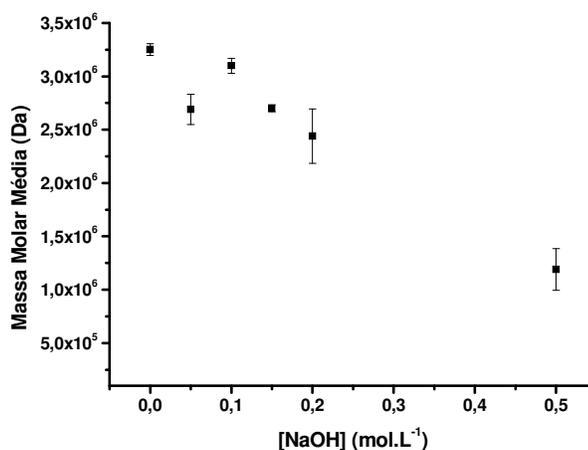


Figura 4.23. Massas molares médias das misturas reacionais em diferentes concentrações de NaOH (2 horas de dissolução).

Conforme mostrado na Figura 4.23, a distribuição de massa molar foi apenas ligeiramente modificada pela adição de NaOH até a concentração de 0,2 mol.L⁻¹ não justificando a diminuição

da viscosidade observada e sugerindo a diminuição do raio de giro da molécula para justificar o decréscimo da viscosidade e também do menor grau de reticulação. Entretanto, na concentração de NaOH igual a 0,5 mol.L⁻¹ observa-se um decréscimo da massa molar média de 63% justificando que, a partir desta concentração, há a formação de géis tão *soft* que se “solubilizam” durante o processo de desintegração. A massa molar média da solução de NaOH 1 mol.L⁻¹ não foi medida para evitar danos na coluna cromatográfica.

De qualquer modo, observou-se que uma variação mínima no pH da mistura reacional afeta drasticamente a viscosidade da solução e, conseqüentemente, as propriedades reológicas dos géis sendo portanto um parâmetro que deve ser controlado cuidadosamente.

Os géis de AH preparados neste item também exibiram espectros mecânicos típicos de géis onde os módulo elásticos G' são maiores que os módulos viscosos G'' em toda a faixa de freqüência estudada e as curvas são paralelas ao eixo de freqüência. A Figura 4.21 mostrou que G' e G'' aumentam muito suavemente com a freqüência na faixa estudada.

Os parâmetros da “Lei de Potência” ($G' = A \omega^B$) descrita por Ramkumar e Bhattacharya (1996) obtidos da curva log-log de G' versus ω estão apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17. Constantes da “Lei de Potência” para a relação entre o módulo de estocagem e a freqüência para géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1) ($G' = A \omega^B$).

[NaOH] (mol.L ⁻¹)	A (Pas)	B (inclinação)
0,05	774,6	0,041
0,1	617,3	0,052
0,2	136,3	0,057

Os valores de B indicaram um aumento nas propriedades viscoelásticas para os géis preparados com menores concentrações de NaOH. Além disso, os valores de B foram pequenos sugerindo géis covalentes (Khondkar *et al.*, 2007).

A Tabela 4.18 apresenta os valores de $\tan \delta (=G''/G')$ usados para classificar os géis em fracos e convencionais.

Tabela 4.18. Valores de $\tan \delta$ (em 4,6 Hz) para os géis de AH preparados com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1).

[NaOH] (mol.L ⁻¹)	$\tan \delta$
0,05	0,13
0,1	0,17
0,2	0,21

Os valores de $\tan \delta$ e as inclinações das curvas de G' dos géis preparados neste item mostraram um aumento da força dos géis com a diminuição da concentração de NaOH na mistura reacional, sugerindo maior entrelaçamento das cadeias ou maior densidade de reticulação. Os géis preparados neste item foram classificados como géis fracos ($B \neq 0$ and $\tan \delta > 0,1$).

As curvas de fluxo dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH também mostraram características não-Newtoniana pseudoplástica (Figura 4.24) com um significativo decréscimo da viscosidade em uma larga faixa de taxa de cisalhamento (“*shear thinning*”).

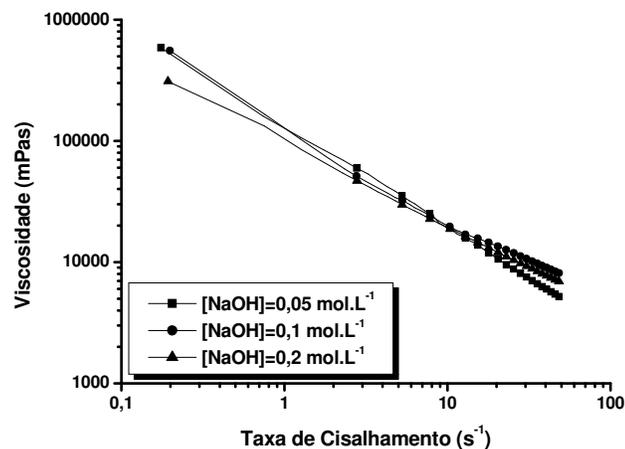


Figura 4.24. Viscosidade dos géis de AH com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1).

Os valores de K e n segundo a “Lei de Potência” descrita por Ostwald de Waele ($\eta = K \cdot \gamma^{n-1}$) estão apresentados na Tabela 4.19.

De acordo com os valores de n , tem-se que as inclinações das curvas de fluxo foram constantes nas concentrações de 0,1 e 0,2 mol.L⁻¹, portanto, mostraram um comportamento pseudoplástico semelhante (Tabela 4.19).

Já na concentração de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, observou-se uma maior inclinação da curva de fluxo com n igual a $0,15$ indicando um comportamento pseudoplástico mais pronunciado. Quanto menor o valor de n tem-se um comportamento pseudoplástico mais pronunciado, entretanto, quanto mais próximo de 1 , o comportamento fica mais próximo do comportamento Newtoniano.

Tabela 4.19. Parâmetros determinados nas curvas de fluxo dos géis de AH reticulados com diferentes concentrações de NaOH (AH/DVS 1:1).

[NaOH] (mol.L^{-1})	K (mPa.s^n)	n
0,05	137284	0,15
0,1	108807	0,31
0,2	95034	0,32

4.2.3. EFEITO DA RAZÃO MÁSSICA GEL/ FLUIDO

Visando promover maior conforto aos pacientes durante a aplicação, géis de AH usados como viscosuplementos são normalmente dispersos em uma fase fluida constituída de AH não reticulado. Sendo assim, este ensaio teve como objetivo verificar o efeito da adição de fase fluida nas propriedades reológicas da mistura gel/fluido.

Para isso, um gel de AH reticulado com DVS ($[\text{AH}]=3\%$ (g/100g), AH/DVS 1:1, $[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $D=75\text{-}100 \mu\text{m}$) foi misturado a uma solução aquosa de AH 1% (m/m) nas seguintes proporções gel/fluido (m/m): 80:20, 75:25, 70:30 e 60:40.

A Figura 4.25 apresenta as curvas de G' e G'' em função da frequência dos produtos com diferentes razões gel/fluido.

Através das curvas obtidas observou-se que com o aumento da porcentagem de fase fluida há uma diminuição dos módulos elásticos e viscosos. Sendo que na proporção de 60:40 (Figura 4.26), o produto perde sua característica de gel mostrando um perfil característico de fluido onde G'' é maior que G' até a frequência de *cross-over* (f_c).

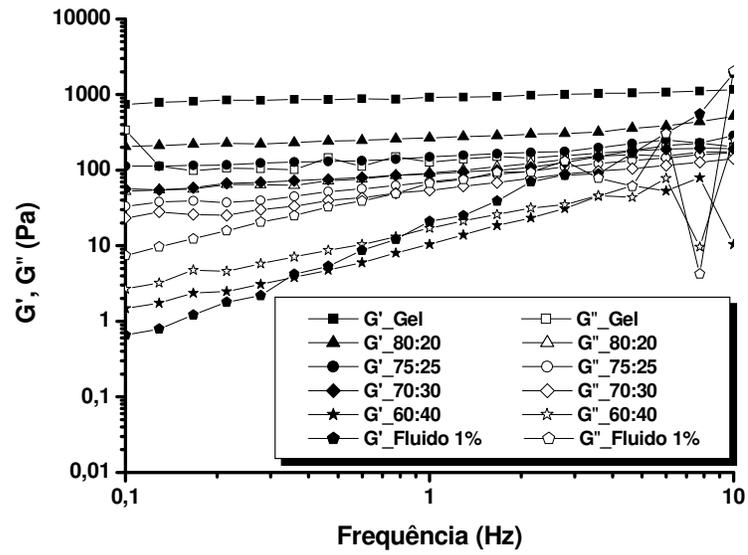


Figura 4.25. Espectro de oscilação de misturas gel/fluido com diferentes razões mássicas. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹, D=75-100 µm. Fluido: 1% (massa/volume).

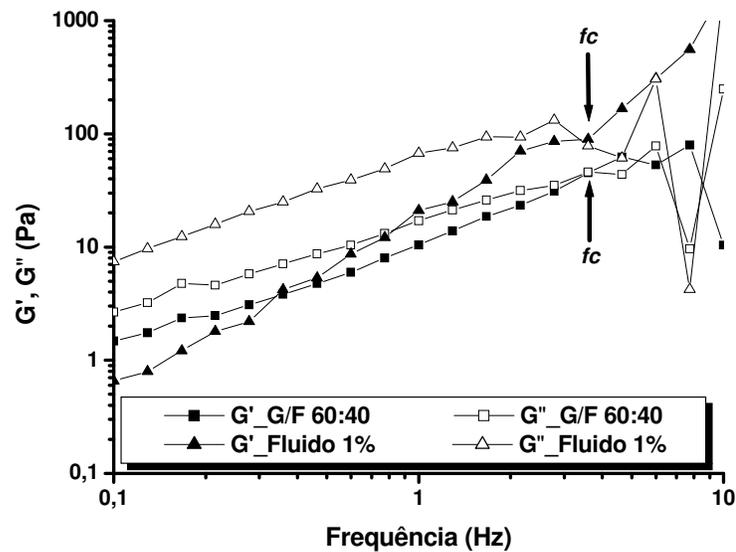


Figura 4.26. Espectro mecânico da mistura gel/fluido 60:40 e do fluido de AH 1%.

As curvas de fluxo para as diferentes misturas gel/fluido preparadas neste item estão apresentadas na Figura 4.27.

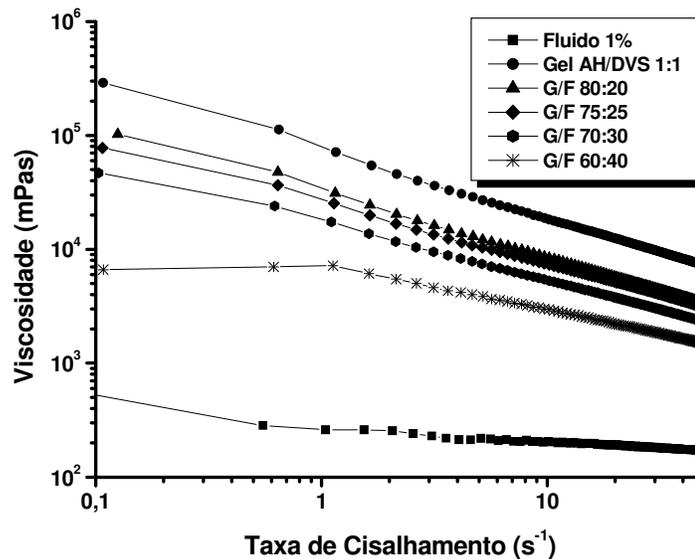


Figura 4.27. Curvas de fluxo das misturas gel/fluido. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹, D=75-100 μ m. Fluido: 1% (massa/volume).

As curvas de fluxo das misturas gel/fluido mostraram uma diminuição progressiva da viscosidade com o aumento da quantidade de fluido adicionado resultante da diluição do gel.

As curvas de fluxo da solução de AH e da mistura gel/fluido 60:40 mostraram um comportamento Newtoniano a baixas taxas de cisalhamento observadas pelo “Plateau Newtoniano”, mas uma característica não-Newtoniana pseudoplástica com um “*shear thinning*” a maiores taxas de cisalhamento, como visto na Figura 4.27.

Entretanto, as curvas de fluxo das misturas gel/fluido 80:20, 75:25 e 70:30 e do gel mostraram um comportamento pseudoplástico com um forte “*shear thinning*” em toda faixa de frequência estudada.

Considerando a “Lei de Potência” descrita por Ostwald de Waele ($\eta = K \cdot \gamma^{n-1}$), os valores dos parâmetros K e n são apresentados na Tabela 4.20.

Os valores de n obtidos para as misturas gel/fluido 80:20, 75:25, 70:30, 60:40 e para o gel puro, indicaram que o comportamento viscoelástico depende da razão mássica gel/fluido. O valor

de n igual a 0,85 para o fluido 1% indica comportamento próximo ao Newtoniano onde n é igual a 1.

Tabela 4.20. Parâmetros determinados nas curvas de fluxo das misturas gel/fluido. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹, D=75-100 µm.

	K (mPa.s ⁿ)	n
Fluido 1%	301	0,85
Gel/Fluido 60:40	6327	0,65
Gel/Fluido 70:30	17157	0,49
Gel/Fluido 75:25	25440	0,46
Gel/Fluido 80:20	32221	0,42
Gel AH/DVS 1:1	74362	0,40

Embora o aumento da porcentagem de fluido facilite a injeção do produto, este aumento pode ocasionar uma diminuição no tempo de residência do produto no sítio de aplicação já que o AH presente no fluido não é reticulado e é facilmente degradado pela *hyaluronidase* e por radicais livres. Sendo assim, deve haver um balanço entre a mistura gel/fluido que não influencie significativamente no tempo de residência do produto.

Além da caracterização das propriedades reológicas dos produtos, foram também avaliadas as forças de extrusão do gel ([AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹, D=75-100 µm), do fluido (1%) e das misturas gel/fluido.

As forças necessárias para a extrusão das misturas preparadas neste item por uma seringa equipada com uma agulha de 30G½ estão apresentadas na Figura 4.28.

Os resultados de força de extrusão mostraram que a adição de uma fase fluida reduz em até 70% a força de extrusão, facilitando assim a aplicação do produto e não comprometendo as propriedades reológicas do produto.

Embora não tenha ocorrido grande variação das forças de extrusão encontradas para as razões mássica gel/fluido 80:20, 75:25 e 70:30, a queda da força de extrusão para a razão mássica gel/fluido 60:40 concorda com os resultados dos testes reológicos que indicou um

comportamento de fluido para esta mistura.

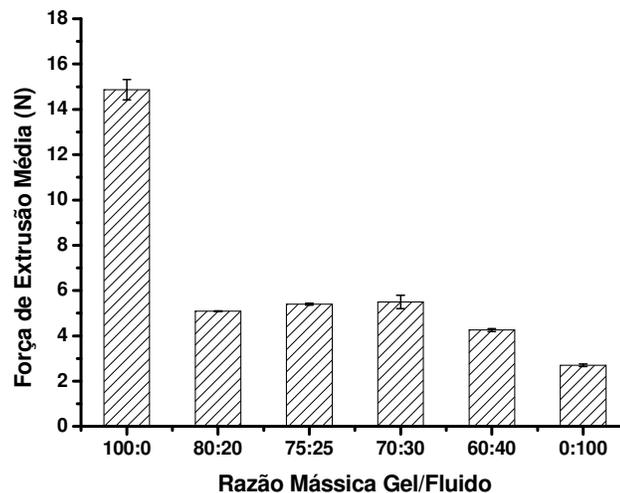


Figura 4.28. Força de Extrusão das misturas gel/fluido. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH]=0,1 mol.L⁻¹, D=75-100 µm. Fluido: [AH]=1% (massa/volume).

4.2.4. EFEITO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS

Visando verificar o efeito do diâmetro médio das partículas nas propriedades reológicas dos géis; o gel de AH preparado com a razão mássica AH/DVS 1:1 foi submetido a diferentes tempos de cisalhamento em Ultra-turrax a 24.000 rpm para obtenção de diferentes tamanhos de partículas.

A Figura 4.29 apresenta a influência do diâmetro médio das partículas no espectro de oscilação dos géis.

As curvas de oscilação obtidas mostraram que o diâmetro médio das partículas afeta as propriedades reológicas dos géis. Observou-se que com a diminuição do diâmetro médio há uma diminuição nos módulos elásticos dos géis. Este comportamento está de acordo com os resultados apresentados por Sadozai e colaboradores (2005). Estes autores avaliaram o efeito do diâmetro médio das partículas nas propriedades reológicas de géis de AH reticulados com carbodiimidas, desintegrados em moinho criogênico e fracionados pelo diâmetro médio através de peneiras. O módulo de estocagem G' foi medido após intumescimento e esterilização de cada fração (Sadozai *et al.*, 2005).

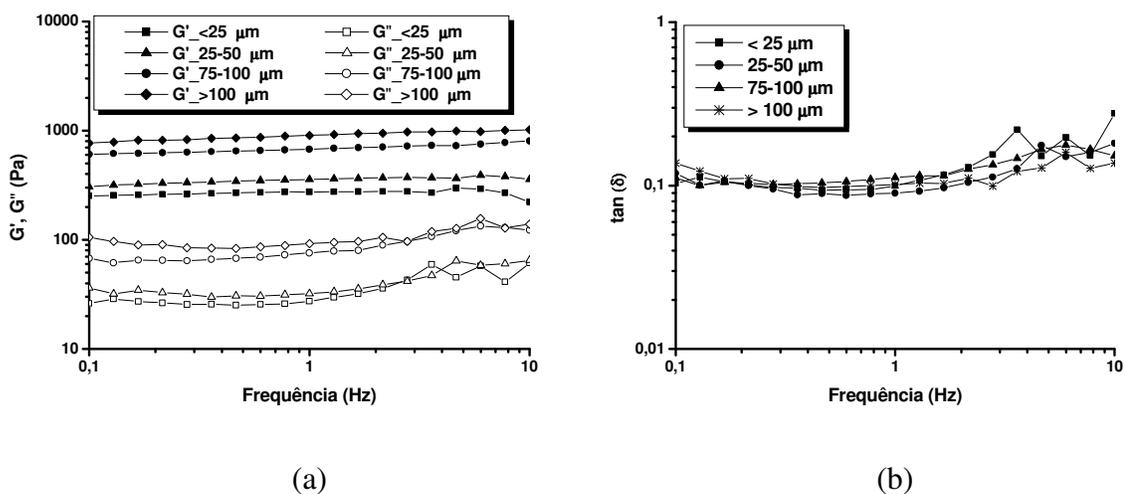


Figura 4.29. (a) Espectro de oscilação de géis de AH com diferentes tamanhos de partículas. (b) Ângulo de fase em função da frequência para géis com diferentes tamanhos de partículas. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹.

A diminuição do módulo de estocagem (G') com a diminuição do tamanho das partículas foi atribuída à maior rigidez do sistema. Partículas pequenas apresentam um menor conteúdo de água interna e, conseqüentemente, uma maior rigidez em relação a partículas maiores. Além disso, de acordo com Gauthier-Manuel e colaboradores (1987), géis com menores tamanhos apresentam um maior contato entre as partículas levando a uma maior rigidez específica do sistema atribuída a formação de uma cadeia rígida entre elas (“estrutura fibrilar”). Sendo assim, este sistema não é capaz de estocar grandes quantidades de energia sem se romper, apresentando valores de G' mais baixos.

Já, através das curvas de $\tan \delta$ em função da frequência observou-se que a resposta do material não se torna mais elástica nem mais viscosa com a alteração do tamanho da partícula e, portanto, a variação do tamanho das partículas não afeta de forma significativa a viscoelasticidade do sistema para a faixa de tamanho estudada.

As curvas de viscosidade complexa (η^*) versus frequência de oscilação (ω) e de viscosidade aparente (η) versus taxa de cisalhamento (γ) para os diferentes tamanhos de partículas estão apresentadas na Figura 4.30.

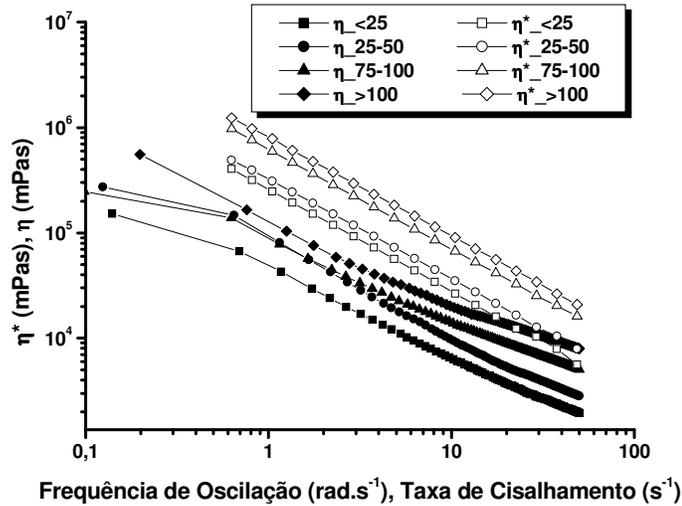


Figura 4.30. Viscosidade complexa (η^*) versus freqüência de oscilação e viscosidade aparente (η) versus taxa de cisalhamento de géis com diferentes tamanhos de partículas. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹.

As curvas apresentadas na Figura 4.30 indicaram dependência de η^* versus ω e de η versus γ com o tamanho das partículas. Na faixa de freqüência estudada, tanto a viscosidade complexa quanto a viscosidade aparente aumentam com o aumento dos tamanhos das partículas.

As curvas de viscosidade dos géis com diferentes tamanhos de partículas foram avaliadas quanto à regra de Cox e Merz (1958) uma vez que elas não se sobrepõem. Estes autores propuseram uma correlação empírica entre viscosidade complexa dinâmica (η^*) como função da freqüência de oscilação (ω) e viscosidade aparente (η) como função da taxa de cisalhamento (γ):

$$\eta^*(\omega) = \eta(\gamma) \text{ para } \omega = \gamma$$

(Regra de Cox-Merz)

Equação 12

Através desta relação, as propriedades de cisalhamento de um material podem ser previstas através de suas propriedades reológicas dinâmicas, sem alteração de sua estrutura durante as medidas com cisalhamento.

Segundo Miyoshi e Nishinari (1999), quando o espectro mecânico de um material exibe o perfil de um gel fraco, $\eta^*(\omega)$ é significativamente maior que $\eta(\gamma)$, indicando que a fraca estrutura

do gel pode sobreviver a uma pequena deformação oscilatória (rede intacta), mas pode ser rompida por grandes deformações (rede destruída durante a medida). Sendo assim, estes materiais tendem a desviar da regra Cox-Merz.

Além disso, a regra de Cox-Merz não é obedecida por biopolímeros com altas densidades de emaranhamento sem a aplicação de um fator de desvio (α). Sendo assim, a regra pode ser descrita como (Kim & Yoo, 2006):

$$\eta^*(\alpha \omega) = \eta(\gamma) \text{ para } \omega = \gamma$$

(Regra de Cox-Merz modificada)

Equação 13

Observou-se através das curvas apresentadas na Figura 4.30, que as magnitudes de η^* são maiores que as magnitudes de η com as curvas paralelas entre si como esperado, já que os géis preparados neste estudo são classificados como géis fracos. Este comportamento confirma a natureza de gel fraco dos materiais avaliados.

Portanto, pela multiplicação de ω da equação original de Cox-Merz por um fator de desvio (α), neste caso α igual a 0,8, as duas linhas se sobrepõem com um coeficiente de correlação (R^2) de aproximadamente 0,95. A partir desses resultados, concluiu-se que os géis preparados com os diferentes tamanhos de partículas seguem a regra modificada de Cox-Merz, com $\eta^*(\alpha\omega) = \eta(\gamma)$ sobrepostos principalmente a baixas taxas de cisalhamento e frequência.

A análise reológica de partículas em suspensão é uma função complexa de suas propriedades físicas e dos processos que ocorrem na escala das partículas. Os fatores mais importantes são a fração volumétrica das partículas (ϕ), a forma das partículas, as interações entre elas, seu arranjo espacial e a natureza do fluxo. Outros fatores que são importantes em certas suspensões, mas têm recebido menos atenção, são o tamanho, o perfil de distribuição de tamanhos e as forças inter-partículas. Os últimos são mais relevantes em sistemas coloidais e aquosos. Além destes, a formação de agregados e efeitos entrópicos de superfície podem também afetar o comportamento reológico do sistema.

A principal dificuldade em modelar o comportamento destas suspensões vem do fato de que o material é multiescala e contém muitos componentes que interagem. Dados experimentais

mostram que as propriedades globais reológicas de uma suspensão dependem não só da forma e do tamanho das partículas, mas também da interação entre as partículas (coloidais e não coloidais), da interação entre as partículas e o fluido (hidrodinâmica), das propriedades do fluido (Newtoniano ao não-Newtoniano) e do tipo de fluxo que a suspensão está sujeita (Chateau *et al.*, 2008)

Além disso, no caso de géis que são estruturas macroporosas, os tamanhos e as formas dos poros também podem influenciar diretamente seu comportamento reológico tornando a análise reológica com uma correlação matemática adequada neste caso, ainda mais complexa.

Devido à complexidade do sistema, não foi possível relacionar diretamente o tamanho das partículas com os resultados das análises reológicas, porém este estudo mostrou que é possível controlar as propriedades reológicas do material também através deste parâmetro.

4.2.5. EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO

Os ensaios descritos neste item tiveram por objetivo selecionar uma condição de esterilização que permita a estocagem do ácido hialurônico (AH) obtido por fermentação bacteriana no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP e de seus derivados reticulados com DVS, por longos períodos.

O efeito da esterilização nas propriedades estruturais do biopolímero foi avaliado através da determinação da massa molar média por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC).

O efeito da esterilização nas propriedades estruturais dos derivados de AH reticulados com DVS e das misturas gel de AH/fluido foi avaliado através de testes reológicos.

A eficácia do processo de esterilização nos derivados reticulados e nas misturas foi avaliada através de testes de plaqueamento para contagem de bactérias (mesófilos totais) e de bolores e leveduras.

4.2.5.1. EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO NO AH SÓLIDO (MATÉRIA-PRIMA)

Quando utilizado na área médica, o AH deve ser esterilizado. Um método comum para sua esterilização é o método de esterilização química. Este tipo de esterilização, no entanto, pode causar contaminação do AH, limitando potencialmente sua aplicação. Diferentemente da esterilização química, a esterilização por aquecimento a seco não resulta em contaminação química, porém o aquecimento a seco do AH causa redução da sua massa molar e variações na sua estrutura conformacional. Sendo assim, soluções de AH têm sido esterilizadas por calor úmido em autoclave. Este tipo de esterilização causa menor degradação do AH quando comparada a esterilização por aquecimento a seco, porém a diminuição da massa molar ainda é significativa e a aplicação do AH esterilizado por este processo ainda é limitada.

De acordo com Swann e colaboradores (1997), AH sólido pode ser esterilizado com vapor em autoclave. Além de não deixar contaminantes químicos, este método apresenta perda de massa molar substancialmente reduzida quando comparado ao aquecimento a seco do AH ou ao aquecimento em autoclave de soluções de AH. O tempo de exposição e a temperatura requerida deste método também são menores que os geralmente requeridos para esterilizar o AH sólido por aquecimento a seco (Swann *et al.*, 1997).

Como as propriedades viscoelásticas e estruturais de um polímero dependem (entre outras coisas) do comprimento da cadeia macromolecular, os efeitos da esterilização sobre a estabilidade química do AH foram verificados através de sua massa molar média durante diferentes períodos de tratamento térmico.

A Figura 4.31 apresenta os valores de massa molar média do AH sólido (70% de pureza) e de uma solução de AH 1% (massa/massa) obtidos por Cromatografia de Exclusão por Tamanho, sem tratamento térmico, e após esterilização em autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm²) por 2,5, 5, 10 e 15 minutos.

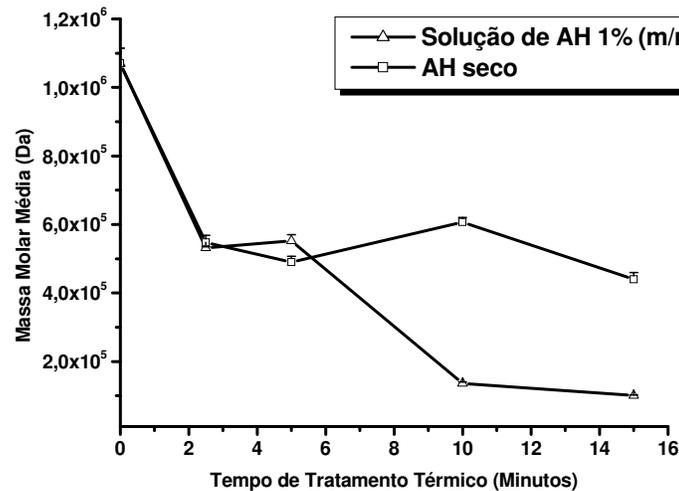


Figura 4.31. Massa molar média de AH bacteriano seco e de uma solução de AH 1% (m/m) submetido a diferentes tempos de tratamento térmico em autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm²).

Os resultados apresentados acima demonstraram que o AH sólido esterilizado em autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm²) sofre menor degradação que a solução de AH 1% quando esterilizada sob as mesmas condições em tempos superiores a 5 minutos.

Além disso, os resultados mostraram que o AH bacteriano seco utilizado neste estudo apresenta um decréscimo de massa molar média de 59% quando autoclavado por 15 minutos, discordando do estudo realizado por Swann que apresentou um decréscimo de apenas 12% quando o AH sólido foi submetido ao tratamento térmico nas mesmas condições deste estudo. A discordância entre os resultados obtidos foi atribuída à umidade residual do AH usado neste estudo proveniente de diferenças dos processos de secagem ou a presença de impurezas no AH (70%) que podem comprometer o processo de esterilização favorecendo sua despolimerização ou degradação.

Mesmo assim, a diminuição de massa molar média observada para o AH sólido não é significativa para a aplicação pretendida em relação às diferenças de massas molares médias obtidas no processo de produção e de purificação do AH bacteriano obtido por fermentação (variações de massa molar média entre 10⁵ e 10⁶ Da). Essas diferenças de massa molar média e de pureza do AH normalmente decorrem das diferentes condições nutricionais e de cultivo empregadas na fermentação.

Observou-se também através dos resultados obtidos que com 2,5 minutos de tratamento na temperatura avaliada, tanto para o AH sólido como para a solução de AH 1%, houve um decréscimo de quase 50% de massa molar média que se mantém constante até 5 minutos de tratamento. Após 5 minutos observa-se um decréscimo brusco na massa molar média da solução de AH 1% (87% de decréscimo) enquanto que a massa molar média do AH sólido se mantém estável até 15 minutos.

Sendo assim, ficou estabelecido que a esterilização em autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm²) por 2,5 a 15 minutos do AH seco obtido por biofermentação no LDPB pode ser empregada sem comprometimento das aplicações pretendidas.

4.2.5.2. EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO EM SOLUÇÕES DE AH

Para avaliar o efeito da esterilização nas características estruturais de soluções de AH, soluções 1% e 7% (g/100g) também foram submetidas a tratamento térmico em autoclave a 126°C por 0, 15, 30 e 60 minutos.

Os resultados obtidos de massa molar média para as soluções de AH com diferentes concentrações nos diferentes tempos de tratamento térmico estão apresentados na Figura 4.32.

Os resultados mostraram a diminuição da massa molar média com o tempo de tratamento térmico nas concentrações estudadas, indicando possível despolimerização do biopolímero. Segundo Guelcher e Hollinger (2006), a despolimerização é a diminuição da massa molar média do polímero e, para soluções de AH, a despolimerização ocorre em temperaturas acima de 80°C. A redução da massa molar reduz a viscosidade da solução e, conseqüentemente, altera sua viscoelasticidade. Além disso, durante o aquecimento, o polímero também pode sofrer degradação ou decomposição que são alterações na estrutura química da molécula. A cadeia polimérica pode ser degradada facilmente sob a ação de vários fatores físicos e/ou químicos, tais como estresse mecânico, ação de radiação ou de radicais livres, hidrólise ácida ou alcalina, oxidação, enzimas, calor, etc. A degradação normalmente pode ser observada através de uma coloração amarelada da solução de AH. Nos processos de esterilização convencionais em autoclave a 121-128°C por 15-30 minutos normalmente observa-se a decomposição da solução em adição à despolimerização do AH.

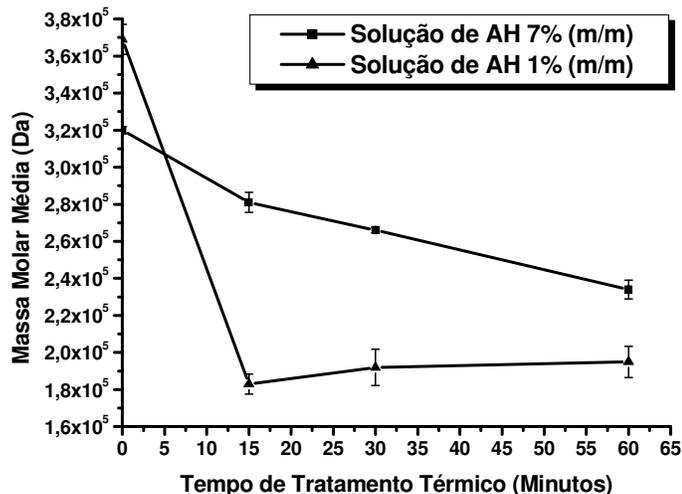


Figura 4.32. Massas molares médias obtidas para soluções de AH com concentrações de 1% e 7% (m/m) submetidas a diferentes tempos de tratamento térmico em autoclave a 126°C (1,5 kgf/cm²).

Neste estudo não foi observada alteração da coloração das soluções de AH submetidas ao tratamento térmico provavelmente devido à baixa concentração das soluções estudadas. Através dos cromatogramas obtidos por SEC para a obtenção da massa molar média também não foi possível identificar picos referentes à degradação ou decomposição das soluções de AH.

A avaliação do efeito da concentração da solução na estabilidade do AH quando autoclavado a diferentes tempos de tratamento térmico mostrou que a diminuição da concentração de AH na solução afeta o processo de despolimerização ocasionando uma diminuição mais brusca das massas molares médias. A solução de AH 1% (g/100g) apresentou um decréscimo de massa molar média de 50% após 15 minutos de tratamento enquanto que a solução de AH 7% (g/100g) apresentou apenas 12%. Mesmo com 60 minutos de tratamento, a solução de AH 7% (g/100g) apresentou somente 27% de decréscimo em sua massa molar média.

A influência da concentração no processo de despolimerização observada pode ser atribuída ao maior movimento das moléculas nas soluções diluídas causando um decréscimo de sua estabilidade térmica. Em soluções concentradas, as cadeias têm menor mobilidade e o maior emaranhamento “protege” sua integridade.

Diferentemente do estudo realizado por Swann e colaboradores (1997), através dos

resultados obtidos neste estudo, não foi possível verificar diferenças significativas entre a esterilização de soluções de AH e a esterilização de AH seco. Ao contrário do estudo de Swann, neste estudo, a esterilização da solução de AH 7% (g/100 g) apresentou melhores resultados, sendo, portanto, uma alternativa para a esterilização do polímero. As diferenças nos resultados podem ser atribuídas às diferenças de pureza dos AH utilizados.

4.2.5.3. EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO NOS GÉIS DE AH RETICULADOS COM DVS E NAS MISTURAS GEL/FLUIDO

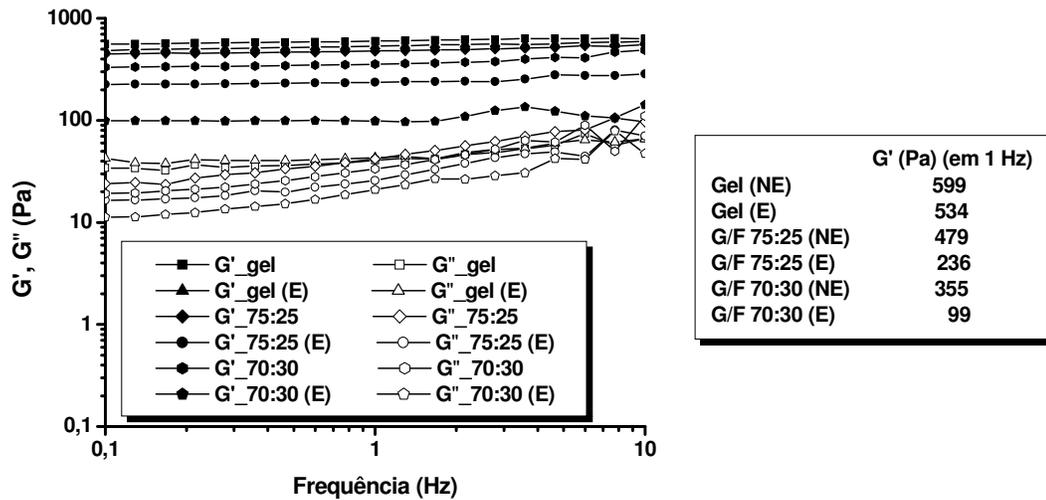
O efeito da esterilização dos géis de AH reticulados com DVS e das misturas gel/fluido foi avaliado através de testes reológicos. A eficácia do processo de esterilização foi verificada através do plaqueamento de bactérias (mesófilos totais) e de bolores e leveduras.

A Figura 4.33 mostra o efeito da esterilização no comportamento reológico do gel de AH reticulado com DVS e da mistura gel de AH reticulado com DVS/fluido de AH 1% (g/100) 75:25 e 70:30 (massa/massa).

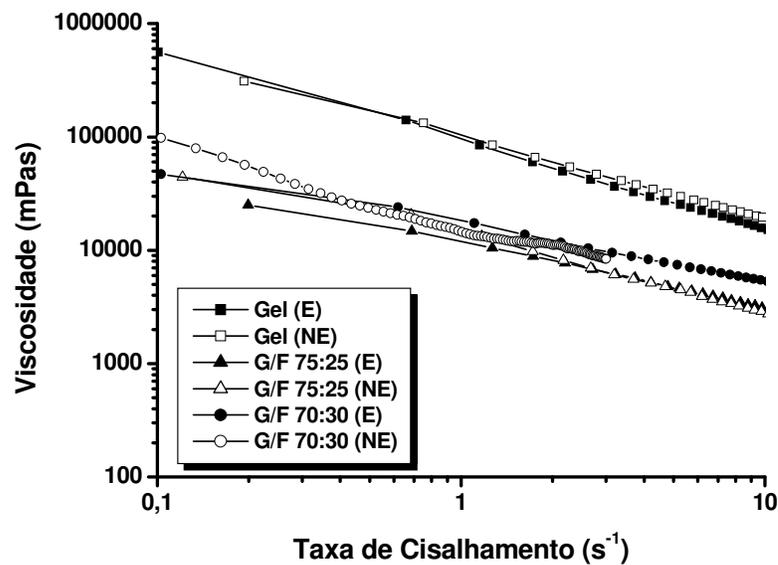
Os espectros de oscilação e as curvas de fluxo mostraram que a condição de esterilização estudada não produziu mudanças significativas nas propriedades reológicas dos géis sendo, portanto estas condições indicadas para a esterilização dos mesmos.

Entretanto, os espectros de oscilação e as curvas de fluxo das misturas gel/fluido mostraram que as condições de esterilização afetam as propriedades reológicas do produto. Essas alterações podem ser atribuídas à presença do AH sem reticulação proveniente do fluido de AH 1-1,25% (massa/volume). Observou-se também que com o aumento da concentração do fluido há um maior efeito da esterilização sobre o produto, indicando novamente que a diminuição dos módulos G' e G'' são causadas pela despolimerização do AH não reticulado presente na mistura.

Para contornar os efeitos da esterilização na mistura gel/fluido, o gel e o AH seco usado para preparação do fluido devem ser esterilizados separadamente, e então misturados em câmara de fluxo laminar. Este procedimento, embora seja mais trabalhoso, garante as características estruturais e reológicas da mistura.



(a)



(b)

Figura 4.33. Comportamento reológico de géis de AH reticulados com DVS e de misturas gel/fluido (75:25 e 70:30) antes e após processo de esterilização em autoclave a 126°C por 2,5 minutos. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹, D=75-100 μm. Fluido: 1% (massa/volume). (a) Espectro de oscilação e (b) Curva de Fluxo. (E)=estéril e (NE)=não esterilizado.

Os resultados dos plaqueamentos para a amostra de gel de AH reticulado com DVS/fluido de AH 1% (m/v) 75:25 (massa/massa) antes e após esterilização estão apresentados na

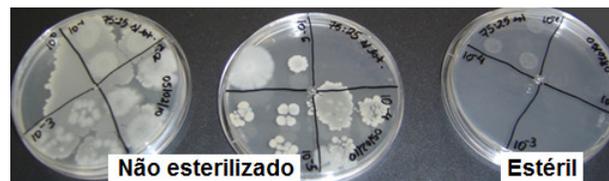
Tabela 4.21.

Tabela 4.21. Resultados dos plaqueamentos para bactérias e bolores e leveduras.

Géis	Não-esterilizado	Esterilizado
Bactérias (Mesófilos Totais) (UFC.mL ⁻¹)	8×10^7	$< 10^{-1}$ (não houve crescimento)
Leveduras (UFC.mL ⁻¹)	6×10^2	$< 10^{-1}$ (não houve crescimento)
Bolores (UFC.mL ⁻¹)	2×10^3	$< 10^{-1}$ (não houve crescimento)

*UFC=Unidade formadora de colônia.

A Figura 4.34 apresenta as placas referentes à contagem de mesófilos totais e de bolores e leveduras antes e após esterilização.



(a)



(b)

Figura 4.34. Placas para contagem de (a) Mesófilos Totais e (b) Bolores e Leveduras em gel de AH reticulado com DVS (AH/DVS 1:1).

Os resultados de plaqueamento demonstraram eficácia do processo de esterilização sendo, portanto, do ponto de vista biológico, estas condições indicadas para a esterilização do produto.

4.2.6. EFEITO DA PUREZA DA MATÉRIA-PRIMA NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DOS GÉIS

A pureza do AH usado para preparação dos géis é um fator que pode influenciar a reação de reticulação com DVS já que proteínas e outras moléculas também podem ser reticuladas por este reagente.

A influência da pureza do AH usado como matéria-prima nas propriedades reológicas foi avaliada em géis preparados a partir de AH com pureza igual a 30% e 70% ($MM \approx 10^5$ Da). Os géis apresentados neste item foram preparados com razões mássicas AH/DVS 1:1; e apresentam tamanhos médios de partículas entre 75-100 μm . As diferenças na pureza do AH decorrem das diferentes condições nutricionais e de cultivo empregadas na fermentação e das diferenças dos processos de purificação (item 4.1.1).

As Figuras 4.35 (a) e 4.35 (b) apresentam as imagens dos géis de AH (AH/DVS 1:1) após as etapas de lavagem, obtidos de AH com 30% e 70% de pureza, respectivamente.

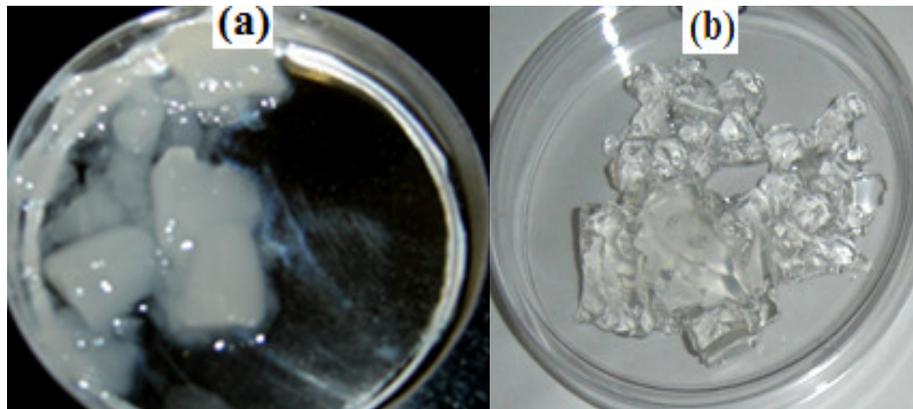


Figura 4.35. Géis obtidos a partir de AH com diferentes graus de pureza: (a) 30% e (b) 70%. Gel: $[\text{AH}] = 3\%$ (g/100g), AH/DVS 1:1, $[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $D = 75\text{-}100 \mu\text{m}$.

Os espectros mecânicos dos géis preparados com AH de 30% e 70% estão apresentados na Figura 4.36.

Os géis preparados neste item apresentaram espectros de oscilação diferentes, indicando influência do grau de pureza do AH usado como matéria-prima nas propriedades reológicas dos mesmos. Porém, o grau de influência deste parâmetro não foi significativo, principalmente nos módulos viscosos, levando-se em consideração as diferenças de pureza da matéria-prima avaliada (70% e 30%). Os módulos elásticos apresentaram em torno de 20% de diferença nas duas purezas avaliadas, enquanto os módulos viscosos apresentaram somente 4%.

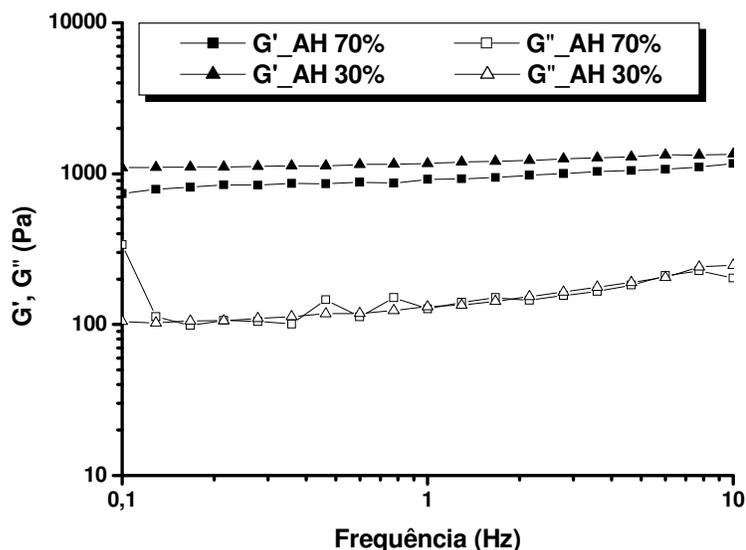


Figura 4.36. Espectros de Oscilação de géis obtidos a partir de AH com diferentes graus de pureza. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹, D=75-100 μm.

Já o aspecto visual dos géis apresentou diferenças bastante significativas principalmente em relação a outros viscosuplementos disponíveis no mercado. O gel preparado com AH 30% apresentou coloração opaca enquanto que o gel preparado com AH 70% mostrou-se translúcido como outros produtos comerciais.

Neste contexto, a grande influência da pureza está associada à imunogenicidade. Porém, ainda não foi avaliado o efeito da pureza do ponto de vista biológico.

4.2.7. VARIABILIDADE DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO

A variabilidade das reações de reticulação com DVS foi avaliada através dos valores médios de G' e G'', obtidos nos testes reológicos, na faixa de frequência entre 1 e 10 Hz.

Os géis utilizados para avaliação da variabilidade da reação foram preparados com razão mássica AH/DVS 1:1, [AH]=3% (g/100g), [NaOH]=0,1 mol.L⁻¹ e [NaCl]=3% (g/100g). O diâmetro médio das partículas foi padronizado em 75-100 μm.

A Figura 4.37 apresenta a variabilidade dos valores de G' e G'' obtidos de diferentes reações de reticulação. Foram preparados 5 géis nas mesmas condições experimentais.

Os desvios padrões dos valores de G' e G'' referentes a 5 reações de reticulação diferentes foram 3,5 % e 4,6%, respectivamente.

Esta variabilidade encontra-se dentro da faixa aceitável e pode ser atribuída a diferenças na pureza da matéria-prima e do próprio processo de preparação e purificação dos géis.

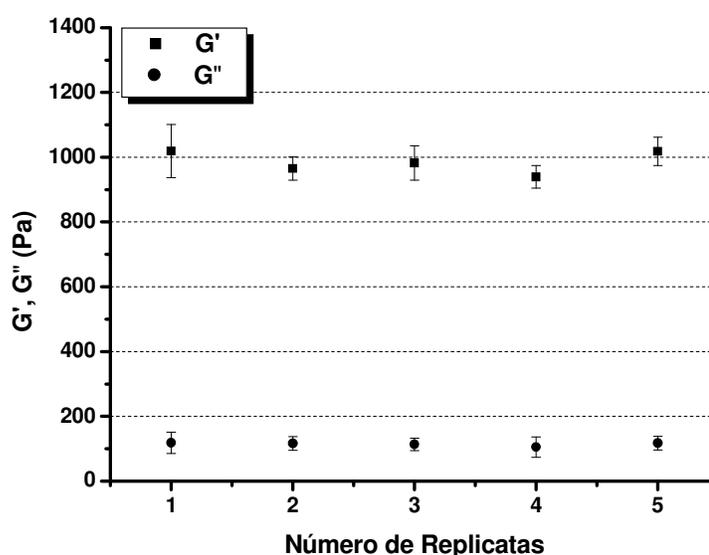


Figura 4.37. Variabilidade da reação de reticulação. Gel: [AH]=3% (g/100g), AH/DVS 1:1, [NaOH] = 0,1 mol.L⁻¹, D=75-100 μ m.

4.2.8. EFEITO DA MASSA MOLAR MÉDIA

Para avaliar o efeito da massa molar média nas propriedades reológicas dos géis, foi preparado um gel (*Controle*) a partir de NaAH puro (Hylumed, MM=6,6 x 10⁵ Da) e comparado com o produto comercial Synvisc® (MM=6 x 10⁶ Da). O gel *Controle* foi preparado com uma razão mássica AH/DVS 1:1, concentração de NaOH igual a 0,2 mol.L⁻¹, e diâmetro médio de partícula entre 75 e 100 μ m.

Os espectros de oscilação do gel *Controle* e do produto comercial Synvisc® estão apresentados na Figura 4.38.

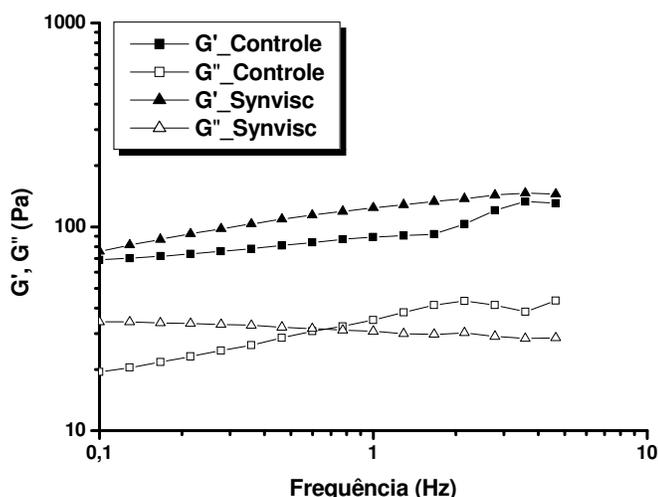


Figura 4.38. Espectros de oscilação do gel *Controle* ($6,6 \times 10^5$ Da) e do produto comercial Synvisc® (2×10^6 Da).

Os valores de $\tan \delta$ ($=G''/G'$) para ambos os géis estão apresentados na Tabela 4.22.

Tabela 4.22. Valores de $\tan \delta$ (em 4,6 Hz) do gel *Controle* e do Synvisc®.

Géis	$\tan \delta$
<i>Controle</i>	0,33
Synvisc®	0,20

Os dois géis foram classificados como géis fracos, pois apresentaram valores de $\tan \delta > 0,1$ (Ikeda & Nishinari, 2001).

De acordo com a “Lei de Potência”, $G' = A \omega^B$, os géis foram classificados em géis covalentes (Tabela 4.23) já que os valores de B estão próximos de zero (Khondkar *et al.*, 2007).

Tabela 4.23. Parâmetros da “Lei de Potência” para a relação entre o módulo de estocagem e a frequência para géis reticulados de AH ($G' = A \omega^B$).

Géis	A (Pas)	B (inclinação)
Controle	70,2	0,15
Synvisc®	88,9	0,15

Os resultados obtidos neste item mostraram que a massa molar média influencia as propriedades reológicas e estruturais dos géis. Observou-se um aumento nas propriedades viscoelásticas do gel preparado com AH de maior massa molar média (Synvisc®) que pode ser

atribuído ao maior emaranhamento das cadeias. A proximidade entre as cadeias facilita a entrada do agente reticulante levando a um maior grau de reticulação.

4.2.9. ESTABILIDADE REOLÓGICA

A estabilidade em geladeira da mistura gel/fluido 75:25 preparada conforme item 3.1.5.3 foi avaliada através de testes reológicos.

A Figura 4.39 apresenta os espectros de oscilação e as curvas de fluxo do gel com 0, 60 e 120 dias de armazenamento em geladeira a 1-4°C. O produto foi armazenado em seringa hipodérmica plástica de 1 mL após esterilização, conforme item 3.1.5.5-C.

Os espectros de oscilação e as curvas de fluxo mostraram que não há variação significativa das propriedades reológicas do produto final no período de armazenamento avaliado.

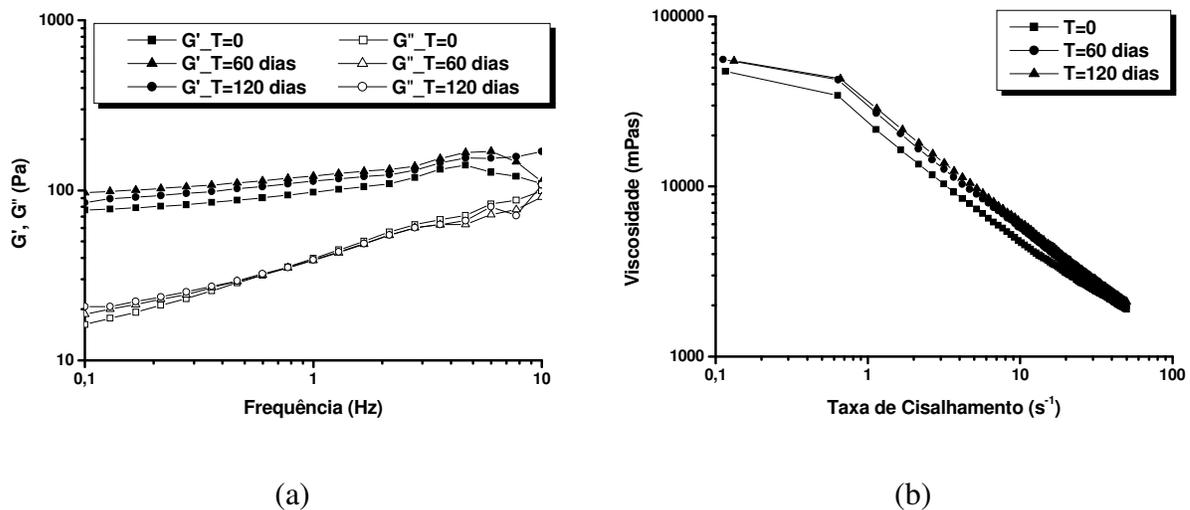


Figura 4.39. Estabilidade reológica da mistura gel/fluido 75:25 (gel de AH preparado com AH 10⁵ Da na concentração de 3g/100g, [NaCl]=3 g/100g, [NaOH]=0,1 mol.l⁻¹, diâmetro médio de partícula= 75-100µm e razão mássica AH/DVS 1:1 e fluido preparado a partir de AH 10⁵ Da na concentração de 1g/100g em PBS). (a) Espectro de Oscilação e (b) Curva de Fluxo.

Considerando a “Lei de Potência” descrita por Ostwald de Waele ($\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$), os valores dos parâmetros K e n estão apresentados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24. Parâmetros determinados nas curvas de fluxo das misturas gel/fluido 75:25 (gel de AH preparado com AH 10⁵ Da na concentração de 3g/100g, [NaCl]=3 g/100g, [NaOH]=0,1 mol.l⁻¹, diâmetro médio de partícula= 75-100µm e razão mássica AH/DVS 1:1 e fluido preparado a partir de AH 10⁵ Da na concentração de 1g/100g em PBS).

Tempo de armazenamento (Dias)	K (mPa.s ⁿ)	n
0	19345	0,40
60	24832	0,35
120	27072	0,35

Os valores de n obtidos indicaram que o comportamento viscoelástico não variou significativamente com o tempo de armazenamento, indicando estabilidade reológica no período avaliado.

4.2.10. TESTE *IN VITRO*

4.2.10.1. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados através do método de incorporação do vermelho neutro e do método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium) na mistura gel/fluido 75:25 (gel de AH preparado com AH 10⁵ Da na concentração de 3g/100g, [NaCl]=3 g/100g, [NaOH]=0,1 mol.l⁻¹, diâmetro médio de partícula= 75-100 µm e razão mássica AH/DVS 1:1 e fluido preparado a partir de AH 10⁵ Da na concentração de 1g/100g em PBS).

4.2.10.1.1. MÉTODO DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Os resultados obtidos pelo ensaio de citotoxicidade indireta pelo método da incorporação do vermelho neutro apresentados na Figura 4.40 indicaram que a amostra analisada apresentou comportamento semelhante ao CNT (extrato de poliestireno usado como controle negativo de toxicidade). Este resultado sugere que a amostra não libera substâncias tóxicas, pois não interferiu na viabilidade celular. De acordo com análise estatística utilizando *One Way Anova*, com nível de significância de 0,05, não foi observada variação significativa entre as replicatas analisadas.

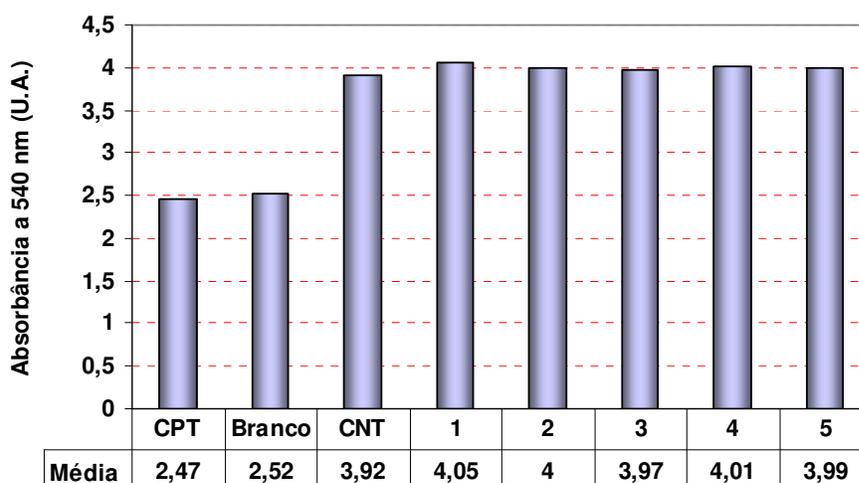


Figura 4.40. Análise de citotoxicidade indireta pelo ensaio de Viabilidade Celular pelo Método de Incorporação do Vermelho Neutro com células VERO (nível de significância 0,05).

As médias das amostras diferem significativamente em relação ao controle positivo de toxicidade, porém não são significativamente diferentes do controle negativo.

4.2.10.1.2. MÉTODO DO MTT

A amostra analisada também não apresentou efeito citotóxico por meio do teste de citotoxicidade indireta pelo ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT. Os resultados obtidos apresentaram comportamento semelhante ao CNT, não tóxico. Estes resultados indicam que o material analisado não liberou elementos tóxicos no meio de cultura, pois não houve interferência ou atraso na adesão, proliferação e viabilidade celular quantificada pela leitura de absorbância. Na figura 4.41 estão apresentados os dados da leitura de absorbância das células VERO em contato com o extrato da amostra avaliada.

Todas as replicatas apresentaram comportamento semelhante ao CNT, podendo ser consideradas atóxicas. De acordo com análise estatística utilizando *One Way Anova*, com nível de significância de 0,05, não foi observada variação significativa entre as replicatas analisadas.

As médias das amostras diferem significativamente em relação ao controle positivo de toxicidade, porém não são significativamente diferentes do controle negativo.

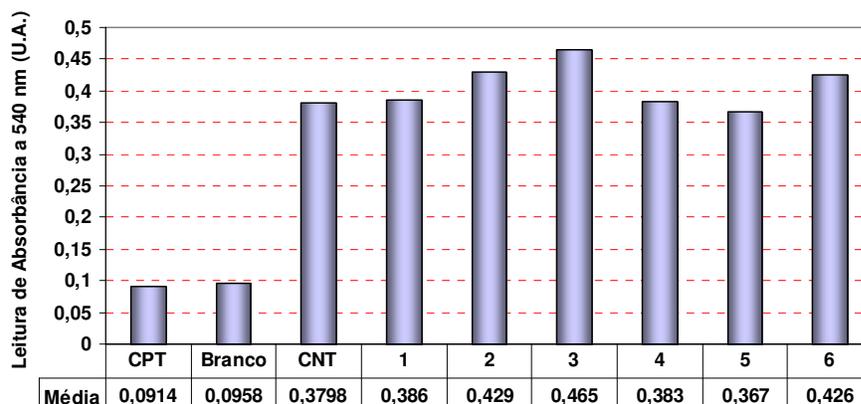


Figura 4.41. Análise de citotoxicidade indireta pelo ensaio de Viabilidade Celular pelo Método do MTT com células VERO (nível de significância 0,05).

4.3. PREPARAÇÃO DO CONJUGADO AH-DPPE

4.3.1. AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DE CONJUGAÇÃO

Conjugados AH-DPPE foram preparados a partir de AH com massas molares médias de 10^4 , 10^5 e 10^6 Da, conforme item 3.2.1. Os produtos obtidos foram caracterizados por CCD, RMN ^1H e razão mássica DPPE/AH.

A Tabela 4.25 apresenta os teores de AH e de fosfolipídio no conjugado após separação por ultrafiltração, a razão mássica DPPE/AH e os rendimentos das reações de conjugação calculados a partir da concentração de AH.

Tabela 4.25. Concentrações de AH e DPPE no conjugado e rendimento da reação de conjugação.

MM do AH (Da)	[AH] (%)	[DPPE] (%)	Rendimento (%)	$\mu\text{g DPPE/mg AH}$
10^4	79	0,7	47	8,8
10^5	84	6,4	82	*
10^6	56	0,3	77	5,3

* A proporção $\mu\text{g DPPE/mg AH}$ não pode ser calculada devido a impurezas do AH (70%) usado como matéria-prima, que apresenta ácido fosfórico na composição do meio sintético empregado para sua produção.

Os conjugados AH-DPPE preparados neste trabalho apresentaram razões DPPE (μg)/ AH

(mg) (8,8 $\mu\text{g DPPE/mg AH } 10^4 \text{ Da}$ e 5,3 $\mu\text{g DPPE/mg AH } 10^6 \text{ Da}$) da mesma ordem de grandeza obtida por Surace e colaboradores (2009) para o conjugado AH-DOPE (3 $\mu\text{g DOPE/mg AH } 10^6 \text{ Da}$).

4.3.2. AVALIAÇÃO DA REAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Após purificação e liofilização, o conjugado foi caracterizado por CCD (Cromatografia de Camada Delgada) (Figura 4.42).

O conjugado AH-DPPE apresentou um *spot* com fator de retenção (R_f) igual a 0, enquanto que o fosfolípido DPPE apresentou um *spot* com R_f igual a 0,5. Não foi possível visualizar o *spot* referente ao AH. Os demais *spots* observados não foram identificados. De acordo com Surace e colaboradores (2009), o fosfolípido DOPE apresentou $R_f=0,7$ e o conjugado AH-DOPE apresentou $R_f = 0$ na mesma fase móvel.

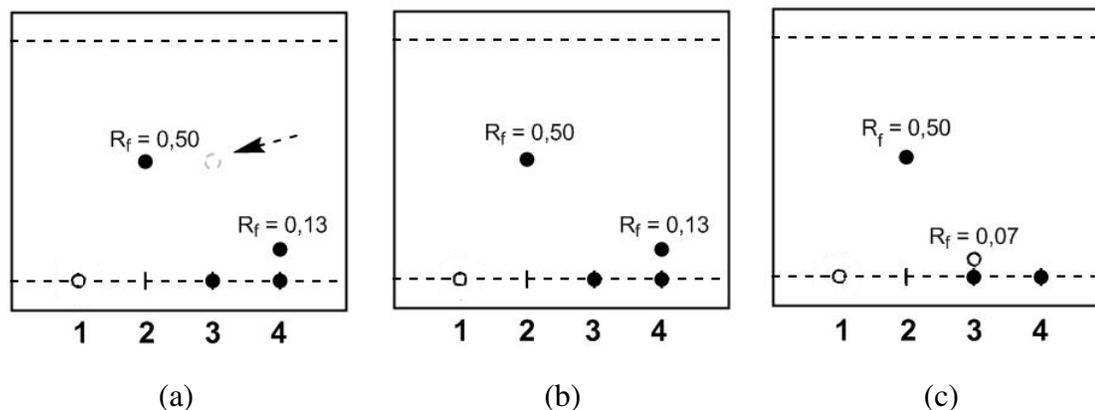


Figura 4.42. Placas de Cromatografia de Camada Delgada (fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:2). Reações realizadas com: (a) AH MM= 10^4 Da; (b) AH MM= 10^5 Da; (c) AH MM= 10^6 Da. *Compostos aplicados:* (1)=AH; (2)=DPPE; (3)=Retido na Membrana; (4)=Filtrado.

A placa obtida para a reação realizada com o AH de massa molar média de 10^4 Da apresentou dois *spots* para o produto retido na membrana ($R_f=0$ referente ao AH-DPPE e $R_f=0,5$ referente ao DPPE); e dois *spots* ($R_f=0$ referente ao AH-DPPE e $R_f=0,13$ não-identificado) para o filtrado. A presença do *spot* com $R_f=0,5$ para o produto retido na membrana, mesmo que em baixa concentração, demonstra que o DPPE não foi totalmente consumido durante a reação, justificando o baixo rendimento da reação de conjugação.

A placa obtida para a reação realizada com o AH de massa molar média de 10^5 Da apresentou apenas um *spot* ($R_f=0$ referente ao AH-DPPE) para o produto retido na membrana e dois *spots* ($R_f=0$ referente ao AH-DPPE e $R_f=0,13$ não-identificado) para o filtrado. A presença de somente um *spot* com $R_f=0,5$ no produto retido na membrana demonstra que a separação dos produtos por ultrafiltração foi eficaz e que o DPPE foi totalmente consumido durante a reação. Além disso, o *spot* referente ao fosfolipídio livre também não foi encontrado no filtrado.

A placa obtida para a reação realizada com o AH de massa molar média de 10^6 Da apresentou dois *spots* ($R_f=0$ referente ao AH-DPPE e $R_f=0,07$ não-identificado) para o produto retido na membrana e apenas um *spot* ($R_f=0$ referente ao AH-DPPE) para o filtrado. A ausência do *spot* referente ao fosfolipídio livre nas duas frações demonstra que o DPPE foi totalmente consumido durante a reação, porém a presença de um *spot* não identificado na fração retida na membrana indica que a separação por ultrafiltração com a membrana de 1000.000 Da não foi eficaz. Neste caso, é necessária uma membrana com menor tamanho de poros.

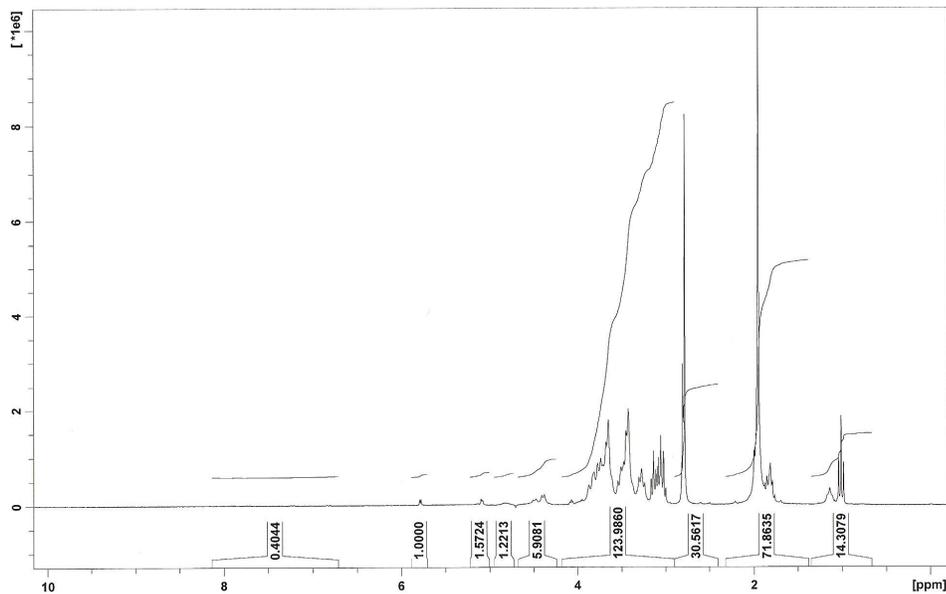
4.3.3. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON

A Figura 4.43 apresenta os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) para os conjugados AH-DPPE obtidos com AH de diferentes massas molares.

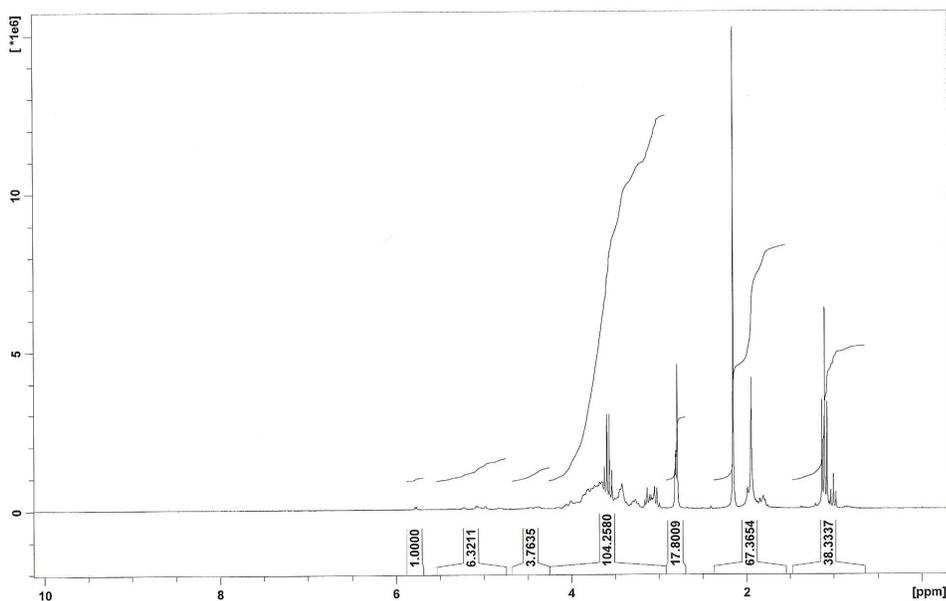
Os conjugados AH-DPPE preparados a partir de AH 10^4 e 10^6 Da foram caracterizados por RMN ^1H através dos picos característicos (Ruhela *et al.*, 2006): δ (ppm) 5,2 (1H, H-1 α), 4,39 (d, 2H, H-1' β , H-1''), 4,36 (d, 2H, H-1''' β , H-1' α); 2,15-1,95 (6H, NHCOCH₃); 0,98 (6H, CH₃ terminal do DPPE); 1,8-1,05 (56H, prótons do metileno do DPPE); 1,8 (CH₃ do AH); 3,8-3,3 (12H, prótons do anel de açúcar do AH); 4-3,2 (CHOH do AH). 7,7 (NH do DPPE ligado ao C=O do AH).

Entretanto, no espectro do conjugado preparado a partir de AH 10^5 Da não foi possível identificar o pico em δ 7,7 ppm referente a ligação amídica entre o grupo NH do DPPE e o grupo carboxílico do AH.

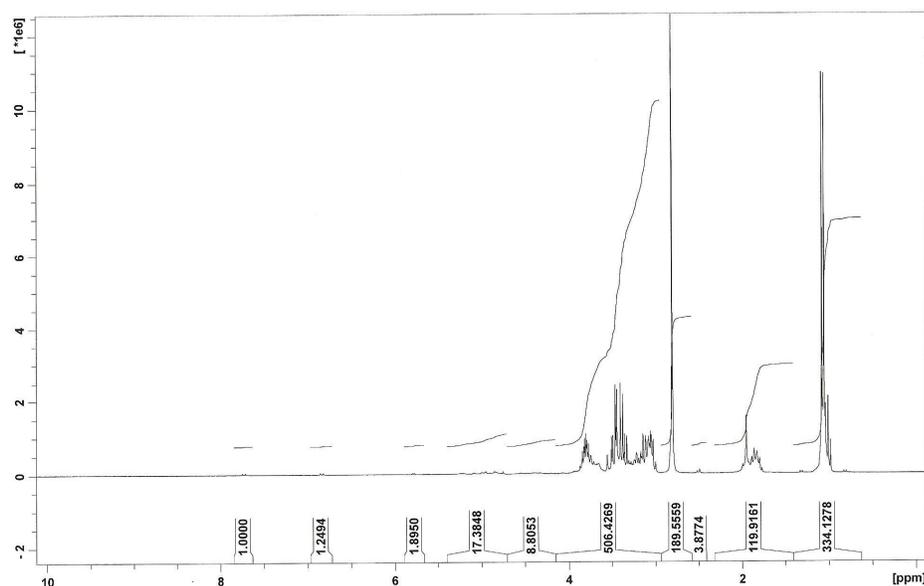
Nos três espectros não foram observados picos referentes ao grupo NH_3^+ do fosfolipídio livre (δ 8,3 ppm), sugerindo que a complexação com o AH ocorreu.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.43. Espectros de RMN¹H das amostras de conjugado AH-DPPE preparados a partir de AH (a) 10⁴ Da, (b) 10⁵ Da e (c) 10⁶ Da.

4.3.4. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS

As características físico-químicas dos lipossomas contendo diferentes quantidades do conjugado AH-DPPE preparado a partir de AH de 10⁶ Da, foram avaliadas através de medidas de diâmetro médio, distribuição de tamanhos e de potencial zeta (ζ) (Tabela 4.26).

Os lipossomas contendo somente Lipoid E-80/DPPE mostraram um diâmetro médio em torno de 85 nm e índice de polidispersidade (PDI) em torno de 0,1.

Os resultados de diâmetros médios dos lipossomas preparados com AH-DPPE, demonstraram que a adição do conjugado influencia o tamanho dos lipossomas, pois segundo análise estatística usando One Way Anova, com nível de significância de 0,05, as médias de diâmetros obtidas são significativamente diferentes.

As diferenças nos tamanhos com a adição do conjugado AH-DPPE foram atribuídas às diferenças no empacotamento do fosfolípido com o conjugado AH-DPPE e à configuração do AH na superfície das partículas para se atingir estruturas em equilíbrio.

Os índices de polidispersidade obtidos não apresentaram variação significativa com a adição do conjugado em toda faixa de concentração avaliada.

Tabela 4.26. Características físico-químicas de estruturas lipídicas preparadas com Lipoid E-80/DPPE 80:20 e Lipoid E-80/DPPE/AH-DPPE.

	Diâmetros Médios Número (N) ±SD (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	
			Em água	Em NaCl 0,15 mol.L ⁻¹
<i>Conjugado AH-DPPE</i>	NA	NA	-32 ± 2	-14 ± 2
<i>Lipossomas de Lipoid E-80/DPPE</i>	85,1 ± 0,4	0,097	-19,9 ± 0,5	-15,9 ± 0,3
<i>Lipossomas de Lipoid E-80/DPPE + conjugado AH_DPPE</i>				
5%	69 ± 1	0,093	-5,0 ± 0,6	-11,1 ± 0,8
10%	93 ± 1	0,070	-10,7 ± 0,4	-12,4 ± 0,4
15%	70 ± 1	0,095	-10,4 ± 0,7	-15 ± 1

*Os resultados são expressos como as médias ± SD de 3 leituras da mesma preparação. As leituras de tamanho foram realizadas em água nos lipossomas extrudados conforme item 3.2.3.

NA= não analisado

** *Composição de Lipoid E-80 - Fosfolipídios (g/100g): fosfatidil colina (80-85); fosfatidil etanolamina (7-9,5); Lisofosfatidil colina (<3); Lisofosfatidil etanolamina (<0,5); Sphingmyelin (2-3). Lipídios não-polares (g/100g): triglicérides (<3); colesterol (<1); ácidos graxos livres (<0,05); DL- α -tocopherol (0,05-1).*

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

Os valores de potencial zeta foram avaliados em água e em solução de NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Em água, os valores de potencial zeta variaram entre -5 a -20 mV, enquanto que os potenciais avaliados em NaCl variaram entre -10 e -15 mV.

As medidas de potencial zeta realizadas tanto em água quanto em NaCl também mostraram-se significativamente diferentes quando analisadas segundo análise estatística One Way Anova, com nível de significância de 0,05.

As diferenças no empacotamento do fosfolipídio com o conjugado e na configuração do AH na superfície da partícula também refletem no potencial zeta. Para os lipossomas preparados com 5% de conjugado observou-se uma redução do potencial zeta, principalmente na leitura realizada em água ($\zeta = -5$ mV) atribuída a uma configuração do AH na superfície dos lipossomas que internaliza a carga negativa da superfície. Já com a adição de maior concentração de AH-DPPE (10 e 15%), a estabilidade é uma combinação do tipo estérica devido à retenção de água nas cadeias de AH e do tipo eletrostática devido às cargas negativas na superfície.

A comparação das características físico-químicas dos lipossomas preparados neste trabalho com dados da literatura não é adequada uma vez que os escassos resultados da literatura mostram a conjugação AH-DOPE modificando lipossomas preparados a partir de fosfolipídios de carga positiva (DOTAP/DOPE e DE/DOPE) (Surace *et al.*, 2009; Taetz *et al.*, 2009).

Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho mostram que os lipossomas foram formados com a adição do conjugado AH-DPPE com propriedades comparáveis as da literatura principalmente quanto ao tamanho.

CONCLUSÕES

Dos resultados experimentais obtidos concluiu-se que as propriedades físico-químicas e reológicas dos géis de AH reticulados com DVS podem ser moduladas pelas condições de preparação (razão AH/DVS, concentração de NaOH, tamanho de partícula e razão gel/fluido), possibilitando uma vasta gama de aplicações médicas e cosméticas.

A conjugação do AH com DPPE foi realizada com rendimento de aproximadamente 80%, através de rota simples, em meio aquoso e temperatura de 37°C. Os conjugados obtidos foram capazes de serem incorporados em lipossomas compostos de lecitina de ovo e DPPE, nas proporções 5, 10 e 15% de conjugado, modificando o tamanho, polidispersidade e as propriedades de superfície dos lipossomas.

Abaixo, estão listadas as principais conclusões relativas aos dois principais aspectos específicos estudados neste trabalho:

Produção de géis de AH reticulados com divinilsulfona

- O processo de purificação do AH empregado neste estudo fornece AH com 68-70% de pureza e teor de proteína de 0,4-2,4%.
- A pureza do AH usado na preparação dos géis reticulados com DVS afeta as propriedades reológicas dos mesmos, uma vez que impurezas também são reticuladas pela divinilsulfona.

- A reticulação do AH com diferentes quantidades de DVS produz géis com diferentes graus de intumescimento e diferentes propriedades reológicas.
- O gel de AH reticulado com DVS foi caracterizado pelas bandas de absorção no infravermelho entre 1280 e 1380 cm^{-1} atribuídas ao estiramento νSO_2 da divinilsulfona e ao $-\text{CH}=\text{C}-$ do grupo vinil.
- A razão de intumescimento dos géis preparados neste estudo variou entre 33 e 430 e é dependente do grau de reticulação dos géis.
- Acima de 90% da massa dos géis é água, exceto no gel preparado com excesso de agente reticulante que apresentou menor capacidade de retenção de água devido ao maior grau de reticulação.
- O processo de reticulação é controlado pelos seguintes parâmetros de reação: razão polímero/ agente reticulante, concentração e massa molar do AH, concentração de NaOH e adição e concentração de sais neutros.
- A reação de reticulação apresentou um rendimento entre 45 e 75% e recuperação mássica do AH em torno de 75%.
- O grau de modificação do polímero é diretamente proporcional à concentração de agente reticulante adicionado, atingindo 90% na razão mássica AH/DVS 1:1.
- A concentração de agente reticulante é diretamente proporcional à dureza do gel, mas inversamente proporcional a razão de intumescimento.
- A faixa de diâmetros médios de partículas (75-100 μm) adequada para a aplicação requerida foi alcançada com 40-50 minutos de agitação a 24.000 rpm.
- A força de extrusão dos géis é diretamente proporcional a concentração de agente reticulante e pode ser modulada pela adição de uma fase fluida (solução de AH não reticulado).

- A força de extrusão e a dureza do gel são inversamente proporcionais à concentração de fase fluida.
- A concentração de NaOH, e portanto, o pH da mistura reacional, afeta a reação de reticulação. O pH da mistura reacional é inversamente proporcional a sua viscosidade e ao grau de reticulação dos géis.
- O aumento no pH diminui a viscosidade da mistura reacional devido a alterações na conformação das cadeias do polímero causadas pela quebra das ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares. As cadeias se contraem dificultando a entrada do agente reticulante.
- O aumento do pH na faixa estudada não promove alteração da massa molar média do polímero até a concentração de NaOH de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ que justifique a diminuição da viscosidade. Após esta concentração há redução considerável da massa molar média do polímero justificando a formação de géis bastante “softs”.
- O diâmetro médio das partículas é diretamente proporcional a dureza e a força de extrusão dos géis e pode ser modulado para uma aplicação mais confortável ao paciente.
- As medidas reológicas em regime estacionário dos géis de AH reticulados com DVS mostraram um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico em toda a faixa de taxa de cisalhamento estudada, enquanto soluções de AH apresentaram comportamento Newtoniano a baixas taxas de cisalhamento.
- Nas medidas oscilatórias, os géis reticulados exibiram comportamento característicos de géis, sendo o módulo elástico (G') maior que o módulo viscoso (G''), e ambos paralelos ao eixo de frequência.
- Baseados nos parâmetros reológicos, os géis preparados neste estudo foram classificados como géis covalentes e fracos, exceto o gel preparado com excesso de agente reticulante que foi classificado como gel covalente e convencional.

- De acordo com os parâmetros reológicos, os géis preparados neste estudo são mais fortes que o fluido sinovial, podendo assim ser utilizados como viscosuplementos.
- As medidas reológicas também indicaram que os módulos G' dos géis são inversamente proporcionais a razão mássica AH/DVS indicando aumento nos níveis de reticulação.
- A dependência entre G' e a razão mássica AH/DVS foi similar a dependência entre G' e a concentração de vários biopolímeros com alta funcionalidade.
- As reações de reticulação apresentaram valores aceitáveis de variabilidade em relação aos testes reológicos, abaixo de 5%.
- A esterilização em autoclave por 2,5 minutos a 126°C não afeta as propriedades reológicas dos géis, entretanto afeta a mistura gel/ fluido. Sendo assim, é necessário esterilizar separadamente a fase gel e a fase fluida.
- O processo de esterilização utilizado apresenta eficácia quanto ao crescimento de bactérias, bolores e leveduras.
- O gel preparado com razão mássica AH/DVS 1:1, concentração de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, concentrações de AH (bacteriano, MM=10⁵ Da) e NaCl de 3% (g/100g), diâmetro médio de partículas entre 75-100 µm e misturado com o fluido de AH 1% em uma razão mássica de 75:25 apresentou propriedades estruturais e reológicas similares ao fluido sinovial. Sendo assim, o gel preparado nestas condições foi utilizado nos testes *in vitro* e será utilizado nos testes *in vivo*.
- Os testes de citotoxicidade indireta pelo ensaio de viabilidade celular com MTT e com Vermelho Neutro não mostraram efeito citotóxico. O material apresentou comportamento semelhante ao CNT, podendo ser considerado atóxico.
- O material apresentou estabilidade reológica em geladeira no período avaliado (120 dias).

- Os parâmetros de reação estudados podem ser convenientemente usados para controlar as propriedades reológicas e estruturais dos géis permitindo aplicações específicas destes géis nas áreas médicas e cosméticas.

Preparação do conjugado AH-DPPE

- As reações para preparação do conjugado AH-DPPE com AH de massas molares médias de 10^5 e 10^6 Da apresentaram rendimentos em torno de 80%, enquanto que o conjugado preparado com AH 10^4 Da apresentou um rendimento em torno de 50%.
- Os conjugados AH-DPPE de massas molares médias 10^4 e 10^6 Da apresentaram as razões DPPE (μg)/ AH (mg) de 8,8 e 5,3, respectivamente.
- A separação dos produtos utilizando ultrafiltração mostrou-se eficiente com a membrana de 10.000 Da.
- Os conjugados AH-DPPE foram caracterizados por RMN¹H através dos deslocamentos característicos.
- Os conjugados preparados com AH de diferentes massas molares não apresentaram diferenças significativas nos espectros de RMN ¹H, exceto para o conjugado preparado com AH de 10^5 Da onde não foi possível identificar o pico referente à ligação amídica entre o fosfolipídio e o AH.
- Os lipossomas preparados com adição de conjugado apresentaram diferenças de diâmetros médios em relação aos lipossomas sem incorporação do conjugado, segundo análise estatística Anova One Way com nível de significância de 0,05.
- As medidas de potencial zeta realizadas tanto em água quanto em NaCl também mostraram-se significativamente diferentes quando analisadas segundo análise estatística One Way Anova, com nível de significância de 0,05.

- As diferenças nos valores de tamanho e de potencial zeta para as concentrações de AH-DPPE avaliadas foram atribuídas às diferenças no empacotamento do fosfolípido com o conjugado e na configuração do AH na superfície das partículas.
- Os resultados de tamanho e de potencial zeta mostram que os lipossomas foram formados com a adição do conjugado AH-DPPE com propriedades comparáveis as da literatura, principalmente quanto ao tamanho.

5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar ensaios *in vivo* com os géis de AH reticulados com DVS;
- Quantificar os teores de pirogênicos e endotoxinas nos géis;
- Avaliar o efeito da pureza do AH nas propriedades biológicas dos géis;
- Avaliar o tempo de residência e a eficiência dos géis de AH reticulados com DVS;
- Avaliar o desempenho do gel de AH reticulado com DVS em diferentes aplicações;
- Realizar testes de estabilidade com os lipossomas preparados;
- Avaliar a adição do conjugado AH-DPPE em diferentes lipossomas.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M. E., An analysis of clinical studies of the use of crosslinked hyaluronan, Hylan in the treatment of osteoarthritis. *The journal of rheumatology*, v. 20, n. 39, p.16-18, 1993.
- ADAMS, M. E., LUSSIER, A. J., PEYRON, J. G. A risk-benefit assessment of injections of hyaluronan and its derivatives in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Drug Safety*, v. 23, n. 2, p. 115-130, 2000.
- AGERUP, B. Polysaccharide gel composition. United States Patent n. 5,827,937, 1998.
- AHMAD, M. B., HUGLIN, M. B. DSC studies on states of water in crosslinked poly (methyl methacrilate-co-n-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels. *Polymer International*, v. 33, p. 273, 1994.
- ALMOND, A., BRASS, A., SHEEHAN, J. K. Dynamic exchange between stabilized conformations predicted for hyaluronan tetrasaccharides: comparison of molecular dynamics simulations with available NMR data. *Glycobiology*, v. 8, n. 10, p. 973-980, 1998.
- AMBROSIO, L., BORZACCHIELLO, A., NETTI, P. A., NICOLAIS, L. Rheological study on hyaluronic acid and its derivative solutions. *J. M. S. Pure Applied Chemistry*, v. A36, n. 7-8, p. 991-1000, 1999.
- AOKI, S., IWASAKI, S., SUGIURA, N., SUZUKI, S., KIMATA, K. Use of lipid-bound glycosaminoglycans for the treatment of rheumatoid arthritis. European Patent Office n. EP 0 581 282 B1, 1999.

- ASAYAMA, S., NOGAWA, M., TAKEI, Y., AKAIKE, T., MARUYAMA, A. Synthesis of novel polyampholyte comb-type copolymers consisting of a poly(L-lysine) backbone and hyaluronic acid side chains for a DNA carrier. *Bioconjugate Chemistry*, v. 9, p. 476-481, 1998.
- BALAZS, E. A. Sodium hyaluronate and viscosurgery. In: MILLER, D., STEGMANN, R. Healon (sodium hyaluronate). *A guide to its use in Ophthalmic Surgery*. New York: Wiley, 1983, p. 5-28.
- BALAZS, E. A., LESCHCHINER, A. Cross-linked gels os hyaluronic acid and products containing such gels. United States Patent n. 4,582,865, 1986.
- BALAZS, E. A., BAND, P. A., DENLINGER, J. L., GOLDMEN, A. I., LARSEN, N. E., LESCHCHINER, E. A., LESCHCHINER, A., MORALES, B. Matrix Engeneering. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v. 2, p.173–178, 1991.
- BALAZS, E. A., DENLINGER, J. L. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, v. 3, n. 9, p. 20, 1993.
- BALAZS, E. A., LESCHCHINER, E. A. Hyaluronan, its crosslinked derivative-hylan and their medical applications. In: INAGAKI, H., PHILLIPS, G. O., Cellulosic Utilizations. *Research and Rewards in Cellulosic*, Eds., New York: Elsevier, 1989, p. 233–241.
- BALAZS, E. A., LESCHCHINER, E. A., LESCHCHINER, A., BAND, P. United States Patent n. 4,713,448, 1987.
- BALAZS, E. A. Viscoelastic propeties of hyaluronan and its therapeutic use. In GARG, H. G., HALES C. A. (Eds). *Chemistry and biology of hyaluronan*. Amsterdam: Elsevier, 2004, p. 145,.
- BAND, P. A. Hyaluronan derivatives: chemistry and clinical applications. In: LAURENT TC, Editor. *The chemistry biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*. London: Portland Press, 1998, p. 33-42.

- BARBUCCI, R., LAMPONI, S., BORZACCHIELLO, A., AMBROSIO, L. Synthesis, chemical e rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels. *Journal Biomaterials Science. Polymer Edition.*, v. 11, n. 4, p. 383-399, 2000.
- BARBUCCI, R., LAMPONI, S., BORZACCHIELLO, A., AMBROSIO, L. TORRICELLI, P., GIARDINO, R. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, v. 23, p. 4503–4513, 2002.
- BARBUCCI, R., LAMPONI, S., MAGNANI, A., POLETTI, L. F., RHODES, N. P., SOBEL, M., WILLIAMS, D. F. The influence of sulfation on platelet aggregation and activation with differently sulfated hyaluronic acids. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 6, p. 109–115, 1998.
- BARBUCCI, R., MAGNANI, A., LAMPONI, S., RAPPUOLI, R., CONSUMI, M. Hyaluronan derivatives: chemical modifications and biochemical applications. In: ABATANGELO, G., WEIGEL, P. H., Editors, *New Frontiers in Medical Science: Redefining Hyaluronan*, Oklahoma, USA: Elsevier, 2000, p. 203-212.
- BARNES, H. A., HUTTON, J. F., WALTERS, K. *An introduction to rheology*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989, p.199.
- BERGERET-GALLEY, C. Comparison of Resorbable Soft Tissue Fillers. *Aesthetic surgery journal*, v. 24, n. 1, p. 33-46, 2004.
- BITTER, T., MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 4, p. 330-334, 1962.
- BOZZI, L., MILAS, M., RINAUDO, M. Solution and gel rheology of a new polysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas* sp. Strain 1644. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 18, p. 83–91, 1996.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BROWN, M. B., JONES, S. A. Hyaluronic acid: unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *European Academy of Dermatology and Venereology JEADV*, v. 19, p. 308-318, 2005.
- CAMPBELL, J., RUDDOCK, B. Hyaluronic acid products for osteoarthritis of the knee. *Focus on Patient Care C P J / R P C.*, v. 140, n. 3, p. 194-196, 2007.
- CAMPOCCIA, D., DOHERTY, P., RADICE, M., BRUN, P., ABATANGELO, G., WILLIAMS, D. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, v. 19, p. 2101-2127, 1998.
- CHATEAU, X., OVARLEZ, O., TRUNG, K. L. Homogenization approach to the behavior of suspensions of noncolloidal particles in yield stress fluids. *Journal of Rheology*, v. 52, n. 2, p. 489-506, 2008.
- CHEN, P. S., TORIBARA, T., Y., WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, v. 28, p.1756-1758, 1956.
- CHRONAKIS, I. S., KASAPIS, F., Food applications of biopolymers - theory and practice. In: CHARALAMBOUS, G. *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*, Amsterdam, 1995, p. 75-109.
- CLARK, A. H., ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, v. 83, p. 57-192, 1987.
- COIMBRA, I. B., PASTOR, E. H., D'ANDREA GREVE, J. M., PUCCINELLI, M. L. C., FULLER, R., CAVALCANTI, F. S., MACIEL, F. M. B., HONDA, E. Brazilian consensus for the treatment of osteoarthritis. *Revista Brasileira de Reumatologia.*, v. 42, n. 6, p. 371-374, 2002.
- COLLINS, M. N., BIRKINSHAW, C. Investigation of the Swelling Behavior of Crosslinked Hyaluronic Acid Films and Hydrogels Produced Using Homogeneous Reactions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, p. 923-931, 2008.

- COLLINS, M. N., BIRKINSHAW, C. Comparison of the Effectiveness of Four Different Crosslinking Agents with Hyaluronic Acid Hydrogel Films for Tissue-Culture Applications. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 104, p. 3183–3191, 2007.
- CORADINI, D., PELLIZARO, C., MIGLIERINI, G., DAIDONE, M. G., PERBELLINI, A. Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line. *International Journal of Cancer*, v. 81, p. 411-416, 1999.
- COX, W. P., MERZ, E. H. Correlation of Dynamic and Steady Flow Viscosities. *Journal of Polymer Science*, v. 28, p. 619, 1958.
- COWMAN, M. K., MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 791–809, 2005.
- DA SILVA, N. A., MONTANDON, A. C. O. S., CABRAL, M. V. S. P. Doenças osteoarticulares degenerativas periféricas. *Einstein*, v. 6, n. 1, p. S21-28, 2008.
- ELIAZ, R. E, SZOKA JR., F. C. Liposome-encapsulated Doxorubicin Targeted to CD44: A Strategy to Kill CD44-overexpressing Tumor Cells. *Cancer Research*, v. 61, n. 15, p. 2592–2601, 2001.
- FALCONE, S. J., BERG, R. A. Crosslinked hyaluronic acid dermal fillers: a comparison of rheological properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, p. 264-271, 2008.
- FRANÇOIS, B. Regiments for intra-articular viscosupplementation. United States Patent n. 0,148,755 A1, 2006.
- FROST & SULLIVAN. Total Hyaluronic Acid-based Biomaterials Markets, 2004. In GARG, H. G., HALES, C. A. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, Boston, USA: Elsevier, 2004.
- GARG, H. G., HALES, C. A. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Boston: Elsevier, 2004.

- GATEJ, I., POPA, M., RINAUDO, M., Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 61-67, 2005.
- GOSH, S., KOBAL, I., ZANETTE, D., REED, W. F. Conformational contraction and hydrolysis of hyaluronate in sodium hydroxide solution. *Macromolecules*, v. 26, p. 4685, 1993.
- GREENBERG, D. D., STOKER, A., KANE, S., COCKRELL, M., COOK, J. L. Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthritic Cartilage*, vol. , p. 814–822, 2006.
- GUELCHER, S. A., HOLLINGER, J. O. *An introduction to biomaterials (The Biomedical engineering series)*, CRC Taylor & Francis, 2006.
- HAHN, S. K., OH, E. J., MIYAMOTO, H., SHIMOBOUJI, T. Sustained release formulation of erythropoietin using hyaluronic acid hydrogels crosslinked by Michael addition. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 322, p. 44-51, 2006.
- HAXAIRE, K., MARÉCHAL, Y., MILAS, M., RINAUDO, M. Hydration of Polysaccharide Hyaluronan Observed by IR Spectrometry. I. Preliminary Experiments and Band Assignments. *Biopolymers (Biospectroscopy)*, v. 72, p.10–20, 2003.
- HARDINGHAM, T. Solution properties of hyaluronan. In: GARG, H. G., HALES, C. A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. Ed. Oxford: Elsevier, 2004, p. 1-19.
- HARUO, S., YOSHIRIRO, T. Skin cosmetic. European Patent Office n. JP 186014, 2000.
- HASCALL, V. C., LAURENT, T.C. Hyaluronan: Structure and physical properties. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>> Acesso em 16/07/2009.
- HIMEDA, Y., UMEDA, T., MIYATA, Y., MIYOSHI, T. Application of biocompatible gel of hyaluronic acid in adhesion prevention. *Journal of Gynecologic Surgery*, v. 20, n. 2, p. 39-46, 2004.
- HOEFLING, J. M., COWMAN, M. K., MATSUOKA, S., BALAZS, E. A. Temperature Effect

on the Dynamic Rheological Characteristics of Hyaluronan, Hylan A, and Synvisc. In KENNEDY, J. F., PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A. *Hyaluronan*. Eds. Woodhead: Cambridge, 2002, p. 103–108.

HOFFMANN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 43, p. 3–12, 2002.

HOLMSTRÖM, B., RICICI, J. Production of Hyaluronic Acid by a Streptococcal Strain in Batch Culture. *Applied Microbiology*, v. 15, p. 1409-1413, 1967.

<<http://my.clevelandclinic.org>> Acesso em 10/02/2011.

<<http://www.medisave.ca>> Acesso em 10/02/2011.

<<http://www.q-med.com>> Acesso em 10/02/2011.

<<http://www.synvisc.com>> Acesso em 10/02/2011.

IKEDA, S., NISHINARI, K. “Weak Gel-Type Rheological Properties of Aqueous Dispersions of Nonaggregated κ -Carrageenan Helices”. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, v. 49, p. 4436-4441, 2001.

INTERNATIONAL STANDARD. ISO 10993-1. *Biological evaluation of medical devices*. Part 1: Evaluation and testing, 1997.

INTERNATIONAL STANDARD. ISO 10993-5 I (E) *Biological evaluation of medical devices*. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.

JUDODIHARDJO, H., DYKES, P. Objective and Subjective Measurements of Cutaneous Inflammation after a Novel Hyaluronic Acid Injection. *Dermatologic Surgery*, v. 34, p. S110–S114, 2008.

KABLIK J, MONHEIT GD, YU L, CHANG G, GERSHKOVICH J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surgery*., v. 35, n. 1, p. 302–312, 2009.

- KHONDKAR, D., TESTER, R. F., HUDSON, N., KARKALAS, J., MORROW, J. Rheological behavior of uncross-linked and cross-linked gelatinised waxy maize starch with pectin gels. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 1296-1301, 2007.
- KIM, S. J., HAHN, S. K., KIM, M. J., KIM, D. H., LEE, Y. P. Development of a novel sustained release formulation of recombinant human growth hormone using sodium hyaluronate microparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 104, p. 323-335, 2005.
- KIM, C., YOO, B. Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 120–128, 2006.
- KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R. Hyaluronic Acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letter*, v. 29, p.17-25, 2007.
- KUO, J. W., SWANN, D. A., PRESTWICH, G. D. Water-insoluble derivatives of hyaluronic acid and their methods of preparation and use. United States Patent n. 6,013,679, 2000.
- KUO, J. W., SWANN, D. A., PRESTWICH, G. D. Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chemistry*, v. 2, p. 232–241, 1991.
- LAPČÍK JR., L., LAPČÍK, L., DE SMEDT, S., DEMEESTER, J., CHABREČEK, P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*, v. 98, n. 8, p. 2663-2682, 1998.
- LARSEN, N. E., POLLACK, C. T., REINER, K., LESHCHINER, E., BALAZS, E. A. Hyalan gel biomaterial: dermal and immunologic compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 27, p. 1129-1134, 1993.
- LASIC, D. D. *Liposomes, from Physics to therapeutics*, New York: Elsevier, 1993.
- LAURENT, T. C., FRASER, J. R. E. Hyaluronan. *FASEB Journal*, v. 6, p. 2397-2404, 1992.
- LEACH, J. B., SCHMIDT, C. E. Hyaluronan. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical*

- Engineering, New York: Marcel Dekker, Inc., 2004, p. 779-789.
- LESHCHINER, A. K., KONOWICZ, P. A., VASILYEVA, V. Géis coesos a partir de hialuronano e/ ou hilano reticulados, sua preparação e uso. Patente Brasileira: PI n. 04118309-6 A, 2007.
- LESHCHINER, A. K., KONOWICZ, P., CHANG, M-Y. G., VASILYEVA, V., Polymeric Materials, their preparation and use. United States Patent n. 0036745 A1, 2007.
- LESHCHINER, A. K., KONOWICZ, P. A., VASILYEVA, V. Cohesive gels form cross-linked hyaluronan and/or Hylan, their preparation and use. World Intellectual Property Organization n. 066215-A1, 2006.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LOWE, N. J., MAXWELL, C. A., LOWE, P., DUICK, M. G., SHAH, K. Hyaluronic acid skin fillers: adverse reactions and skin testing. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 45, p. 930-933, 2001.
- MACEDO, A. C., **Estudo da produção de ácido hialurônico por fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* em substrato de caju (*Anacardium occidentale L.*)**. 2006. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. (Dissertação de Mestrado).
- MAGNANI, A., ALBANESE, A., LAMPONI, S., BARBUCCI, R. Blood-interaction performance of differently sulphated hyaluronic acid. *Thrombosis Research*, v. 81, p. 383-395, 1996.
- MASON, M., VERCRUYSSSE, K. P., KIRKER, K. R., FRISCH, R., MARECAK, D. M., PRESTWICH, G. D., PITT, W. G. Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene, and polytetrafluoroethylene. *Biomaterials*, v. 21, p.31-36, 2000.
- MELANDER, C., TØMMERAAS, K. The influence of sodium hyaluronate molecular weight on protein content according to Lowry and Coomassie blue assays. *Carbohydrate Polymers*,

- v. 74, p.745–748, 2008.
- MENDIETA-TABOADA, O., DE CARVALHO, R. A., SOBRAL, P. J. A. Análise Dinâmico-Mecânica: Aplicações Em Filmes Comestíveis. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 384-393, 2008.
- MEYER, K., PALMER, J. The polysaccharide of vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 107, p. 629-634, 1934.
- MENSITIERI, M., AMBROSIO, L., NICOLAIS, L., BALZANO, L., LEPORE, D., The rheological behaviour of animal vitreus and its comparison with vitreal substitutes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 5, p. 743, 1994.
- MILAS, M., RINAUDO, M., AL-ASSAR, S., WILLIAMS, P. A. Comparative Rheological Behavior of Hyaluronan from Bacterial and Animal Sources with Cross-Linked Hyaluronan (Hylan) in Aqueous Solution. *Biopolymers*, v. 59, p. 191–204, 2001.
- MIYOSHI, E., NISHINARI, K. Non-Newtonian flow behaviour of gellan gum aqueous solutions. *Colloid and Polymer Science*, v. 277, p. 727, 1999.
- MOCHIZUKI, S., KANO, A., YAMAYOSHI, A., MARUYAMA, A. Hyaluronan conjugation of antigenic protein to modify immunogenic information. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 7, p. 685–691, 2006.
- MONHEIT, G. D., COLEMAN, K. M. Hyaluronic Acid Fillers. *Dermatologic Therapy*, v. 19, p. 141-150, 2006.
- MUELLER, S., LLEWELLIN, E. W, MADER, H. M. The rheology of suspensions of solid particles. *Proc. R. Soc. A*, v. 466, p. 1201–1228, 2010.
- MUNTEANU, S. E., MENZ, H. B.; ZAMMIT, G. V., LANDORF, K. B.; HANDLEY, C. J., ELZARKA, A., DELUCA, J. Efficacy of intra-articular hyaluronan (Synvisc®) for the treatment of osteoarthritis affecting the first metatarsophalangeal joint of the foot (hallux

- limitus): study protocol for a randomised placebo controlled trial. *Journal of Foot and Ankle Research*, v. 2, n. 2, p.1-12, 2009.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISSO 10993, Avaliação Biológica de produtos para saúde. Parte 1 Avaliação e Ensaio, 1999.
- OERTHER, S., MAURIN, A. C., PAYAN, E., HUBERT, P., LAPICQUE, F., PRESLE, N., DEXHEIMER, J., NETTER, P., LAPICQUE, F. High Interaction Alginate-hyaluronate Associations by Hyaluronate Deacetylation for the Preparation of Efficient Biomaterials. *Biopolymers*, v. 54, p. 273-281, 2000.
- OGRODOWSKI, C. S. **Produção de ácido hialurônico por Streptococcus: estudo da fermentação de caracterização do produto.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. (Tese de Doutorado).
- OHRI, R., HAHN, S. K., STAYTON, P. S., HOFFMAN, A. S., GIACHELLI, M. Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 70 A, p. 159–165, 2004.
- OLIVEIRA, A. H. S. **Produção e Caracterização do ácido hialurônico obtido por fermentação do suco de caju com Streptococcus zooepidemicus.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2004. (Dissertação de Mestrado).
- PIRES, A. M. B., **Estudos metabólicos para otimização de condições nutricionais e de cultivo para produção microbiana de ácido hialurônico.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009 (Tese de Doutorado).
- PRESTWICH, G. D. Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. Disponível em: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html> Acesso em 07/02/2011.
- PRESTWICH, G. D., MARECAK, D. M., MARECEK, J. F., VERCRUYSSSE, K. P., ZIEBELL, M. R. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*, v. 53, p. 93–103, 1998.

- RAMKUMAR, D. H. S., BHATTACHARYA, M. Relaxation behaviour and the application of integral constitutive equations to wheat dough. *Journal of Texture Studies*, v. 27, p.517–544, 1996.
- ROMAGNOLI, M.; BELMONTESI, M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. *Clinics in Dermatology*, v. 26, p. 123-159, 2008.
- RUHELA, D., RIVIERE, K., SZOKA JR., F.C. Efficient synthesis of an aldehyde functionalized hyaluronic acid and its application in the preparation of hyaluronan-lipid conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, v. 17, 1360-1363, 2006.
- SCHNITZER, E., DAGAN, A., KRIMSKY, M., LICHTENBERG, D., PINCHUK, I., SHINAR, H., YEDGAR, S. Interaction of hyaluronic acid-linked phosphatidylethanolamine (HyPE) with LDL and its effect on the susceptibility of LDL lipids to oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 104, p. 149–160, 2000.
- SCHRAMM, G. *Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos*, 2 ed., São Paulo: Artliber, 2006.
- SADOZAI, K. K., GOODING, T. B., BUI, K., SHERWOOD, S. Crosslinked hyaluronic acid for tissue augmentation. United States Patent n. 0136122 A1, 2005.
- SHU, X. Z., LIU, Y, PALUMBO, F. S., LUO, Y., PRESTWICH, G. D. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 25, p. 1339–1348, 2004.
- SHU, X. Z., PRESTWICH, G. D. Therapeutic Biomaterials from Chemically Modified Hyaluronan in Chemistry and Biology of Hyaluronan. In: GARG, H.G., HALES, C.A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1. Ed. Oxford: Elsevier, 2004, p. 1-19.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, New York, USA: Jonh Wiley & Sons, Inc., 1963

- SMEDS, K. A., PFISTER-SERRES, A., HATCHELL, D. L., GRINSTAFF, M. W. Synthesis of novel polysaccharide hydrogel. *JMS - Pure and Applied Chemistry A*, v. 36, p. 981-989, 1999.
- STEFFE, J. F. *Rheological methods in food process engineering*, 2. ed, East Lansing: Freeman Press, 1996.
- SURACE, C., ARPICCO, S., DUFAÏ-WOJCICKI, A., MARSAUD, V., BOUCLIER, C., CLAY, D., CATTEL, L., RENOIR, J. M., FATTAL, E. Lipoplexes Targeting the CD44 Hyaluronic Acid Receptor for Efficient Transfection of Breast Cancer Cells. *Molecular Pharmaceutics*, v. 6, n. 4, p.1062–1073, 2009.
- SWANN, D., KUO, J., PINSKY, V. Steam-sterilizing solid hyaluronic acid. United States Patent n. 5,621,093, 1997.
- TAE-SEOK, M., JAE-YOUNG, L., JIN-HOON, K., KYUBOEM, H. Crosslinked amide derivatives of hyaluronic acid and manufacturing method thereof. European Patent Office n. US 014960, 2004.
- TAETZ, S., BOCHOT, A., SURACE, C., ARPICCO, S., RENOIR, J. M., SCHAEFER, U. F., MARSAUD, F., Kerdine-Roemer, S., LEHR, C. M., FATTAL, E. Hyaluronic Acid-Modified DOTAP/DOPE Liposomes for the Targeted Delivery of Anti-Telomerase siRNA to CD44-Expressing Lung Cancer Cells. *Oligonucleotides*, v. 19, n. 2, 103-115, 2009.
- VERCRUYSSSE, K. P., PRESTWICH, G. D. Hyaluronate derivatives in drug delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 15, p. 513-555, 1998.
- WEISSMAN, B., MEYER, K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *Journal of the American Chemistry Society*, v. 76, p.1753-1757, 1954.
- WEST, D. C., HAMPSON, I. N., ARNOLD, F., KUMAR, S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, v. 228, p.1324–1326, 1985.

- WOBIG, M., DICKHUT, A., MAIER, R., VETTER, G. Viscosupplementation with hylan G-F 20: a 26 week controlled trial of efficacy and safety in the osteoarthritis joint. *Clinical Therapeutics*, v. 20, p. 410-231, 1998.
- WOBIG, M., BACK, G., BEKS, P., DICKHUT, A., RUNZHEIMER, J., SCHWIEGER, G., VETTER, G., BALAZS, E., The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis in the knee: A comparison of Hylan G-F20 and a lower-molecular weight hyaluronan. *Clinical Therapeutics, Excerpta Medica, Inc.*, v. 21, n. 9, p.1549-1562, 1999.
- WON, T. Y., LEE, C., SEO, S. H. Method for purifying hyaluronic acid. World Intellectual Property Organization WIPO n. WO 062998, 2008.
- XU, X., LIU, W., ZHANG, L. Rheological behavior of Aeromonas gum in aqueous solutions, *Food Hydrocolloids*, v. 20, p. 723–729, 2006.
- XUEJUN, X., NETTI, P. A., AMBROSIO, L., NICOLAIS, L., SANNINO, A. Preparation and characterization of a hydrogel from low-molecular weight hyaluronic acid, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 19, p. 5-15, 2004.
- YASUGI, K., NAKAMURA, T., SHIMOBOJI, T., SATO, M. PROCESS FOR PRODUCING WATER-SOLUBLE HYALURONIC ACID MODIFICATION. European Patent n. EP 1,790,665 A1, 2007.
- YERUSHALMI, N., MARGALIT, R. Hyaluronic Acid-Modified Bioadhesive Liposomes as Local Drug Depots: Effects of Cellular and Fluid Dynamics on Liposome Retention at Target Sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 349, n. 1, p. 21–26, 1998.
- ZARDAWI, I. M., CHAN, I. Synvisc Perisynovitis. *Pathology*, v. 33, p. 519-520, 2001.
- ZAWKO, S. A., SURI, S., TRUONG, Q., SCHMIDT, C. E. Photopatterned anisotropic swelling of dual-crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 14–22, 2009.

ANEXO A

Curva de calibração usada na determinação da concentração de AH pelo Método do Carbazol Modificado (Bitter & Muir, 1962).

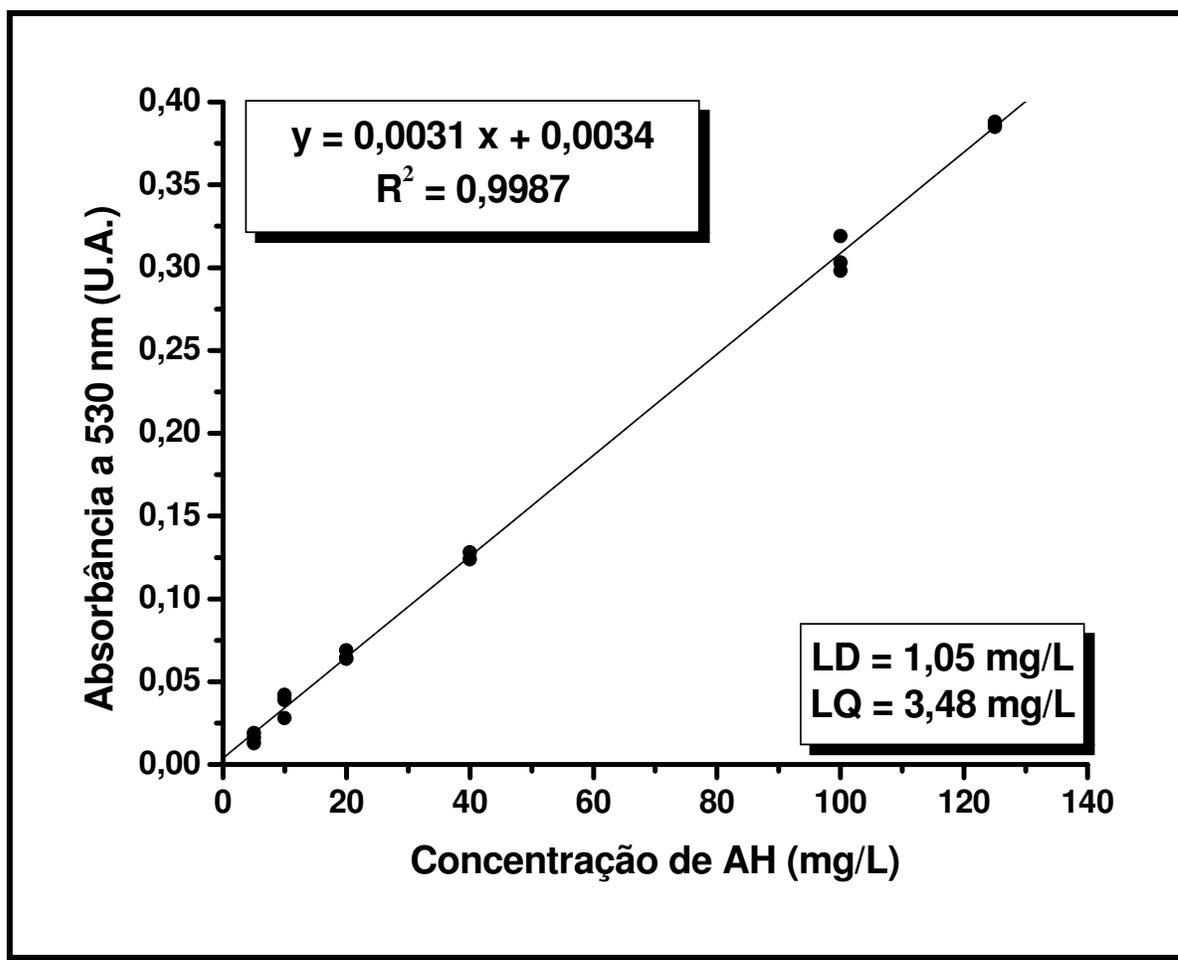


Figura A.1

Curva padrão usada para a calibração do método de determinação da concentração de AH.
(LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação).

ANEXO B

Curva padrão e cromatograma obtidos na determinação da massa molar do AH por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) utilizando coluna de filtração em gel Polysep-GFC-P6000 (300 x 7,8 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA); e nitrato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) a uma vazão de 1 mL.minuto^{-1} como fase móvel isocrática.

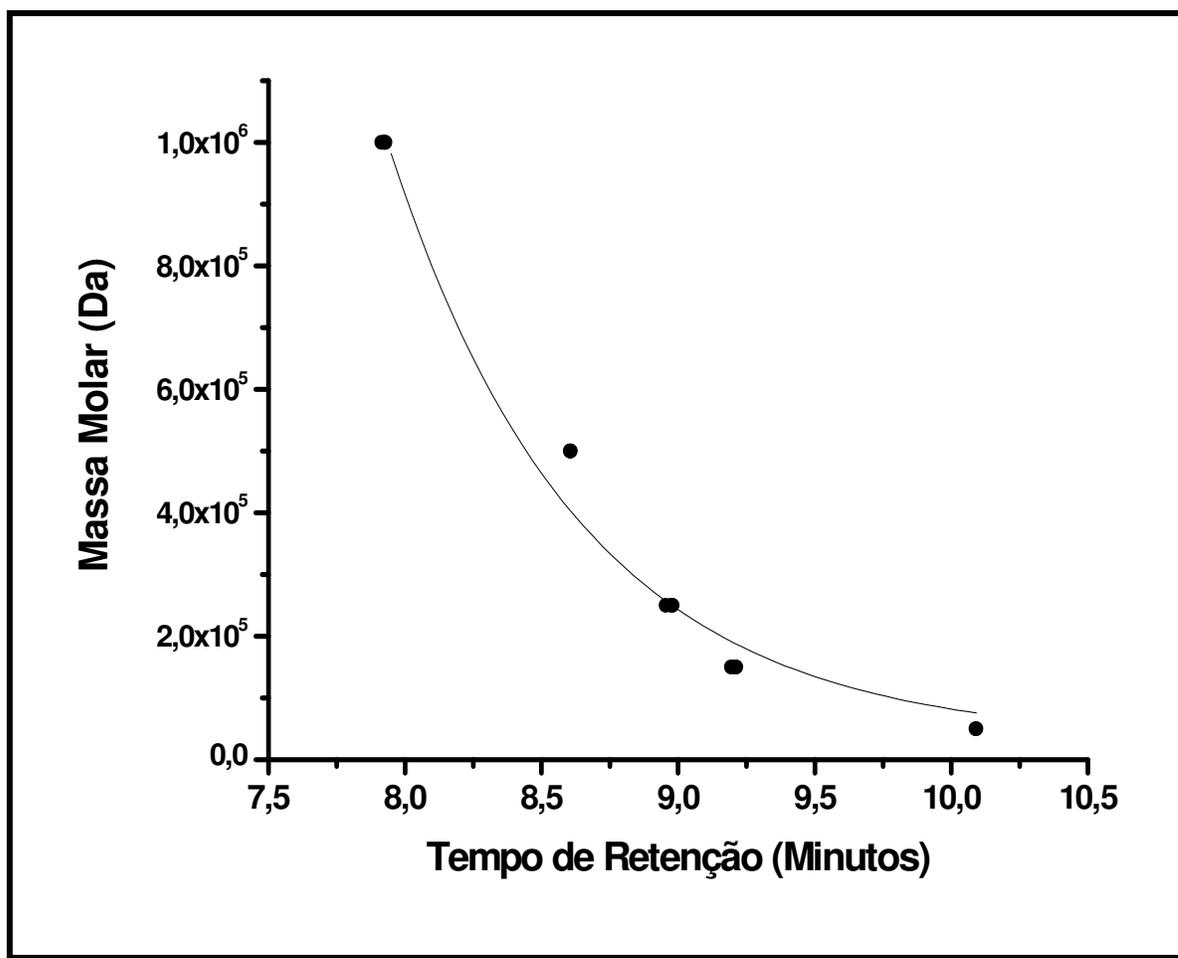


Figura B.1

Comportamento da Massa Molar do Ácido Hialurônico em função do tempo de retenção da amostra.

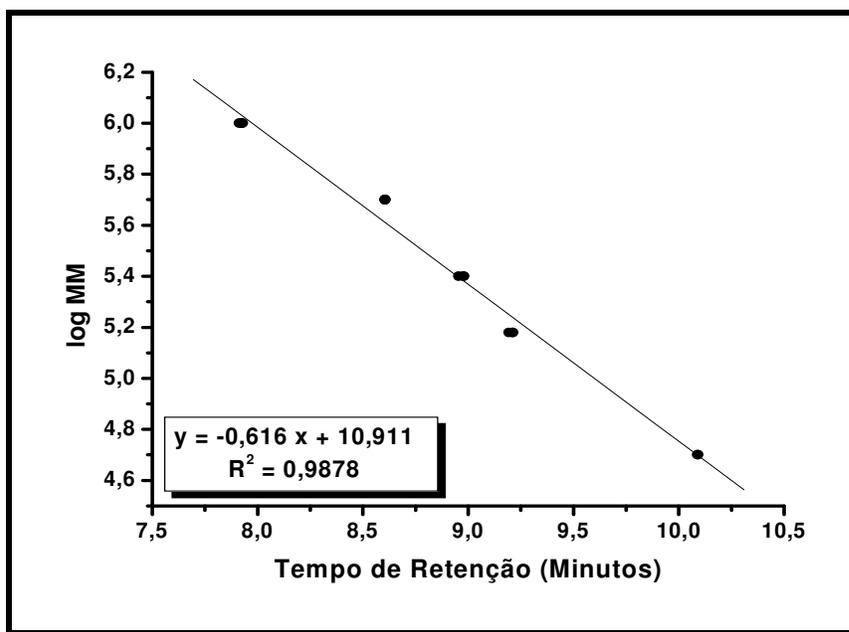


Figura B.2

Curva linearizada para a calibração do método de determinação da massa molar do AH.

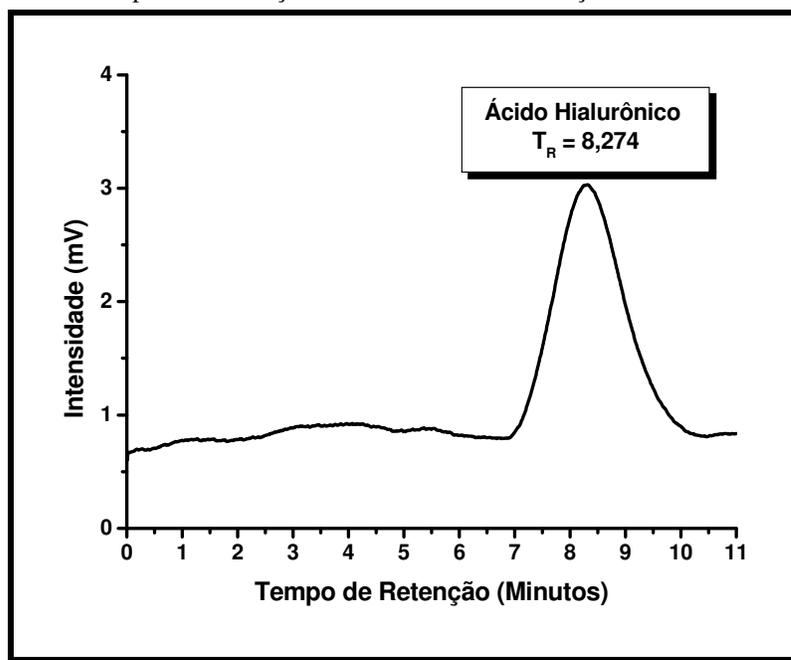


Figura B.3

Cromatograma de um padrão de AH (Hylumed, Genzyme Corporation Cambridge, Massachusetts, USA; $C = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $MM = 6,5 \times 10^5 \text{ Da}$); coluna de filtração em gel Polysep-GFC-P6000 (300 x 7,8 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA); fase móvel isocrática = nitrato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$); vazão = 1 mL.minuto^{-1} , temperatura = 25°C .

ANEXO C

Curva de calibração usada na determinação da concentração de proteínas pelo Método de Bradford (1951).

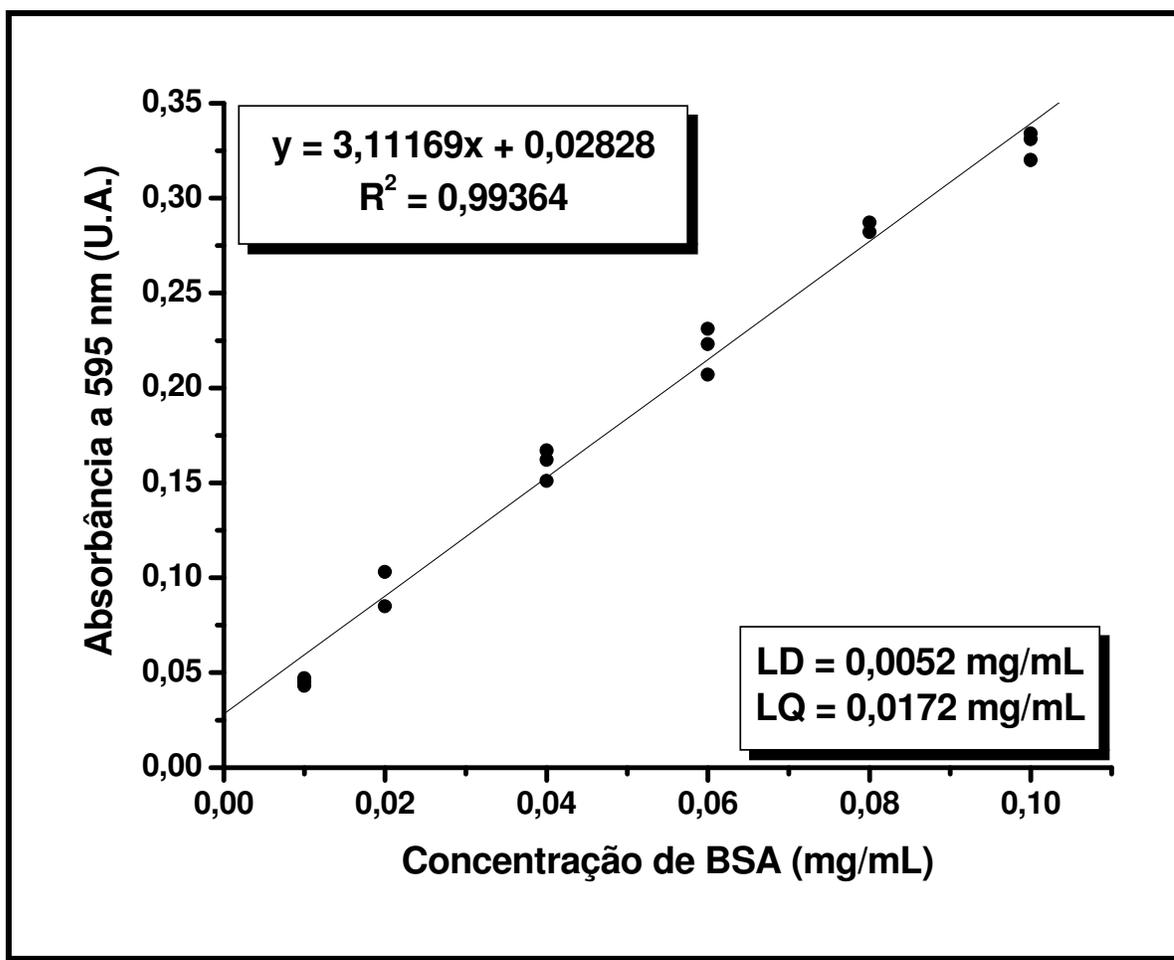


Figura C.1
Curva padrão usada para a calibração do método de determinação de proteínas.

ANEXO D

Curva de calibração usada na determinação da concentração de proteínas pelo Método de Lowry (1951).

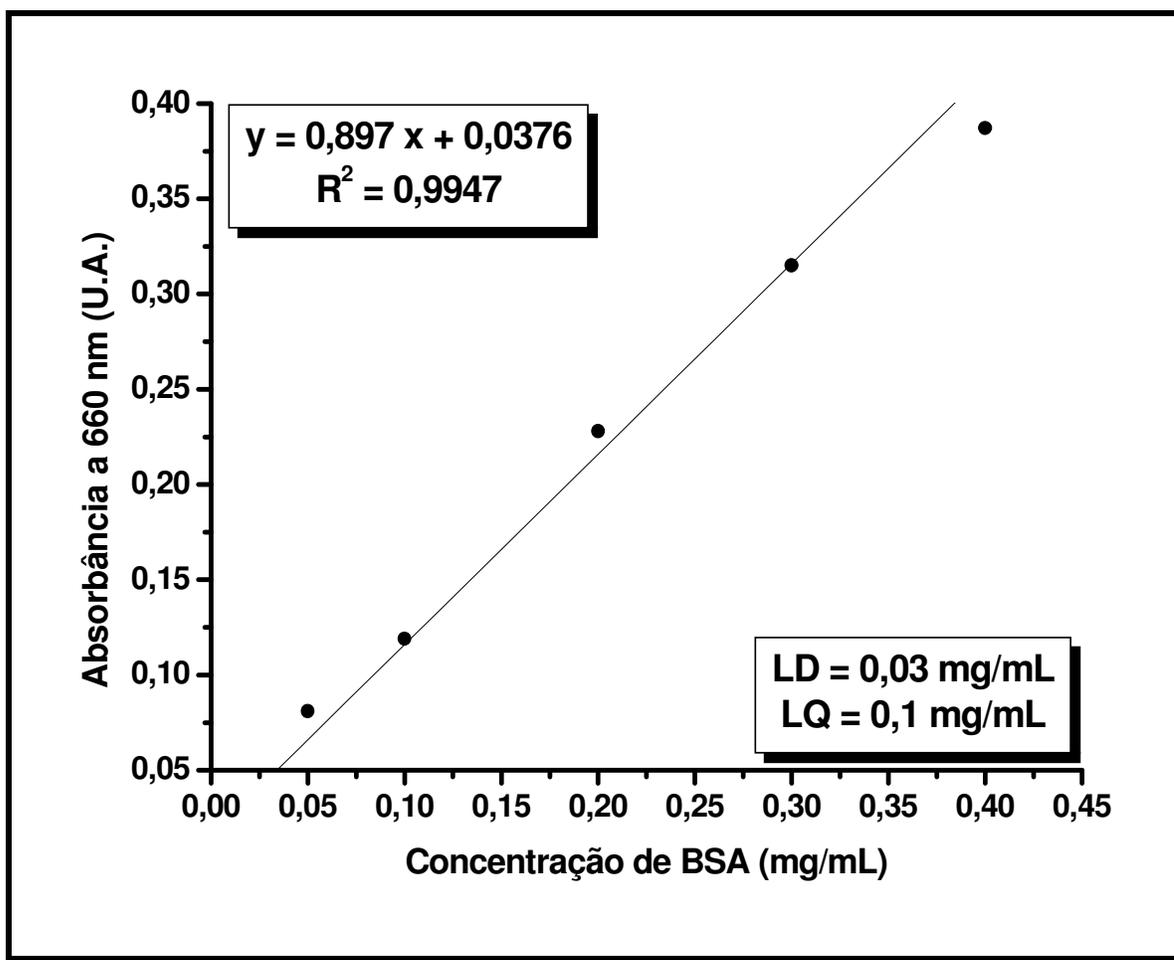


Figura D.1
Curva padrão usada para a calibração do método de determinação de proteínas.

ANEXO E

Avaliação da Citotoxicidade Indireta - Ensaio de Viabilidade pelo Método de Incorporação do Vermelho Neutro

Materiais e métodos. Foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos originária de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. Esta linhagem celular foi adotada por ser uma linhagem recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais. As células VERO foram cultivadas em meio Ham F-12 (Nutricell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) e com 1% de penicilina e estreptomicina (PS, Gibco). As células foram mantidas a 37°C em incubadora de CO₂ (Sanyo Scientific, USA).

Avaliação da Citotoxicidade Indireta: Ensaio de Viabilidade pelo Método de Incorporação do Vermelho Neutro. Neste ensaio foi avaliada a viabilidade de células Vero frente ao extrato da amostra por meio da incorporação do corante vermelho neutro. Foi inoculada uma suspensão celular na concentração de 3×10^6 células.mL⁻¹ em placa de cultura de 96 poços (n=5). A placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Soluções de meio Ham F-12 com 10% de fenol (CPT) e extrato de poliestireno (CNT) foram utilizadas como controles. Após 24 horas, o meio de cultura presente na placa foi substituído pelo extrato da amostra (replicatas 1, 2, 3, 4 e 5), e a placa foi incubada por um período de 24 horas. Decorrido o período de incubação o extrato foi desprezado e foi adicionado em cada poço 200 µL de meio MEM (meio mínimo essencial) contendo 50 µg/mL de vermelho neutro. Após 3 horas o meio foi removido e os poços foram lavados com 200 µL de PBS, seguido de outra lavagem com solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) em formaldeído (1% de CaCl₂ em formaldeído 0,5%). Foi adicionado então, 200 µL de ácido acético (CH₃COOH) em etanol (1% de CH₃COOH em etanol 50%). A placa foi mantida em agitação por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura de absorbância foi realizada em leitor de Microplacas (Microplate Reader DNM 9602, Beijing Perlong New Technology Co, Ltd.) em comprimento de onda de 540 nm. A análise estatística foi feita usando One Way Anova, com nível de significância de 0,05.

ANEXO F

Avaliação da Citotoxicidade Indireta - Ensaio de Viabilidade pelo Método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium)

Materiais e métodos. Foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos originária de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. Esta linhagem celular foi adotada por ser uma linhagem recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais. As células VERO foram cultivadas em meio Ham F-12 (Nutricell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) e com 1% de penicilina e estreptomicina (PS, Gibco). As células foram mantidas a 37°C em incubadora de CO₂ (Sanyo Scientific, USA).

Avaliação da Citotoxicidade Indireta: Ensaio de Viabilidade pelo Método do MTT. Para o teste de viabilidade celular pelo método do MTT, amostras foram incubadas em placa de cultura de 24 poços na proporção de 0,2 g de material por mL de meio Ham F-12 suplementado com 10% de SFB. As amostras (n=5) permaneceram nestas condições por um período de 48 horas, previamente à inoculação celular. Uma suspensão celular na concentração de 3×10^6 células/mL foi inoculada em placa de cultura de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) e esta placa foi cultivada por 24 horas a 37°C. Após período de incubação de 24 horas, o meio de cultura contido na placa de 96 poços foi substituído pelo meio de cultura no qual as amostras de AH foram mantidas. As células foram então cultivadas por mais 24 horas para verificar a possível liberação de substâncias tóxicas para o meio de cultura no qual as amostras permaneceram imersas por 48 horas. CPT foi utilizado como controle positivo de toxicidade e CNT como controle negativo de toxicidade. Decorrido o período de cultivo de 24 horas, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com 200 µL de PBS. Após este procedimento foi adicionado 200 µL de meio Ham F-10 com 10 mM de tampão Hepes e 50 µL MTT Sigma (5µg/mL em PBS) e a placa de cultura foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C. Decorrido este período, o meio com o MTT foi substituído por 200 µL de DMSO e a placa foi mantida em incubadora de CO₂ por mais 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Microplacas (Microplate Reader DNM 9602, Beijing Perlong New Technology Co, Ltd.) em comprimento de onda de 540 nm. Foram utilizados como controle de reação, poços onde não houve o cultivo de células, nos quais foram adicionados os mesmos reagentes descritos anteriormente.

ANEXO G

Curva de calibração usada na determinação da concentração de fosfato (Chen *et al.*, 1956).

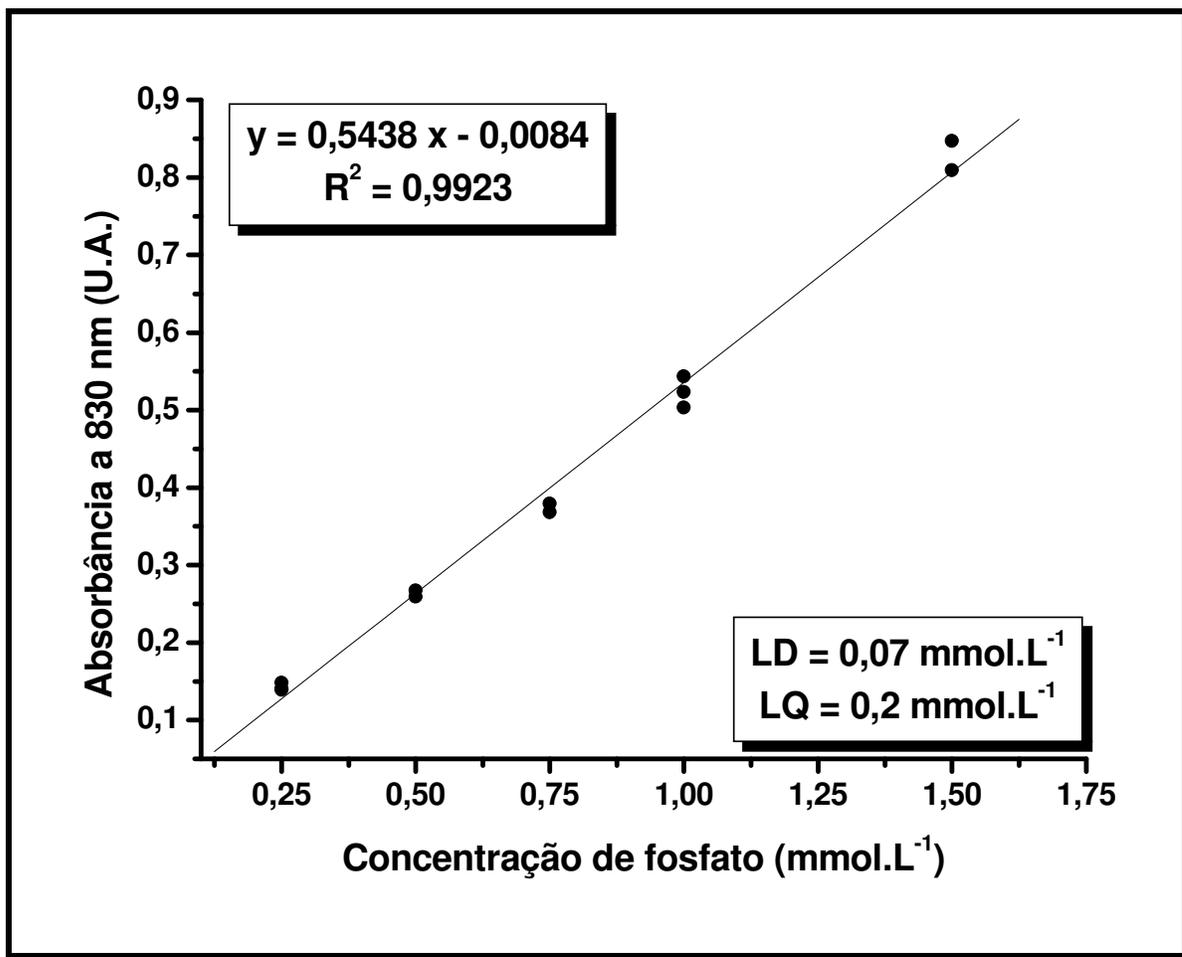


Figura F.1

Curva padrão usada para a calibração do método de determinação de fosfato.