

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA AMADO MARTIN

INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE SISTEMAS CONTENDO ÁCIDO
HIALURÔNICO E GALACTOMANANAS E A APLICAÇÃO COMO UM
BIOATIVO

CURITIBA

2019

ANDRESSA AMADO MARTIN

INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE SISTEMAS CONTENDO ÁCIDO
HIALURÔNICO E GALACTOMANANAS E A APLICAÇÃO COMO UM
BIOATIVO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Rita Sierakowski

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

M379i

Martin, Andressa Amado

Interações físico-químicas de sistemas contendo ácido hialurônico e galactomananas e a aplicação como um bioativo [recurso eletrônico] / Andressa Amado Martin. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

Orientador: Maria Rita Sierakowski .

1. Ácidos. 2. Ácido hialurônico. 3. Polissacarídeos. 4. Galactomanana. 5. Guar. 6. Alfarroba. I. Universidade Federal do Paraná. II. Sierakowski, Maria Rita. III. Título.

CDD: 546.24

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



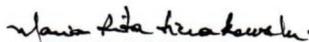
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

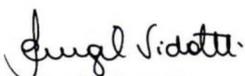
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANDRESSA AMADO MARTIN** intitulada: **Interações físico-químicas de sistemas contendo ácido hialurônico e galactomananas e a aplicação como um bioativo**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA RITA SIERAKOWSKI, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

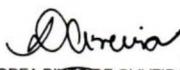
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Setembro de 2019.


MARIA RITA SIERAKOWSKI
Presidente da Banca Examinadora


FARMEN LUCIA DE OLIVEIRA PETKOWICZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ANDREA PINTO DE OLIVEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esta tese à minha família,
Roberto e Vanilda, Vitor e Enio,
que sonharam este sonho comigo
e estiveram ao meu lado em todos os momentos.
Meu obrigada, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por Seu eterno amor que me amparou para que eu chegasse até aqui. Obrigada meu Deus, pelas pessoas que colocou em meu caminho, por permitir cada acontecimento nessa caminhada. Obrigada pelos dons que me presenteia a cada dia.

À minha família, com todo meu coração, obrigada! Obrigada por acreditarem em mim, quando eu não mais acreditava. Pelos abraços cheios de saudade nos nossos reencontros, a distância física só aumentou o nosso amor. Com carinho a minha mamãe, pela nossa ligação de corações e pelos “colos” por telefone. Aos meus avós maternos, por todo amor e pelo que representam na minha vida.

À professora Maria Rita, com quem tanto aprendi. Obrigada por confiar em mim, por me aceitar e orientar desde o mestrado. Obrigada por me ajudar a evoluir e amadurecer como pessoa e profissional. Por tantas vezes que me acolheu, obrigada!

Aos que me receberam no laboratório Biopol, em especial, Renata, Vivian, Cleverton e Guilherme, obrigada pelo bom convívio que tivemos, ajudas no lab e por permanecerem como amigos.

Aos meus amigos, aos de perto e aos de longe.

Aos de perto que a vida científica me presenteou e incluiu a república “Casa do Marão”, pelas ajudas na química e na química da vida, pelos que moraram na nossa casa e passaram pela minha vida, a nossa mão estendida um para o outro sempre foi o nosso diferencial.

Aos amigos de longe... O título de “capital da amizade” que Umuarama leva, minha terra natal, fez mais sentido quando eu vim morar na capital do Paraná. Obrigada aos meus amigos que permaneceram durante essa caminhada, por aceitarem a minha ausência, pelo apoio e compreensão. Aos nossos encontros cheios de abraços e sorrisos, que sempre me deixaram coisas boas e perfumaram meus caminhos.

Ao Centro de Ressonância Magnética Nuclear – UFPR, em especial ao professor Guilherme Lanzi Sasaki, que nos recebeu e ajudou para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, onde foram feitas as análises *in vitro* em parceria com a Prof^a Dr^a Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, Dr^a Ana Carolina Irioda e Msc Bassam Felipe Mogharbel. Onde eu tive a oportunidade de conhecer uma área nova, que foi importante para esta tese, e pessoas boas que não pouparam esforços e paciência em me ensinar.

Às bancas examinadoras que avaliaram o nosso trabalho na qualificação do doutorado, professoras Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia e Fernanda Fogagnoli Simas, obrigada pelas contribuições que nos ajudaram.

Às bancas examinadoras para conclusão do doutorado, professores Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata, Andrea Pinto De Oliveira, Carmen Lucia Petkowicz e Charles Windson Isidoro Haminiuk, obrigada por aceitarem contribuir com o nosso trabalho.

Agradeço aos professores que passaram pela minha vida, desde o maternal até a Pós-Graduação. Com carinho, ao professor Douglas Cardoso Dragunski, que me apresentou a química e a ciência, que tanto me incentivou e acreditou em mim. Aos professores que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar onde estou, meu respeito e agradecimento.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR, aos secretários e professores coordenadores.

À Capes pela bolsa concedida e apoio financeiro, apoio incluso do CNPq.

“Sede como os pássaros que,
ao pousarem um instante sobre ramos muito leves,
sentem-nos ceder, mas cantam!
Eles sabem que possuem asas.”

Victor Marie Hugo

“Até aqui nos ajudou o Senhor”

1Samuel 7:12

RESUMO

O ácido hialurônico (HA), um exemplo de polissacarídeo, tem aplicação em cosméticos e estética por prevenir e amenizar o envelhecimento da pele, e como preenchimento dérmico. Sabe-se que os custos de obtenção e de purificação tornam o HA caro para a comercialização. Assim, adicionar outro polissacarídeo mais barato, como parcial substituto do HA, caracterizar as interações físico-químicas desses sistemas e a aplicação como um bioativo foi a proposta deste trabalho. Duas galactomananas (GMs), com diferentes razões Manose/Galactose, foram utilizadas para possíveis interações com o HA, a goma guar (GG) e a de alfarroba (GA). Avaliou-se a possibilidade ou não de sinergia entre os polímeros, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e por reologia, somando-se a ensaios *in vitro* de citotoxicidade e proliferação celular. Primeiramente, as amostras de HA, GA e GG e algumas misturas foram analisadas pela técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Os biopolímeros isolados foram caracterizados como polidispersos com valores de massa molar ponderal média ($M_w \times 10^6$, em g mol^{-1}) de 15,4 para o HA, 2,17 para a GA e 3,15 para a GG. Nas misturas observou-se que as interações físico-químicas foram dentro do perfil da polidispersão dos polissacarídeos envolvidos. Por RMN, as estruturas químicas das GMs foram diferenciadas, as interações com o HA foram estudadas por espectros de NOESY que evidenciaram interconectividade de hidrogênios, entre o H-1 da unidade de ácido glucurônico presente no HA com o H-5 da unidade de manose da cadeia principal das GMs. Também, verificou-se o alargamento no deslocamento do grupamento metil das unidades de N-acetilglucosamina da estrutura do HA nas misturas, quando comparados com o espectro do HA isolado. Os polissacarídeos isolados e as misturas HA:GA e HA:GG a 50:50, 60:40, 70:30 e 80:20 (% m/m) a 25 g L^{-1} , além das amostras de HA de uso comercial como preenchedores dérmicos (HAC20 e HAC30) foram analisados por reologia, nos regimes não oscilatório e oscilatório e por modelos matemáticos. Os resultados e as interpretações mostraram que os fluidos têm caráter pseudoplástico que é interessante nas aplicações de soluções injetáveis, no caso de preenchimentos dérmicos, por facilitarem a injeção, onde o fluido tem menor viscosidade durante o cisalhamento na agulha, causando menor dor no paciente. O HA foi mais viscoso do que as GMs, e as misturas com a GA mostraram interações inter-cadeias mais fortes e emaranhamento quando comparadas com a GG. Observou-se dependência das quantidades de unidades de galactose e das regiões de ramificação na cadeia principal das GMs para a sinergia com o HA e resposta viscoelástica. A partir de estudos *in vitro* foi possível afirmar que as amostras têm potencial de aplicações para concentrações de até $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, com ou sem a adição da melatonina, um fármaco contra radicais livres e antioxidante, cujas respostas foram acompanhadas por análises da atividade mitocondrial e proliferação celular. Com a substituição de até 50% de HA por GM, os sistemas mostraram ter potenciais para novos produtos pelos comportamentos físico-químicos, respostas em cultivo celular *in vitro* e pela diminuição dos custos.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Polissacarídeo. Galactomanana. Guar. Alfarroba.

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a polysaccharide used in cosmetics and aesthetics for preventing skin aging and as a dermal filler. The costs of obtaining and purifying are known to make HA expensive. Thus, add a cheapest polysaccharide as partial substitute for HA, characterize the physical chemical interactions of these systems and the application as a bioactive product was the purpose of this work. Guar gum (GG) and locust bean (GA) are galactomannans (GMs) with different Mannose/Galactose ratios were used for possible interactions with HA. The possibility of synergy or not between the polymers was evaluated by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and rheology, beyond *in vitro* assays of cytotoxicity and cell proliferation. First, HA, GA and GG samples and their mixtures were analyzed by size exclusion chromatography (SEC) technique. The biopolymers were characterized as polydispersed with average weight molar mass ($M_w \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) of 15.4 for HA, 2.17 for GA and 3.15 for GG. In the mixtures, it was observed that the physical chemical interactions were within the polydispersion profile of the polysaccharides involved. By NMR spectra, the chemical structures of GMs were differentiated and interactions with HA were studied by NOESY spectra showing hydrogen interconnectivity between H-1 of the glucuronic acid unit present in HA and H-5 of the mannose unit. In addition, the peaks of the methyl group of HA in the mixture were less broad than for the isolated HA. The isolated polysaccharides, also ratio mixtures for HA:GA and HA:GG at 50:50, 60:40, 70:30 and 80:20 (% w/w) at 25 g L^{-1} , in addition to HA commercial samples used as dermal fillers (HAC20 and HAC30) were analyzed by rheology, non-oscillatory, oscillatory regimes and mathematical models. The results showed that the fluids have pseudoplastic character. This behavior presents a very interesting result for dermal fillers application facilitates the injection, because the fluid has lower viscosity during needle shear, causing less pain in the patient. HA was more viscous than GMs and mixtures with GA showed stronger interchain interactions and entanglement when compared to GG. Dependence on the amounts of galactose units and branching regions in the main chain of GMs was observed for HA synergy and viscoelastic response. *In vitro* studies confirm that is possible that samples have potential applications for concentrations until $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, with or without the addition of melatonin, a free radical and antioxidant drug, whose responses were accompanied by activity analyzes, mitochondrial and cell proliferation. By replacing up to 50% HA with GM, the systems showed to have potential for new products by physical chemical behaviors, *in vitro* cell culture responses and lower costs.

Keywords: Hyaluronic acid. Polysaccharide. Galactomannan. Guar. Locust.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE UM CARBOIDRATO, NO EXEMPLO, A GLUCOSE.....	30
FIGURA 2. MODELO DE LIGAÇÃO GLICOSÍDICA ENTRE DOIS MONOSSACARÍDEOS.....	31
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA PARCIAL DAS GALACTOMANANAS, COMO EXEMPLO, GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG) (SITTIKIYOTHIN, TORRES, GONÇALVES, 2005).....	34
FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO HIALURÔNICO (LIU et al., 2011).....	37
FIGURA 5. DEMONSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DE CARBOIDRATO QUANDO DISSOLVIDO EM UM SOLVENTE DEUTERADO (D ₂ O).....	39
FIGURA 6. ESQUEMA DE UM ESPECTRO DE HSQC PARA INDICAR DESLOCAMENTOS QUÍMICOS TÍPICOS DE CARBOIDRATOS (LUNDQVIST, 2015).....	40
FIGURA 7. FORÇA DE CISALHAMENTO APLICADA SOBRE UM FLUIDO ENTRE PLACAS (BARNES, HUTTON E WALTERS, 2005).....	42
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DAS FUNÇÕES SENOIDAIS DA TENSÃO APLICADA E A DEFORMAÇÃO RESULTANTE. PARA MATERIAIS ELÁSTICOS (EM FASE) E VISCOSOS (FORA DE FASE), NA REGIÃO VISCOELÁSTICA LINEAR.....	44
FIGURA 9. REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT PARA FORMAÇÃO DO FORMAZAN (STOCKERT et al., 2012).....	48
FIGURA 10. ESTRUTURA DO CRISTAL VIOLETA (VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).....	48
FIGURA 11. PERFIL DE ELUIÇÃO PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DA MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) 50:50(m/m), NA CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mg mL ⁻¹ , EM SOLUÇÃO AQUOSA 0,1 mol mL ⁻¹ DE NaNO ₃	59
FIGURA 12. PERFIL DE ELUIÇÃO PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DA MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) 50:50 (m/m), NA CONCENTRAÇÃO 0,5 mg mL ⁻¹ , EM SOLUÇÃO AQUOSA 0,1 mol mL ⁻¹ DE NaNO ₃	59
FIGURA 13. ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), OBTIDOS A 70°C, EM D ₂ O E TMSP COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm. INTEGRAÇÃO DE H-1 PARA DETERMINAR A RAZÃO MANOSE/GALACTOSE.....	64
FIGURA 14. ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA GALACTOMANANA DE GUAR (GG), OBTIDOS A 70°C, EM D ₂ O E TMSP COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm. INTEGRAÇÃO DE H-1 PARA DETERMINAR A RAZÃO MANOSE/GALACTOSE.....	65

FIGURA 15. ESQUEMA DA DISTRIBUIÇÃO DAS RAMIFICAÇÕES POR GALACTOSE NAS UNIDADES DE MANOSE, REGIÃO DE C-4, NA ESTRUTURA DAS GALACTOMANANAS.	66
FIGURA 16. ESPECTROS DE HSQC PARA AS MISTURAS A: ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E B: ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), OBTIDOS A 70°C, EM D ₂ O E TMSP COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm.	68
FIGURA 17. A: REGIÃO DOS ESPECTROS DE RMN- ¹ H DO GRUPO METIL DA N-ACETILGLUCOSAMINA DO ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E DESSE NAS MISTURAS ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) (50:50), OBTIDOS A 70°C, EM D ₂ O E TMSP COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.	69
FIGURA 18. ESPECTROS NOESY, OBTIDOS A 70°C, EM D ₂ O E TMSP COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm. A: MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E B: ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG).	70
FIGURA 19. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 10 g L ⁻¹ DISPERSO EM ÁGUA, TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 E 5,8, A 25°C.	72
FIGURA 20. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS AMOSTRAS DE GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) E DE GALACTOMANANA DE GUAR (GG) A 10 g L ⁻¹ NOS SOLVENTES: ÁGUA, TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 E 5,8, A 25°C.	73
FIGURA 21. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS AMOSTRAS A 10 g L ⁻¹ DAS MISTURAS DE MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), BEM COMO PARA OS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C.	75
FIGURA 22. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS MISTURAS A 25 g L ⁻¹ DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) (50:50, m/m), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C E A 37°C.	76
FIGURA 23. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS AMOSTRAS A 25 g L ⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DAS MISTURAS DO SISTEMA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C.	78
FIGURA 24. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS AMOSTRAS A 25 g L ⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS MISTURAS ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C.	81
FIGURA 25. CURVAS DE VISCOSIDADE DAS MISTURAS A 25 g L ⁻¹ DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) COMPARATIVAS	

AO ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) ISOLADO NA MESMA CONCENTRAÇÃO, E CONCOMITANTE AO HA NA CONCENTRAÇÃO DILUÍDA NA MISTURA.....	83
FIGURA 26. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA AS AMOSTRAS A 25 g L ⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, 25°C.....	86
FIGURA 27. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA AS AMOSTRAS A 25 g L ⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS MISTURAS DE MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, 25°C.....	88
FIGURA 28. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA AS AMOSTRAS 25 g L ⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E AS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, 25°C.....	90
FIGURA 29. VISCOSIDADE APARENTE (η_{ap}) EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO ($\dot{\gamma}$) E VISCOSIDADE DINÂMICA (η^*) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (ω), PELO MODELO DE COX MERZ, PARA AS AMOSTRAS DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DAS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) A 25 g L ⁻¹ .	92
FIGURA 30. VISCOSIDADE APARENTE (η_{ap}) EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO ($\dot{\gamma}$) E VISCOSIDADE DINÂMICA (η^*) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (ω), PELO MODELO DE COX MERZ, PARA AS AMOSTRAS DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DAS MISTURAS ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) A 25 g L ⁻¹ .	93
FIGURA 31. CURVAS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO PARA AS AMOSTRAS A 25 g L ⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DE SUAS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C.....	96
FIGURA 32. CURVAS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO PARA AS AMOSTRAS a 25 g L ⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C.....	97
FIGURA 33. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 25 g L ⁻¹ , EM TAMPÃO FOSFATO PH 7,4, E ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L ⁻¹ (HAC20) E 30 g L ⁻¹ (HAC30), A 25°C.....	99
FIGURA 34. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 25 g L ⁻¹ , EM TAMPÃO FOSFATO PH 7,4, E ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L ⁻¹ (HAC20) E 30 g L ⁻¹ (HAC30), A 25°C.....	101
FIGURA 35. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.....	106
FIGURA 36. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO DERMA HYAL (HAC), EM	

24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	106
FIGURA 37. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	107
FIGURA 38. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE GUAR (GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	108
FIGURA 39. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	109
FIGURA 40. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	109
FIGURA 41. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GA+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	111
FIGURA 42. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GG+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	112
FIGURA 43. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	114
FIGURA 44. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO DERMA HYAL (HAC), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	114
FIGURA 45. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	115
FIGURA 46. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE GUAR (GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	116

FIGURA 47. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	116
FIGURA 48. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	117
FIGURA 49. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GG+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	118
FIGURA 50. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GA+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	118
FIGURA 51. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	121
FIGURA 52. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO DERMA HYAL (HAC), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	121
FIGURA 53. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	122
FIGURA 54. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE GUAR (GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	122
FIGURA 55. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	123
FIGURA 56. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO	

HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	123
FIGURA 57. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GA+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	124
FIGURA 58. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GG+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.	124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. FONTES QUE CONTÊM ÁCIDO HIALURÔNICO EM SUA COMPOSIÇÃO (GIJI e ARUMUGAM (2014, COM MODIFICAÇÕES).	35
TABELA 2. TÉCNICAS DE CORRELAÇÕES BIDIMENSIONAIS POR RMN. .	39
TABELA 3. DADOS REOLÓGICOS OBTIDOS POR Sundaram et al. (2010) PARA PREENCHEDORES FACIAIS COMERCIAIS.	46
TABELA 4. VALORES DE dn/dc E M_w DETERMINADOS PARA AS AMOSTRAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), GALACTOMANANA DE GUAR (GG).	60
TABELA 5. POTENCIAL ZETA DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), GALACTOMANANA DE GUAR (GG) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.	62
TABELA 6. DESLOCAMENTOS (δ , ppm) OBTIDOS POR ESPECTROS DE HSQC DE AMOSTRAS DE GALACTOMANANAS DE ALFARROBA E GUAR (GA E GG).	63
TABELA 7. DESLOCAMENTOS (δ , ppm) OBTIDOS POR ESPECTROS DE HSQC PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA).	67
TABELA 8. VALORES DE REGRESSÃO DAS CURVAS DE VISCOSIDADE, PELOS MODELOS DE OSTWALD DE WAELE E O DE MOORE, PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) ISOLADAS E PARA AS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.	79
TABELA 9. VALORES DE REGRESSÃO DAS CURVAS DE VISCOSIDADE, PELOS MODELOS DE OSTWALD DE WAELE E O DE MOORE, PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG) ISOLADAS E PARA AS SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.	82
TABELA 10. VALORES DE <i>CROSS OVER</i> ($G' = G''$) E AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS (rad s^{-1}), E OS PARÂMETROS DA LEI DA POTÊNCIA APLICADA À G' E G'' PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.	88
TABELA 11. VALORES DE <i>CROSS OVER</i> ($G' = G''$) E AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS (rad s^{-1}), E PARÂMETROS DA LEI DA POTÊNCIA APLICADA À G' E G'' PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.	90
TABELA 12. COMPLIÂNCIA INICIAL (J_0), COMPLIÂNCIA MÁXIMA ($J_{\text{máx}}$), COMPLIÂNCIA NO INFINITO (J_∞) E PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO PARA A ANÁLISE DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E	

GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO ± DESVIO PADRÃO.....	96
TABELA 13. COMPLIÂNCIA INICIAL (J_0), COMPLIÂNCIA MÁXIMA ($J_{máx}$), COMPLIÂNCIA NO INFINITO (J_∞) E PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO PARA A ANÁLISE DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO PARA AS AMOSTRAS A 25 g L ⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO ± DESVIO PADRÃO.....	98
TABELA 14. VALORES DE REGRESSÃO DAS CURVAS DE VISCOSIDADE, PELOS MODELOS DE OSTWALD DE WAELE E O DE MOORE, PARA AS AMOSTRAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 25 g L ⁻¹ , DE ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L ⁻¹ (HAC20) E 30 g L ⁻¹ (HAC30). VALOR MÉDIO ± DESVIO PADRÃO.....	100
TABELA 15. VALORES DE <i>CROSS OVER</i> ($G'=G''$) E AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS (rad s ⁻¹), E PARÂMETROS DA LEI DA POTÊNCIA APLICADA A G' E G'' PARA AS AMOSTRAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 25 g L ⁻¹ , DE ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L ⁻¹ (HAC20) E 30 g L ⁻¹ (HAC30). VALOR MÉDIO ± DESVIO PADRÃO.....	101
TABELA 16. VALORES DE η^* E G' A 4,4 rad s ⁻¹ PARA AS AMOSTRAS A 25 g L ⁻¹ DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), GALACTOMANANA DE GUAR (GG) E DAS MISTURAS, BEM COMO PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L ⁻¹ (HAC20) E 30 g L ⁻¹ (HAC30).....	102

LISTAS ABREVIATURAS E SIGLAS

BCRJ	- Banco de Células do Rio de Janeiro
BioPol	- Laboratório de Biotecnologia em Polissacarídeos
D ₂ O	- Água deuterada
DMEM	- <i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
dn/dc	- Valor do incremento do índice de refração
GA	- Goma de alfarroba (<i>Ceratonia siliqua</i>)
Gal	- Galactose
GG	- Goma guar (<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>)
GM	- Galactomanana
GPC	- Cromatografia de permeação em gel
HA	- Ácido Hialurônico
HA:GA	- Mistura de ácido hialurônico e goma de alfarroba
HA:GA+MEL	- Mistura de ácido hialurônico e goma de alfarroba com adição de melatonina
HA:GG	- Mistura de ácido hialurônico e goma guar
HA:GG+MEL	- Mistura de ácido hialurônico e goma guar com adição de melatonina
HAC	- Ácido hialurônico comercial Derma Hyal [®]
HAC20	- Ácido hialurônico comercial Derma Hyal [®] a 20 g.L ⁻¹
HAC30	- Ácido hialurônico comercial Derma Hyal [®] a 30 g.L ⁻¹
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum correlated spectroscopy</i>
IPPPP	- Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
IR	- Índice de Refração
LALLS	- <i>Low Angle Laser Light Scattering</i>
Man	- Manose
MEL	- Melatonina
MTT	- Brometo de [3-{4,5-dimetiltiazol-2il}-2,5-difeniltetrazolio]
M _w	- Massa molar média-ponderal
NOESY	- <i>Nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
RALLS	- <i>Right Angle Laser Light Scattering</i>
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear

SEC - Cromatografia por exclusão de tamanho
TMSP - Ácido trimetilsililpropanoico

LISTA DE SÍMBOLOS

- $\dot{\gamma}$ - Taxa de cisalhamento
- γ_0 - Amplitude máxima de deformação do movimento senoidal
- η_0 - Viscosidade a taxa de cisalhamento zero da equação de Moore
- η_∞ - Viscosidade a taxa de cisalhamento infinita da equação de Moore
- ∂v - Variação da velocidade entre as moléculas ou camadas do fluido
- ∂y - Distância entre as camadas e moléculas
- $\partial y / \partial t$ - Variação da deformação em função do tempo
- ® - Marca registrada
- G^* - Módulo complexo
- G' - Módulo de armazenamento ou elástico
- G'' - Módulo de perda ou viscoso
- J - Compliância
- J_0 - Compliância instantânea quando o fluido é submetido a uma tensão
- J_∞ - Compliância após o momento da retirada da tensão em que o fluido entra em equilíbrio
- $J_{\text{máx}}$ - Compliância no máximo de deformação correspondente ao último tempo que o fluido esteve sob tensão
- K - Coeficiente de consistência da equação de Ostwald-de-Waele
- k' - Coeficiente linear para G'
- k'' - Coeficiente linear para G''
- n - Índice de comportamento de fluxo da equação de Ostwald-de-Waele
- n' - Coeficiente angular para G'
- n'' - Coeficiente angular para G''
- T₂ - Relaxamento transversal de deslocamentos de RMN
- γ - Deformação aplicada da equação de Moore
- δ - Deslocamento químico
- η - Viscosidade
- η^* - Viscosidade complexa
- η_{ap} - Viscosidade aparente
- τ - Tempo de relaxação de Moore da equação de Moore
- τ - Tensão de cisalhamento

- ωt - Frequência de excitação da equação de Moore
- $\nu_{1/2}$ - Meia altura de deslocamentos de RMN
- ω - Frequência angular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo geral	27
1.1.2	Objetivos específicos.....	28
1.2	JUSTIFICATIVA.....	28
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	Carboidratos	29
2.2	Polissacarídeos	31
2.3	Hidrocolóides	32
2.4	Galactomananas.....	33
2.5	Ácido Hialurônico.....	35
2.6	Algumas técnicas de caracterizações das propriedades de polissacarídeos	38
2.6.1	Por Ressonância Magnética Nuclear.....	38
2.6.2	Por reologia	41
2.6.2.1	Caracterização da deformação de fluidos, definições básicas de reologia	41
2.6.2.2	Caracterização de regimes não-oscilatório e oscilatório.....	43
2.7	Ensaio in vitro com células	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1	Obtenção e preparo das amostras	50
3.3	Caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	51
3.4	Análises reológicas.....	52
3.4.1	Reologia em regime não oscilatório.....	53
3.4.2	Reologia em regime oscilatório	54

3.4.3	Análise do comportamento reológico pelo modelo da fluência e recuperação	54
3.2	Análise por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)	50
3.5	Análise do potencial zeta.....	51
3.6	Análises das amostras in vitro	54
3.6.1	Ensaio colorimétrico para determinação de citotoxicidade e proliferação celular	54
3.6.2	Cultivo celular e ensaios com as amostras.....	55
3.6.3	Preparo das células e dos polissacarídeos para os cultivos.....	56
3.6.4	Ensaio colorimétrico pelo método do MTT	56
3.6.5	Ensaio colorimétrico pelo método do Cristal Violeta.....	57
4	Resultados e Discussão	58
4.1	Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)	58
4.2	Potencial Zeta.....	61
4.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	63
4.3.1	RMN para as Galactomananas (GA e GG)	63
4.3.2	RMN para o Ácido Hialurônico	66
4.3.3	RMN para as Misturas (HA:GA e HA:GG).....	67
4.4	Reologia	71
4.4.1	Testes em diferentes condições, para amostras de HA, GA e GG, no regime não oscilatório	71
4.4.2	Regime não oscilatório	77
4.4.2.1	Sistema HA:GA, polissacarídeos isolados e as misturas	77
4.4.2.2	Sistema HA:GG, polissacarídeos isolados e as misturas.....	81
4.4.3	Regime oscilatório	85
4.4.3.1	Sistema HA:GA, polissacarídeos isolados e as misturas	85
4.4.3.1	Sistema HA:GG, polissacarídeos isolados e as misturas.....	89
4.4.4	Avaliação do comportamento reológico pelo modelo de Cox Merz	91

4.4.5	Análise do comportamento reológico pelo modelo da fluência e recuperação	94
4.4.6	Análise do comportamento reológico das amostras comerciais, HAC20 e HAC30, comparativamente com o HA, a GA, a GG e as misturas.....	98
4.5	Estudos das amostras in vitro.....	104
4.5.1	Pelo método do MTT	104
4.5.1.1	Experimentos com concentrações de 1 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	104
4.5.1.2	Experimentos com concentrações de 10 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	105
4.5.1.3	Experimentos com concentrações de 2 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	113
4.5.2	Pelo método do Cristal Violeta	119
5	Considerações Finais	126
6	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	127
	Referências	128
	Apêndice.....	139

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento humano é um processo biológico natural e causa uma série de alterações fisiológicas no corpo. Ao longo do tempo a pele muda gradativamente apresentando modificações significativas, como alteração na espessura (mais fina), perda da elasticidade, diminuição da oleosidade, incluindo a diminuição da produção de ácido hialurônico (HA), um carboidrato polimérico importante em várias partes do corpo humano, e que tem a função de retenção de água, evitando desidratação, flacidez e rugas na pele (GOLD, 2009).

Com relação aos tratamentos não cirúrgicos e minimamente invasivos para o rejuvenescimento facial, o preenchimento dérmico tem destaque. Não só para o tratamento em peles mais envelhecidas, mas também como prevenção, ocasionando sensação de bem-estar, aumento da autoestima, além da precaução para as consequências do envelhecimento. E o HA é um dos mais usados para esse fim. Além de preenchimento dérmico injetável, também é comumente usado nas formas de creme, gel, pomada e como suplemento ingerido que, além de ajudar na hidratação da pele, é indicado para o tratamento de problemas nas articulações (WANG et al., 2004).

O processo mais utilizado para obtenção do HA acontece através da fermentação bacteriana, a extração é complexa e, conseqüentemente, o produto final tem um custo elevado (GIJI e ARUMUGAM, 2014). Atualmente, 1g de HA comercial custa R\$ 270,00 (SIGMA-ALDRICH, 2019), mas os valores podem variar conforme as fontes, os valores de massa molar e as aplicações como dermo preenchedores, por exemplo.

Tendo em vista a alta demanda deste polissacarídeo, este presente estudo propõe a parcial substituição do HA por outro biopolímero, desde que esse apresente biocompatibilidade em meio biológico e a redução de custos, mantendo as propriedades de interesse.

Um outro exemplo de polissacarídeo, também de uso difundido, são as galactomananas, que podem ser extraídas do endosperma de sementes. Devido à alta viscosidade de suas dispersões aquosas, podem ser utilizadas de várias formas na aplicação em áreas de alimentos e cosméticos, podendo ser adicionadas como agentes estabilizantes, ingredientes de fragrâncias, adesivos,

muco-adesivos e na liberação de medicamentos (CERQUEIRA et al., 2011; JOHNSON Jr et al., 2015; VENDRUSCOLO et al., 2005).

Entre as galactomananas comerciais, podemos citar a goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*, GG) e goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*, GA), as quais apresentam diferentes graus de ramificação da cadeia principal e, conseqüentemente, diferentes características de comportamento especialmente relacionadas a viscosidade de suas soluções (BARAK e MUDGIL, 2014; LAZARIDOU, BILIADERIS e IZYDORCZYK, 2001).

São descritos em literatura estudos sobre interações sinérgicas das galactomananas com outros polissacarídeos, como a xantana (BRESOLIN et al., 1997; GOYCOOLEA, MILAS e RINAUDO, 2001), ágar e alginato, cujos produtos foram aplicados *in vitro* como suportes para o cultivo celular (LUCYSZYN et al., 2007; VALENGA et al., 2011) uma vez que tais sinergias levaram a formação de géis.

Comercialmente a cotação de 1g custa cerca de R\$ 1,50 e R\$ 1,57 para GA e GG, respectivamente (SIGMA-ALDRICH, 2019), valores muito discrepantes ao se comparar com o do HA. Assim, o uso da galactomanana como parcial substituto do HA seria uma boa alternativa para agregar características físico-químicas interessantes, visto suas propriedades e a gama de suas aplicações já descritas na literatura, e onde desponta o interesse comercial.

Isto posto, este trabalho tem por objetivo de estudo caracterizar as possíveis interações físico-químicas de sistemas binários contendo ácido hialurônico e galactomananas, avaliando a estrutura dos polissacarídeos isolados ou em mistura por ressonância magnética nuclear, o comportamento reológico das amostras, e a viabilidade celular *in vitro* tendo como possibilidade a aplicação dessas misturas como um bioativo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar as interações físico-químicas de sistemas binários contendo ácido hialurônico e galactomananas e a avaliar a aplicação como um bioativo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar por cromatografia de exclusão de tamanho, o perfil e a massa molar dos polissacarídeos isolados e nas misturas;
- Avaliar a estabilidade coloidal dos sistemas pela técnica de potencial zeta;
- Analisar por ressonância magnética nuclear a estrutura química dos polissacarídeos isolados e das misturas binárias para identificar as unidades de monossacarídeos envolvidas na interação entre as cadeias dos biopolímeros;
- Avaliar por reologia as curvas de viscosidade dos polissacarídeos isolados e de suas misturas para determinar a concentração na condição da melhor sinergia;
- Avaliar por reologia o comportamento viscoso e o elástico em sistema dinâmico oscilatório das amostras binárias na condição de melhor sinergia;
- Avaliar o comportamento reológico das misturas binárias na condição de melhor sinergia pelo modelo da fluência e recuperação;
- Avaliar *in vitro* a viabilidade celular dos sistemas isolados e das misturas.

1.2 JUSTIFICATIVA

Este estudo propõe a caracterização físico-química de misturas de HA com duas galactomananas, aqui denominadas GA e GG, estruturalmente constituídas por diferentes graus de substituição por galactose. Isso proposto, com a justificativa de avaliar a possibilidade ou não de sinergia entre os polímeros, analisada por ensaios de RMN, e pelo comportamento das misturas por ensaios reológicos. O interesse desse estudo passa também sobre possíveis aplicações e a diminuição de custos desde que, em meio biológico os sistemas, por exemplo, possam apresentar biocompatibilidade a ser avaliada por ensaios *in vitro*.

Assim, o uso da galactomanana como parcial substituto do HA poderá agregar características físico-químicas interessantes, visto suas propriedades e a gama de suas aplicações, já descritas na literatura incluindo o interesse comercial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carboidratos

As diversas biomoléculas existentes incluem os carboidratos, as proteínas, os nucleotídeos e os lipídios. Dentre essas, os carboidratos são os mais numerosos (NORDQVIST, 2017), pois estão presentes em todas as formas na natureza, seja na dieta humana ou animal, sendo elementos estruturais de vegetais. Também, estão presentes em esqueletos de insetos e em paredes celulares de bactérias, como componentes estruturais. Suas complexas heterogeneidade e características químicas, físicas e biológicas podem ser definidas por suas estruturas moleculares (GHAZARIAN, IDONI e OPPENHEIMER, 2011).

Os carboidratos mais simples são denominados sacarídeos. Podem conter de três a sete átomos de carbono, sendo denominados trioses, tetroses, pentoses, hexoses e heptoses, respectivamente. As nomenclaturas das moléculas são atribuídas conforme a quantidade de funções hidroxil e carbonila presentes na sua estrutura. Por exemplo, monômeros de sacarídeos são nomeados como monossacarídeos, dímeros são dissacarídeos e sucessivamente até os polímeros que são chamados polissacarídeos.

Geralmente, quando os carboidratos são observados em cadeias abertas, podem ser definidos como hidroxicetona ou hidroxialdeído, ou seja, apresentam grupamentos cetona ou aldeídos, respectivamente. Mas, em geral, os monossacarídeos podem ser representados na forma cíclica. A ciclização ocorre quando um átomo de carbono é atacado por uma hidroxila do grupamento aldeído ou cetona, formando um hemiacetal cíclico ou hemiacetal cíclico, respectivamente (LEHNINGER, 2006).

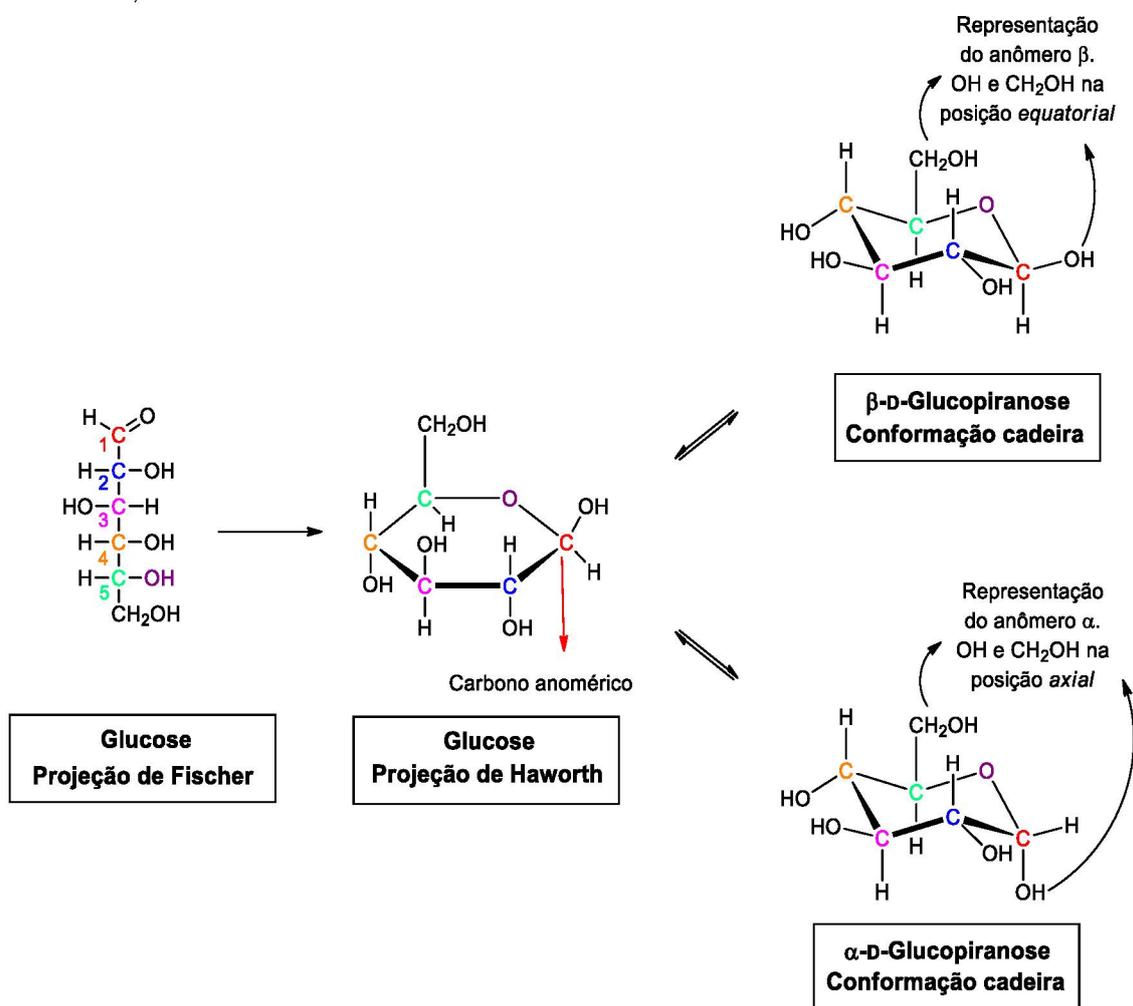
A organização do anel pode atribuir diferentes características as moléculas e, por isso, são discriminadas por duas formas. Essas diferenciações são em relação ao centro quiral que, por definição, é o último carbono quiral ou assimétrico em relação à carbonila e, quando a molécula está na forma cíclica, esse será o carbono 1, ou carbono anomérico (VOLLHARDT e SCHORE, 2012).

A primeira diferenciação é com relação a configuração absoluta dos monossacarídeos. Assim, quando um polarímetro incide uma luz plano

polarizada sob uma molécula quiral, essa tende a desviar luz. O desvio para a direita indica uma molécula com configuração D (dextrógira) e, quando for à esquerda, será L (levógira). Com relação a organização do anel, quando a hidroxila do carbono anomérico está na posição axial ao grupo hidroxil metil (-CH₂OH) será o anômero α , e quando estiver na posição equatorial será o anômero β (VOLLHARDT e SCHORE, 2012).

A Figura 1 apresenta alguns dos conceitos mencionados acima sobre a estrutura química dos carboidratos.

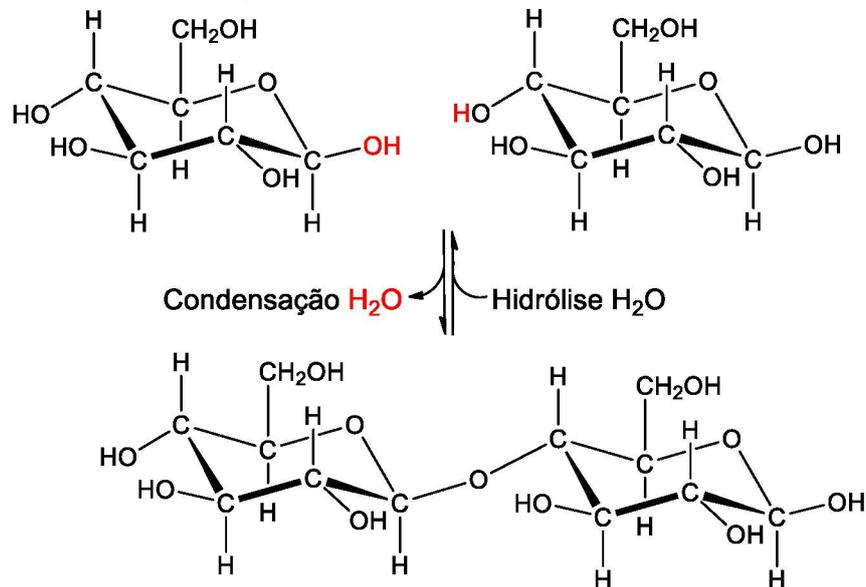
FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE UM CARBOIDRATO, NO EXEMPLO, A GLUCOSE.



A união de monossacarídeos que forma os oligos ou os polissacarídeos acontece pela reação de eliminação de H₂O entre dois monossacarídeos (hidroxila do carbono anomérico de um monossacarídeo com uma das hidroxilas de outro monossacarídeo), formando uma ligação covalente, denominada

ligação glicosídica, como ilustrada na Figura 2 (LEHNINGER, 2006; SOLOMONS e FRYHLE, 2006).

FIGURA 2. MODELO DE LIGAÇÃO GLICOSÍDICA ENTRE DOIS MONOSSACARÍDEOS.



Os carboidratos podem passar por reações de modificação química e formar novos componentes de monossacarídeos com diferentes grupamentos. Por exemplo, produzir derivados como ésteres fosfóricos de glucose (glucose-6-fosfato), monossacarídeos ácidos (urônicos: galacturônico e aldônicos: galactônico), desoxi-açúcares (desoxirribose) e açúcares aminados (N-acetilglicosamina) (LEHNINGER, 2006).

2.2 Polissacarídeos

A diversidade de monossacarídeos pode se organizar de diferentes formas e originar os polissacarídeos, que são muito usados pelos seres humanos ao longo da sua história. Já foram amplamente explorados de várias fontes, como frutas (pectinas), sementes (galactomananas), tubérculos (amidos), parede celular de plantas (celulose), gomas de exsudados de tecidos (goma arábica), fontes aquáticas (algas marinhas, como alginato, agarose), fontes animais (quitosana), fermentação bacteriana (xantana, gelana) e fúngicos (escleroglucana, glucanas, mananas) (WINKWORTH-SMITH e FOSTER, 2013).

Várias aplicações podem ser atribuídas a esses biopolímeros porque são biodegradáveis, renováveis, têm baixa ou nenhuma toxicidade, sendo assim matrizes promissoras para produtos ambientalmente corretos (SHARMA et al., 2018).

Os polissacarídeos possuem estruturas complexas e variáveis, que podem levar a diversas aplicações, cuja complexidade é atribuída às estruturas e características químicas, como a composição de monossacarídeos, massa molar, além da fonte, maturidade da fonte e o método de extração (PRABAHARAN, 2011).

Na estrutura química, há quantidades significativas de grupamentos hidroxila e carboxila, que podem lhes atribuir diferentes propriedades, por exemplo a solubilidade. E, aqueles que, na sua maioria, podem ser facilmente dispersos, parcial ou totalmente e com grande propensão a inchar em água, formam dispersões ou soluções aquosas viscosas, são denominados hidrocolóides (LI et al., 2016; NUSSINOVITCH, 1997).

2.3 Hidrocolóides

O termo hidrocolóide vem das palavras gregas “*hydro*” que significa água e “*kolla*” que significa goma. Em água, os hidrocolóides formam dispersões coloidais por apresentarem na estrutura partes hidrofílicas (YOUSEFI e JAFARI, 2019). A classe dos hidrocolóides abrange uma ampla gama de polissacarídeos que são extraídos de diversas fontes, como plantas, gomas de exsudados, sementes, animais e microorganismos (DICKINSON, 2003; PHILLIPS e WILLIAMS, 2009).

Quando dois hidrocolóides são combinados, a mistura tende a apresentar diferente comportamento em relação aos hidrocolóides isolados, e esse fator pode oferecer novas características para um novo produto, como funcionalidades e estabilidade, que se tornam interessantes para diferentes aplicações. As interações sinérgicas entre misturas binárias de polissacarídeos podem ser descritas como ligações intermoleculares entre os dois polissacarídeos (CAIRNS et al., 1987). Na literatura, há variados estudos de interação sinérgica entre hidrocolóides (GALVÁN et al., 2018; GAO et al., 2017;

GOWRARAJU et al., 2017; HAKERT, ECKERT e MULLER, 1989; KUMAR et al., 2016; LIU et al., 2012; TUMMALAPALLI et al., 2016).

Entre os hidrocolóides importantes na natureza, devido ao leque de suas aplicações, estão os estudos envolvendo o uso de galactomananas.

2.4 Galactomananas

As galactomananas (GM), também denominadas de gomas, são uma classe de polissacarídeos amplamente conhecidas e utilizadas, as quais estão presentes no endosperma das sementes de *Leguminosae*, que podem ser encontradas em árvores grandes e até em plantas de caules maleáveis e rasteiras (BUCKERIDGE et al., 1995; DEA e MORRISON, 1975, de SOUZA et al., 2010).

Por muitas décadas essas gomas são utilizadas, pois esses polissacarídeos possuem funcionalidades e características únicas (HAMDANI, WANI e BHAT, 2019). Em geral, comercialmente, podem ser utilizadas para o aumento de viscosidade em alimentos e cosméticos. Mas, outros exemplos de usos específicos estão em filmes/revestimentos para alimentos e aditivos, agentes estabilizantes, liberação de medicamentos, ingredientes de fragrâncias, adesivos e muco-adesivos (CERQUEIRA et al., 2011; JOHNSON Jr et al., 2015; VENDRUSCOLO et al., 2005).

Estruturalmente, as GMs são formadas por uma cadeia principal de β -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 4) com substituições, em distribuição não uniforme, em C-6 por unidades de α -D-galactopiranosose, onde o grau de substituição pode mudar entre as galactomananas e pode originar diferentes propriedades, tais como solubilidade, viscosidade e, conseqüentemente, podem interferir nas interações ou não com outros polissacarídeos. A relação manose/galactose (Man:Gal) pode variar de 1 a aproximadamente 5, por exemplo, nas gomas de fenugreek (1:1), guar (2:1), tara (3:1) e alfarroba (4:1) (DEA e MORRISON 1975; de SOUZA et al., 2010; GANTER et al., 1988; PETKOWICZ et al., 1998).

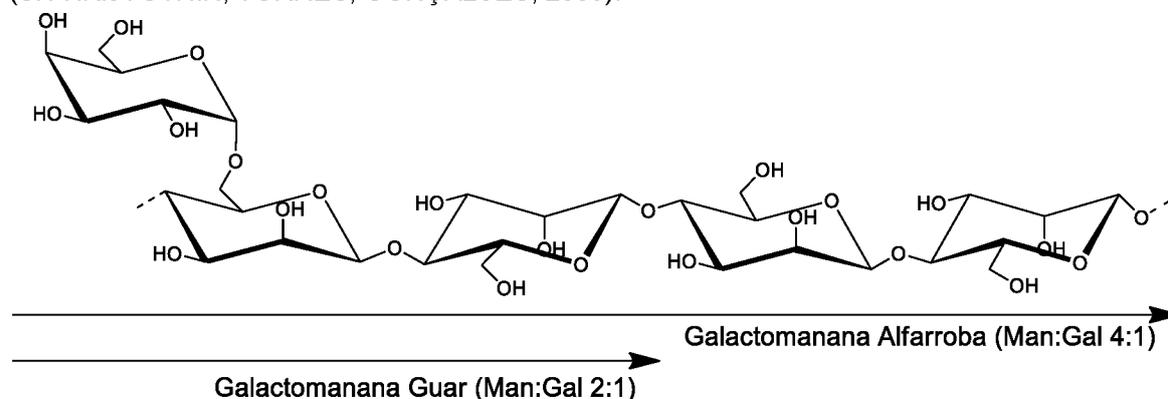
O maior teor de galactose, atribui maior solubilidade em água para as GMs e, no entanto, menor capacidade de formar gel e de interagir com outros polissacarídeos (DEA e MORRISON, 1975). Essa característica quanto a solubilidade pode ser explicada pela estrutura da cadeia principal de manose,

que é semelhante à da celulose, com configuração β e que é insolúvel em água (SINGH, SINGH e ARYA, 2018). Os grupamentos hidroxilas da manose presentes nos carbonos 2 e 3, e as hidroxilas dos carbonos 3 e 4 na galactose estão em posição equatorial. Esses grupamentos formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares; assim, quanto maior a quantidade de galactose, maior será o impedimento estérico das associações das cadeias, aumentando a solubilidade em água (KONTOGIORGOS, 2018; RINAUDO, 2008).

A solubilidade também pode ser influenciada pela massa molar, distribuição da substituição de galactose na cadeia principal, bem como a origem da amostra, a variedade e idade da planta que foi extraída e as condições de extração (BARAK e MUDGIL, 2014; LAZARIDOU, BILIADERIS e IZYDORCZYK, 2001). Além disso, as propriedades reológicas em solução, dependem da relação manose/galactose, porque quanto maior a quantidade de galactose, menores serão as interações inter-cadeias, conforme acima descrito (KONTOGIORGOS, 2018; RINAUDO, 2008).

Exemplos de galactomananas que são extraídas de sementes da família *Leguminosae* e são amplamente conhecidas em usos industriais são a goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*, GG) e goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*, GA), a primeira com razão Man:Gal de 2:1 e a segunda com razão de 4:1, essa diferença lhes atribui características e comportamentos peculiares. A Figura 3, mostra a estrutura parcial da GA e da GG.

FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA PARCIAL DAS GALACTOMANANAS, COMO EXEMPLO, GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG) (SITTIKIYOTHIN, TORRES, GONÇALVES, 2005).



Apesar das galactomananas desenvolverem em água soluções e dispersões viscosas, elas isoladamente não formam géis, daí o interesse do estudo envolvendo a sinergia delas com outros polissacarídeos.

Outro polissacarídeo, também um hidrocolóide, que recebe grande atenção na literatura e em diversas aplicações é o ácido hialurônico (HA), que será descrito a seguir.

2.5 Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico pode ser produzido na membrana plasmática de células humanas, animais e de bactérias, encontrado como parte das matrizes de tecido conectivo de todos os vertebrados, sendo um dos principais componentes da matriz extracelular da pele e da cartilagem nos seres humanos, onde é responsável pelo controle de absorção de água e pela lubrificação das junções entre os ossos (RANGASWAMY e JAIN 2008; VAN BRUNT, 1986).

A Tabela 1, mostra algumas fontes onde pode ser encontrado o HA.

TABELA 1. FONTES QUE CONTÊM ÁCIDO HIALURÔNICO EM SUA COMPOSIÇÃO (GIJI e ARUMUGAM (2014, COM MODIFICAÇÕES).

Fonte	Tecido ou fluido corporal
Galo	Crista
Ser Humano	Cordão umbilical, juntas, cartilagem, fluidos sinoviais, corpo vítreo dos olhos, derme, epiderme, urina
Rato	Pulmão, rim, cérebro, fígado, humor aquoso dos olhos
Boi	Cartilagem bovina nasal
Carneiro	Fluido sinovial, córtex da medula, pulmão
Coelho	Corpo vítreo dos olhos, rins, músculo, fígado, humor aquoso dos olhos

A extração desse polissacarídeo é complexa e inclui processos de esmagamento, lavagens com solventes orgânicos, enzimas e detergentes (GIJI e ARUMUGAM, 2014). Em particular, duas fontes usadas comercialmente são da crista de galo e por fermentação bacteriana, porém a extração de HA de fonte animal além de apresentar alto custo no processo de purificação pode apresentar contaminantes como vírus (DE OLIVEIRA et al., 2016). Atualmente, é majoritariamente produzido por meio da fermentação das bactérias

Streptococcus, podendo apresentar vários valores de massa molar (JOHNS, GOH e OEGGERLI, 1994; LIU et al., 2011; VAN BRUNT, 1986). A utilização de HA a partir de microrganismos é viável, uma vez que é não imunogênica e, portanto, biocompatível devido à sua estrutura altamente conservada entre diferentes espécies (DE OLIVEIRA et al., 2016).

No corpo humano, o HA cria uma forte barreira contra a perda de água e como reserva, especialmente na derme, assim, ajuda na proteção do tecido prevenindo danos celulares (GALLO et al., 2019). Sabendo-se que com o envelhecimento humano, a produção de HA diminui com o aumento da idade, resultando em desidratação e perda de elasticidade da pele, contribuindo com o aparecimento de rugas e flacidez, o uso de HA comercial para amenizar e até reverter esses processos naturais do corpo humano, pode ser interessante (GOLD, 2009).

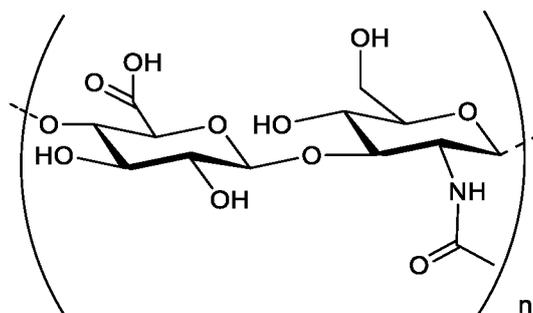
Solúvel em água e em condições fisiológicas o HA está na forma de um sal de sódio, negativamente carregado e pode ser referenciado como hialuronato de sódio.

O HA é atrativo para várias áreas de aplicação por suas características físicas e químicas seja em filme, em solução ou na forma de hidrogel, por ser considerado um composto bioativo (ZAMBONI et al., 2018). É considerado o mais popular preenchimento dérmico por injeção e de uso tópico como cosmético (ABDULJABBARA e BASENDWH 2016). Também como preenchimento para aumento e modelagem de músculos como, por exemplo, braço, perna, peitoral, costas e glúteos (HAGEL e NAQVI, 2018). Pode ser usado para sistema de liberação de medicamentos (HUANG e HUANG, 2018), construção de biomateriais para engenharia de tecidos e medicina regenerativa (HEMSHEKHAR et al., 2016). Estudos relatam que o HA pode promover cicatrização de feridas em ratos diabéticos aumentando a angiogênese (WANG et al., 2016). Além disso, já apresentou efeito imunoestimulador, imunomodulador e anti-inflamatório em humanos (NOBLE, LIANG e JIANG, 2011; ZAMBONI et al., 2018). O HA, também, pode ser incluído como suplemento alimentar, com o intuito de melhorar a hidratação de peles secas quando ingerido, onde deve chegar à pele pelo sangue e pelo sistema linfático (KAWADA et al., 2014). Tratamentos para a pele usando HA podem ser feitos nas formas de creme, gel, pomada, injeção, por exemplo, e além dos tratamentos

estéticos, podem ser usados para tratar ou prevenir inflamações na pele, como rosáceas, lesões externas e melanomas (CHEN et al., 2018). Também pode ser usado para tratar problemas nas articulações, como a osteoartrite (WANG et al., 2004).

Essas aplicações são possíveis devido às suas características e propriedades, tais como higroscopicidade, não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não antigenicidade (LAURENT, 2009; ABDULJABBARA e BASENDWH, 2016), as quais estão relacionadas a sua estrutura química. A estrutura do HA é composta de unidades repetitivas de N-acetil- β -D-glucosamina e ácido β -D-glucurônico ligadas por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4), respectivamente, como apresentada na Figura 4.

FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO HIALURÔNICO (LIU et al., 2011).



Quando ambos açúcares estão ligados em uma configuração beta, formam uma estrutura energeticamente estável. O HA tem pKa dos grupamentos carboxílicos entre 3 e 4 (MERO e CAMPISI, 2014). *In vivo* ou em pH fisiológico, os grupamentos são totalmente ionizados, tornando a molécula de HA altamente polar e assim, solúvel em água. Por isso, o HA tem a capacidade de se complexar com água (ROMAGNOLI e BELMONTESI, 2008), além da habilidade em interagir com diversos compostos químicos. Essas propriedades acarretam a aplicação do HA em ser altamente hidratante para a pele (ROMAGNOLI e BELMONTESI, 2008).

Além disso, é muito interessante o uso de macromoléculas naturais onde se inclui o ácido hialurônico, a gelatina, a celulose, em relação ao de materiais sintéticos (por exemplo, poliacrilatos, acetato de polivinila), visto que as células tendem a reconhecer a sua similaridade com relação a estrutura química, evitando respostas imunológicas não desejáveis (YIN, LIN e ZHAN, 2019).

A caracterização do HA, por exemplo, é uma das condições para que se possa dar sugestões para aplicações. Por exemplo, a avaliação reológica de injetáveis é importante para se determinar a estabilidade, as propriedades em repouso, durante o cisalhamento e posteriormente na pele pós aplicação. Por isso, devem ser viscoelásticos, suficientemente viscosos para injetar e suficientemente elásticos para permanecer no local injetado (ALAM e TUNG, 2018).

Visto isso, a determinação de suas características estruturais, físico-químicas e biológicas é de grande importância para que se conheça as suas propriedades e se possa sugerir aplicações.

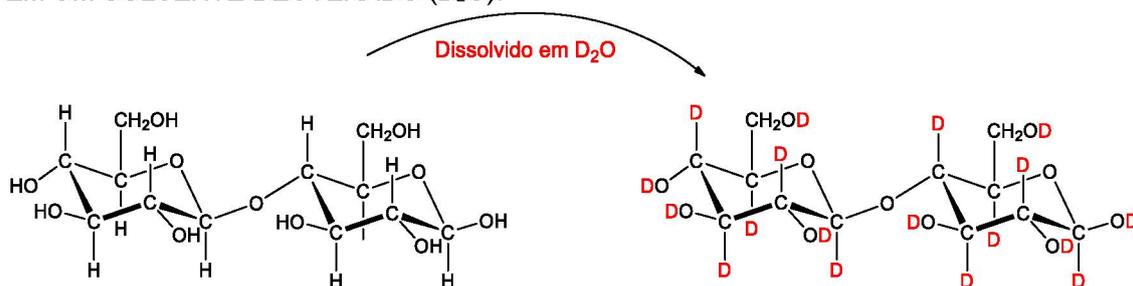
2.6 Algumas técnicas de caracterizações das propriedades de polissacarídeos

2.6.1 Por Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica especial na caracterização e elucidação de carboidratos e pode ajudar a identificar materiais e diferentes grupos funcionais a nível atômico (CHENG e NEISS, 2012). É possível avaliar amostras de alta complexidade estrutural e misturas com diferentes componentes sem a necessidade de isolamento, onde o método de preparo da amostra é simples, e a análise é não destrutiva, não invasiva e depende de pouca quantidade de material (LUNDQVIST, 2015).

Na maioria dos estudos envolvendo polissacarídeos, as amostras são preparadas em água deuterada (D_2O) ao invés de água (H_2O), onde o deutério é um isótopo do hidrogênio e possui um nêutron e um próton em seu núcleo. Quando o solvente do meio é D_2O , como observado na Figura 5, ocorre uma troca dos hidrogênios dos grupamentos hidroxil das moléculas do carboidrato, para que esses possam ser detectados nas análises (PIOTTO et al., 1992; SKLENAR et al., 1993).

FIGURA 5. DEMONSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DE CARBOIDRATO QUANDO DISSOLVIDO EM UM SOLVENTE DEUTERADO (D₂O).



As análises por RMN podem ser feitas por experimentos de ¹H e ¹³C monodimensionais (1D RMN), além das correlações bidimensionais (2D RMN) homonuclear (exemplo, COSY: *homonuclear correlation spectroscopy*; TOCSY: *total correlation spectroscopy*; NOESY: *nuclear overhauser enhancement spectroscopy*), e heteronuclear (exemplo, HSQC: *heteronuclear single quantum correlated spectroscopy*; HMBC: *heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy*). O que pode ser muito interessante para estudar a estrutura, em alguns casos a conformação, e as interações inter e intramoleculares, por exemplo (LUNDQVIST, 2015; YURIS et al., 2019).

A Tabela 2 apresenta alguns dos exemplos das correlações bidimensionais e como essas podem ser usadas para as referidas caracterizações (CHENG e NEISS, 2012; KAISER, 2000).

TABELA 2. TÉCNICAS DE CORRELAÇÕES BIDIMENSIONAIS POR RMN.

Homonuclear	COSY	Usado para conectividades de ¹ H adjacentes, acoplamentos vicinais ou geminais
	TOCSY	Correlações entre todas as ressonâncias do ¹ H, não necessariamente acoplados
	NOESY	Conexões das ressonâncias de ¹ H espacialmente próximo (entre 4 e 5 Å)
Heteronuclear	HSQC	Correlações entre os deslocamentos de ¹³ C e ¹ H diretamente ligados (C-H)
	HMBC	Correlações entre os deslocamentos de ¹³ C e ¹ H a longa distância

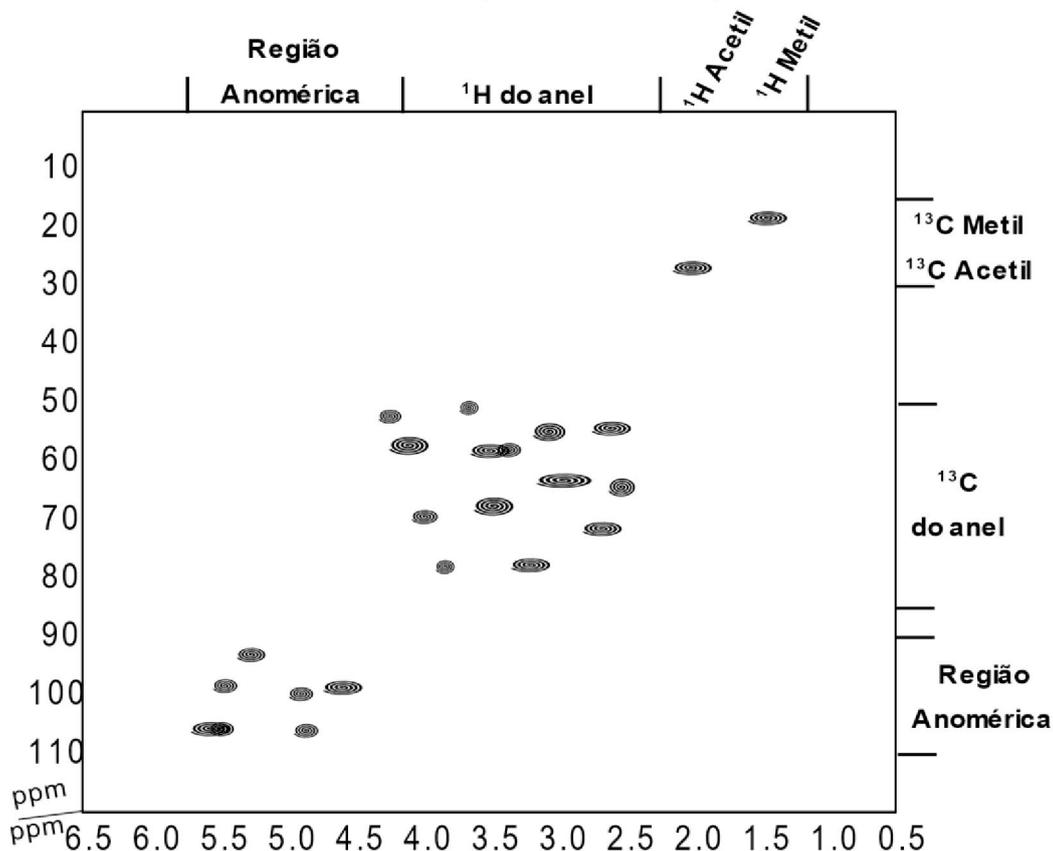
Para esse tipo de caracterização é importante conhecer os deslocamentos químicos da estrutura da molécula, seja para o ¹H ou para o ¹³C e, por essa razão, é fundamental se basear em boas referências e o uso apropriado da técnica.

Para os carboidratos, a região anomérica, ou seja, a região de H-1 e C-1 fica aproximadamente entre δ 4,2 e 5,8 ppm e 90 e 110 ppm, respectivamente. Os hidrogênios α anoméricos estão entre δ 4,8-5,8 ppm e os β anoméricos entre δ 4,2-4,8 ppm, já os carbonos α anoméricos apresentam deslocamento químico entre δ 90-110 ppm e os β anoméricos entre δ 103-106 ppm (WELLER, 1999).

Deslocamentos entre δ 1,2 e 2,3 ppm em ^1H , são característicos dos grupamentos metil para 6 desoxi açúcares e para os grupamentos O- e N-acetil; para o ^{13}C os deslocamentos ficam entre δ 15 e 30 ppm. Os carbonos substituídos aparecem entre δ 50 e 60 ppm e os não substituídos entre 65 e 75 ppm. Enquanto os carbonos de carbonilas estão entre δ 165 e 185 ppm.

Os C-6 não substituídos apresentam deslocamento químico entre δ 60 e 63 ppm enquanto C-6 ligados a uma outra molécula ficam entre δ 65 e 70 ppm. Carbonos envolvidos em glicosilação, geralmente, exibem alteração no deslocamento entre 5 e 10 ppm. A Figura 6, mostra um exemplo de um espectro bidimensional heteronuclear (HSQC) com os deslocamentos citados.

FIGURA 6. ESQUEMA DE UM ESPECTRO DE HSQC PARA INDICAR DESLOCAMENTOS QUÍMICOS TÍPICOS DE CARBOIDRATOS (LUNDQVIST, 2015).



2.6.2 Por reologia

Os estudos reológicos são importantes para caracterizar as propriedades de fluidos que tendem a se deformar ou escoar quando submetidos a forças externas. Assim sendo, as caracterizações obtidas são importantes para diferentes áreas do conhecimento para se conhecer o comportamento de um produto, seja para alimentos, cosméticos, tintas, óleos e entre outros (BARNES et al., 1993). Assim, é possível controlar por reologia, comportamentos desejáveis de um produto final e a otimização do design e processamento.

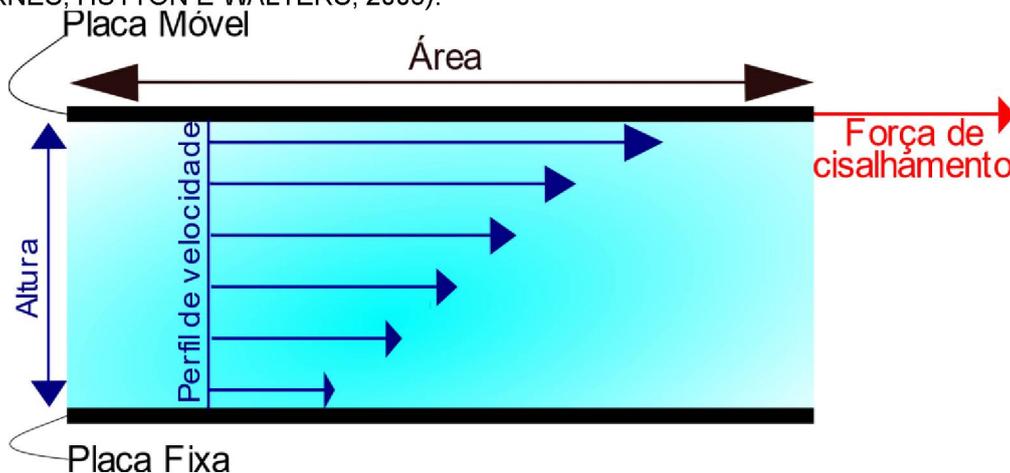
Com relação à reologia de polissacarídeos, o comportamento viscoso pode variar por diversos fatores como, por valores da massa molar, concentração, presença de sais ou açúcares, temperatura, pressão e taxa de cisalhamento, por exemplo (BARNES et al., 1993; MIERCZYNSKA et al., 2015). Os polissacarídeos têm característica de fluidos viscoelásticos, ou seja, têm comportamento de sólido e líquido simultaneamente.

Uma das propriedades possível de mensurar pela técnica de reologia é a viscosidade de um fluido, que é uma característica importante para a aplicação de um material. Visto que pode indicar características das variações estruturais, que pode ser um indicativo importante sobre a qualidade do fluido, durante a aplicação de uma tensão.

2.6.2.1 Caracterização da deformação de fluidos, definições básicas de reologia

A viscosidade pode ser definida como a resistência ao deslocamento que um material apresenta quando lhe é aplicado uma força. Para a discussão de viscosidade é importante a definição de dois outros parâmetros, a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento. Por exemplo, quando um fluido é colocado entre duas placas, a inferior é fixa e a superior se move por uma área A , devido a aplicação de uma força F esse fluido se deformará. E quanto maior a força imposta, maior será o gradiente de velocidade do fluido, ou seja, maior será a deformação, como pode ser ilustrado na Figura 7.

FIGURA 7. FORÇA DE CISALHAMENTO APLICADA SOBRE UM FLUIDO ENTRE PLACAS (BARNES, HUTTON E WALTERS, 2005).



A tensão de cisalhamento (τ , Pa) é descrita como a força por unidade de área cisalhante para manter o escoamento do fluido e pode ser descrita pela equação 1:

Equação 1

$$\tau = \frac{F}{A}$$

Onde F é a força para acontecer escoamento do fluido (N) e A é a área exposta ao cisalhamento (m^2).

A taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) é o deslocamento relativo das moléculas do fluido, também pode ser definida como grau de deformação ou gradiente de velocidade e matematicamente pode ser descrita pela equação 2:

Equação 2

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial v}{\partial y} = \frac{\partial \gamma}{\partial t}$$

Onde ∂v é a variação da velocidade entre as moléculas ou camadas do fluido; ∂y é a distância entre as camadas e moléculas; $\partial \gamma / \partial t$ é a variação da deformação em função do tempo.

Descrito esses parâmetros, podemos definir a viscosidade (η , Pa s) pela equação 3, onde a tensão de cisalhamento é proporcional a taxa de cisalhamento, e por definição, para fluidos ideais, a constante de proporcionalidade é a viscosidade do fluido.

Equação 3

$$\tau = \eta \frac{\partial v}{\partial y} \quad \text{ou} \quad \tau = \eta \gamma$$

2.6.2.2 Caracterização de regimes não-oscilatório e oscilatório

Em um reômetro, tem-se a possibilidade de medir o comportamento de um fluido por dois regimes. O regime não oscilatório e o regime oscilatório. No primeiro, uma taxa de cisalhamento é aplicada e a viscosidade é obtida sob condições do estado estacionário. Já no modo oscilatório, não somente a tensão (ou taxa de cisalhamento) é aplicada, mas também a direção do cisalhamento muda constantemente com a variação da frequência angular $\omega = 2\pi f$, onde f é a frequência em Hz. Essas medidas oscilatórias também são denominadas de dinâmicas, devido a constante variação da tensão e informa sobre contribuição elástica e viscosa de um fluido. Os deslocamentos são senoidais, ou seja, têm comportamento de uma curva de onda continua descrita por uma oscilação repetida suave (exemplo na Figura 8). A equação 4, pode descrever o comportamento:

Equação 4

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t)$$

Onde γ é a deformação aplicada, γ_0 é a amplitude máxima de deformação do movimento senoidal e ωt é a frequência de excitação. Quando é aplicada essa deformação no fluido, a resposta obtida pela tensão (σ) será senoidal e estará em fase com a deformação, como na equação 5:

Equação 5

$$\sigma = \sigma_0 \text{sen}(\omega t + \delta)$$

A tensão pode ser separada em duas contribuições, onde o termo $\text{sen}(\omega t)$ fica em fase e o termo $\text{cos}(\omega t)$ a 90° fora de fase, logo, pode ser representada pela equação 6:

Equação 6

$$\sigma = \sigma'(t) + \sigma''(t) = \sigma'_0 \text{sen}(\omega t) \cos\delta + \sigma''_0 \text{cos}(\omega t) \text{sen}\delta$$

Visto que para um material com comportamento elástico: $\delta = 0$: $\sigma = \sigma'_0 \text{sen}(\omega t) \cos \delta$, e para um material com comportamento viscoso: $\delta = \pi/2$: $\sigma = \sigma''_0 \text{cos}(\omega t) \text{sen} \delta$.

Por isso, pode-se definir que a variação da tensão senoidal pode ser expressa pelos módulo de armazenamento ou elástico (G'), e pelo módulo de perda ou viscoso (G'') (FERRY, 1980; RUß, 2016), logo pelas equações 7 e 8:

Equação 7

$$G' = \frac{\sigma_0 \text{sen}(\omega t)}{\gamma_0 \text{sen}(\omega t)} \cos \delta = G^* \cos \delta$$

Equação 8

$$G'' = \frac{\sigma_0 \text{cos}(\omega t)}{\gamma_0 \text{sen}(\omega t)} \text{sen} \delta = G^* \text{sen} \delta$$

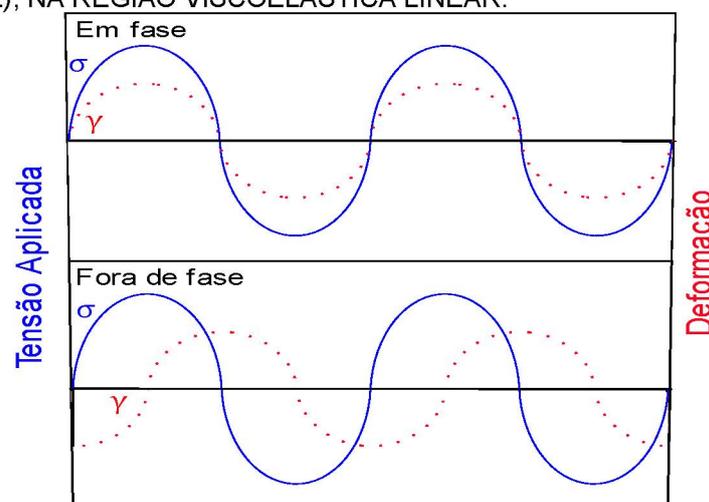
Onde G^* é o módulo complexo e pode ser definido pela relação demonstrada na equação 9:

Equação 9

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

As relações descritas acima sobre o comportamento senoidal, podem ser ilustradas pela Figura 8.

FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DAS FUNÇÕES SENOIDAIS DA TENSÃO APLICADA E A DEFORMAÇÃO RESULTANTE. PARA MATERIAIS ELÁSTICOS (EM FASE) E VISCOSOS (FORA DE FASE), NA REGIÃO VISCOELÁSTICA LINEAR.



As propriedades reológicas são importantes para serem avaliadas e podem indicar diferentes comportamentos e sugerir tipos de aplicações, como já mencionado anteriormente. Um exemplo, é em relação ao estudo das propriedades de preenchedores faciais por reologia, que pode além de indicar como o preenchimento se comporta durante o cisalhamento da agulha no procedimento de injeção, e depois da injeção na pele (KABLIK et al., 2009; MOLLIARD, et al., 2018).

Os preenchimentos faciais são amplamente usados, atualmente, com o intuito de levantar (*lifting*), preencher e modelar a face, tais como na diminuição de rugas, preenchimento labial, harmonização facial e até como implantes para correções faciais (ROCA-MARTINEZ e AYGLON, 2019). A aplicação é feita na camada superficial da derme e a duração do efeito depende de vários fatores intrínsecos do paciente e do preenchimento aplicado. Tais como, cuidados pós-operatório e tempo de absorção do organismo; e sobre o produto com relação a concentração, a massa molar e as modificações químicas, por exemplo. As características dos preenchedores podem apresentar diferentes comportamentos. Como são géis, uma forma de serem estudados é por reologia.

Além do comportamento viscoso, o módulo elástico (G') e a viscosidade complexa (η^*) são parâmetros reológicos importantes, a η^* é definida pela equação 10, que relaciona os módulos elástico e viscoso (G' e G'') e a frequência (ω):

Equação 10

$$\eta^* = \frac{\sqrt{(G'^2 + G''^2)}}{\omega}$$

E, quando o material de estudo tem comportamento pseudoplástico, ou seja, com o aumento da taxa de cisalhamento ocorre a diminuição da viscosidade, a dor que o paciente sente é menor, visto que no momento que a amostra está em repouso na seringa antes da injeção, o fluido tem alta viscosidade, mas ao passar pela agulha (sofrendo cisalhamento) a viscosidade diminui, sugerindo que o fluido que é injetado passa para a derme com uma viscosidade menor e que o diâmetro da agulha também pode ser menor (DODERO et al., 2019). Altos valores de η^* indicam que o preenchimento tenderá a permanecer e não se espalhar no local injetado. Altos valores de G' apontam

para um preenchimento com maior habilidade em resistir as tensões da pele, como em regiões de maior atividade muscular, como exemplo na testa.

Nos estudos desenvolvidos por Sundaram et al. (2010) foram avaliados o comportamento reológico de diferentes preenchedores comerciais, usados para o aumento de volume e para a diminuição de rugas. Os dados estão apresentados na Tabela 3. Foram feitos experimentos no modo oscilatório e a frequência que foi usada para avaliar os parâmetros foi de 0,7 Hz ou 4,4 rad s⁻¹ a qual é considerada, fisiologicamente, relevante para a tensão mais comum da pele.

TABELA 3. DADOS REOLÓGICOS OBTIDOS POR Sundaram et al. (2010) PARA PREENCHEDORES FACIAIS COMERCIAIS.

Produto	η^* (Pa)	G' (Pa)
Radiesse®	349,83	1407
Radiesse Mix Kit®	116,11	429
Radiesse SubQ®	198,37	863
Perlane®	124,95	541
Restylane®	119,18	513
Juvéderm Voluma®	62,90	274
Juvéderm Ultra Plus®	17,70	75
Juvéderm Ultra®	7,31	28

Os resultados obtidos no trabalho mostraram diferentes comportamentos e foram divididos em três grupos:

O primeiro que apresenta altos valores de η^* e G' compreende o grupo Radiesse®, que são os preenchedores a base de hidroxapatita de cálcio;

O segundo grupo com valores médios são constituídos de ácido hialurônico modificados, mas com adição de 0,3% de lidocaína (usada como anestésico local) compreende o Restylane®, o Perlane® e o Restylane SubQ®.

E o terceiro grupo, com menores valores de η^* e G', compreende três ácidos hialurônicos da marca Juvéderm®. Cada grupo possui suas vantagens e desvantagens para uso, as quais serão discutidas, posteriormente, quando comparadas aos resultados obtidos no presente trabalho.

2.7 Ensaios *in vitro* com células

Para que um produto de uso médico ou estético, seja novo ou modificado, possa ser comercializado, alguns testes para avaliação de segurança devem ser feitos antes de ser aplicado em um ensaio clínico humano para que, assim, possa receber aprovação para o seu uso efetivo. Alguns testes são básicos para garantir esses requisitos, tais como os testes de citotoxicidade, viabilidade celular, proliferação celular, irritação e sensibilidade intra-cutânea (LIU, 2018; ISO10993-5, 2009).

Os testes de citotoxicidade são importantes para avaliar a evolução biológica de um determinado produto que poderá ser aplicado/usado em humanos. Para esses testes são usadas células de linhagem, células de pele, tumor ou fibroblasto para que, a partir de sistemas de cultura de célula *in vitro*, seja possível avaliar o comportamento celular quando esse sistema é exposto a determinado produto, avaliando-se o crescimento celular, o tempo de proliferação e as alterações morfológicas (RISS et al., 2004; LIU et al., 2018). Esses testes são vantajosos, principalmente, com relação aos custos vistos nos testes ensaios pré clínicos e clínicos; além da importância que têm para que um produto potencialmente tóxico não seja avaliado diretamente em animais e seres humanos (LI, ZHOU e XU, 2015, ISO10993-5, 2009).

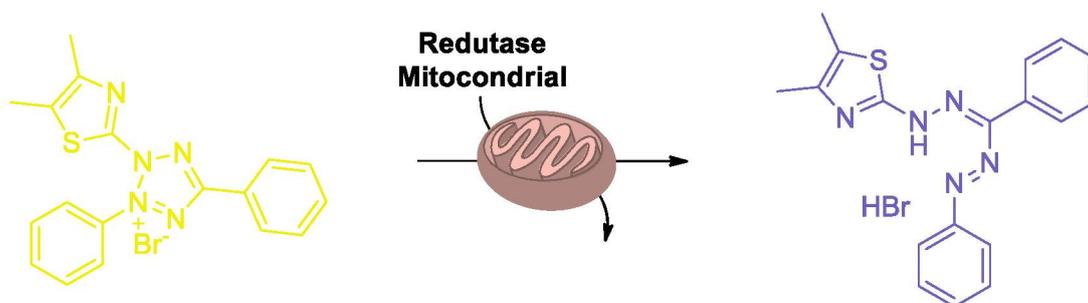
Existem vários métodos para avaliar os efeitos de um tratamento estudado na atividade celular. Pode-se citar o ensaio do Cristal Violeta (4-{{E}}-(4-Dimetilaminofenol)iminometil]-N,N-Dimetilanilina)) e do brometo de [3-{{4,5-dimetiltiazol-2il}}-2,5-difeniltetrazolio] (MTT), ambos são testes colorimétricos amplamente difundidos e aplicados na literatura e que neste estudo foram analisados no comprimento de onda de 595 nm.

Estes ensaios quantificam por absorbância a variação na quantidade celular e sua atividade mitocondrial, respectivamente. Assim, as respostas colorimétricas, ocorrem pela incubação tanto do MTT ou do Cristal Violeta em uma população de células, e a conversão de um substrato em um produto colorido, o qual é proporcional ao número de células em atividade.

O teste de MTT mede a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial das células, enquanto o ensaio do Cristal Violeta cora o citoplasma das células aderidas no substrato (VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).

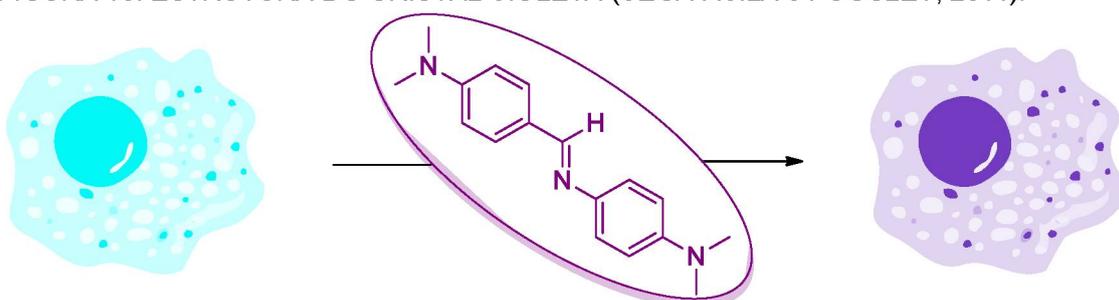
Pelo ensaio de MTT, as células que estão incubadas na presença do tratamento por determinado tempo, são expostas ao MTT, já que se deseja avaliar a citotoxicidade. As células metabolicamente ativas reduzem o MTT (de coloração amarelada) em formazan (sólido arroxeadado), cuja reação se dá pela clivagem do anel tetrazólio no interior da mitocôndria, através de enzimas desidrogenases, como ilustrado na Figura 9. Quando a situação for desfavorável para a célula, esta perde a capacidade de converter o MTT em formazan e, conseqüentemente, quanto menos expressiva for a cor arroxeadada, menor será a quantidade de células metabolicamente ativas (MILOJEVIĆ et al., 2019; MOSSMANN, 1983).

FIGURA 9. REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT PARA FORMAÇÃO DO FORMAZAN (STOCKERT et al., 2012).



Pelo método do Cristal Violeta, as células que estão incubadas na presença do tratamento por determinado tempo, são expostas ao reagente cristal violeta, já que se deseja avaliar a proliferação celular. Após a lavagem com tampão fosfato, a adição de cristal violeta é absorvido pelas células que estão aderidas nas placas de cultivo e, assim, a intensidade de cor produzida que é mensurada pela absorbância, é proporcional ao número de células presentes. A estrutura química do cristal violeta está ilustrada na Figura 10.

FIGURA 10. ESTRUTURA DO CRISTAL VIOLETA (VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).



A importância dos resultados biológicos aliados às caracterizações físico-químicas e químicas, podem indicar aplicações para o uso de biopolímeros como materiais com diferentes direcionamentos (FDA, 2016; ISO 10993-1, 2009; MHLW, 2012; GAD, 1997).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e preparo das amostras

Os polissacarídeos foram adquiridos comercialmente, onde a GG foi comprada da Biotec Especialidades Químicas (Lote: 21038), a GA (CAS number: 9000-40-2) e o HA (CAS Number 9067-32-7) da Sigma-Aldrich®.

Ambas GA e GG foram purificadas como a seguir descrito. Previamente, foram solubilizadas em água a 10 g L^{-1} e mantidas em agitação por 48h. A GA foi aquecida a 85°C por 30 minutos antes do próximo processo. Então, as dispersões das GMs foram centrifugadas por 10.000 g , durante 30 minutos a 40°C , precipitadas e lavadas com etanol absoluto por 3 vezes e depois com acetona e, então, o precipitado foi seco em estufa e triturado, para obtenção do material purificado usado neste estudo.

O HA foi utilizado como adquirido, sem prévia purificação.

As dispersões dos polissacarídeos, para as análises seguintes, foram preparadas a temperatura ambiente (25°C), com agitação durante 20h. A concentração de cada biomolécula para cada experimento está mencionada em seu devido tópico, bem como as proporções de HA, GA e GG para a formação das misturas nos sistemas binários.

3.2 Análise por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A homogeneidade ou não e as massas molares média-ponderal (M_w) dos polissacarídeos foram obtidas pela técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), acoplada a um sistema de multi-detectores da VISCOTEK. Soluções aquosas dos polissacarídeos na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ foram preparadas em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de sódio, e filtradas sequencialmente em membranas de $0,45$ e $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore). Então, $0,1 \text{ mL}$ dos filtrados foram injetados na coluna contendo polimetacrilato da Shodex-OH Pack SB- 806M-HQ L007054 (Japão), com limite de exclusão de $2 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$. Como eluente foi utilizado a mesma solução salina. A coluna estava acoplada a um refratômetro diferencial e a um detector de espalhamento de luz laser, comprimento de onda de $632,8 \text{ nm}$, modelo 270 Dual Detector, a baixo ângulo,

7° (LALLS, do inglês *Low Angle Laser Light Scattering*) e a ângulo reto, 90° (RALLS, do inglês *Right Angle Laser Light Scattering*). Para a padronização do equipamento foram utilizados padrões cromatográficos de M_w conhecida, o poli (óxido de etileno) ($24.000 \text{ g mol}^{-1}$) e a dextrana ($70.000 \text{ g mol}^{-1}$) de procedência da Viscotek, preparadas previamente no mesmo solvente. A compilação dos resultados obtidos pelos detectores foi realizada pelo *Software OmniSec 4.7* (VISCOTEK). O dn/dc (em mL g^{-1}) utilizado para cada amostra foi determinado e foi similar ao relatado em literatura como sendo 0,175 para o HA (WEINHOLD et al., 2009), 0,133 para a GA (HADDARAH et al., 2014) e 0,155 para a GG (POLLARD et al., 2010).

3.5 Análise do potencial zeta

As medidas de potencial zeta foram feitas no equipamento Stabino® pelo método potencial de fluxo, a temperatura de 25°C. As amostras (polissacarídeos isolados e as misturas a 50:50 e 80:20, m/m) a 25 g L^{-1} foram preparadas em tampão fosfato 7,4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e as leituras foram observadas por 50 min.

3.3 Caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As amostras HA, GA, GG e as misturas foram preparadas na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em D_2O , para as misturas, foi escolhida a proporção de 50:50, visto que foi a melhor proporção escolhida pelas análises de reologia que foram realizadas concomitantes as análises de RMN e os resultados serão abordados posteriormente. As amostras foram avaliadas através dos espectros 1D (^1H) no equipamento Bruker Avance III HD 600 MHz, operando a 14,1 Tesla, utilizando uma sonda de detecção inversa de 5 mm (TXI). A pré-saturação foi realizada utilizando a sequência de pulsos zgpr, com um tempo de relaxação = 4,0 s e tempo de aquisição de 5,1 s.

As análises de RMN 2D foram determinadas pelo experimento de correlação heteronuclear (hsqcedetgpsisp2.2), onde os espectros foram adquiridos usando 32 transientes por série de 2048×320 pontos de dados com preenchimento zero em F1 (2048) antes da transformação de Fourier.

Os experimentos de RMN NOESY foram efetuados usando a sequência de pulsos noesyphpr, com janela espectral igual a 6009 Hz (^1H), tempo de mistura de 200 ms e tempo de relaxação = 2,0 s, 64 transientes por série de 1024x200 pontos de dados, com preenchimento zero em F1 (2048) antes da transformação de Fourier (SASSAKI et al., 2013).

Todas as análises foram realizadas a 70°C, em água deuterada (D_2O) como solvente e o TMS-p ($\delta = 0$) como referência para a calibração dos espectros.

3.4 Análises reológicas

Os experimentos de reologia, nos módulos não oscilatório e oscilatório, foram feitos em um reômetro Haake RS 1, usando o sensor placa-placa (PP45). A temperatura foi controlada a 25 °C ou em outros valores por um banho de água circulante Haake DC 30. As amostras foram submetidas às análises depois de permanecerem 5 minutos em repouso no reômetro para o equilíbrio da temperatura. Previamente às corridas, a extremidade do sensor foi recoberta com óleo de silicone, para evitar a evaporação da amostra.

Alguns experimentos de reologia dos polissacarídeos isolados, HA, GA e GG foram avaliados separadamente, preparados a 10 g L⁻¹ em água ultra pura ou em tampão fosfato a pH 5,8 ou a 7,4 (0,01 mol L⁻¹) a temperatura ambiente (25°C), com agitação durante 20h. Os resultados estão descritos no tópico: “Testes em diferentes condições para o HA, para a GA e a GG no regime não oscilatório”. Esses testes foram importantes para as primeiras caracterizações viscosas dos polissacarídeos para que, assim, fosse possível encontrar a melhor concentração de sinergismo viscoso das misturas. De posse desses resultados a concentração escolhida, para prosseguir nos demais experimentos, foi de 25 g L⁻¹ em tampão fosfato pH 7,4 (0,01 mol L⁻¹).

Foram estudadas misturas de HA:GA e HA:GG nas seguintes porcentagens: 50:50, 60:40, 70:30 e 80:20 % (m/m), as quais serão justificadas ao decorrer dos resultados e discussões. Também foram realizados os testes controle para verificar o efeito do solvente. E, para tal, foram usadas concentrações de HA relativas a concentração que o HA estaria na mistura, considerando o volume total, assim foram estudadas as concentrações de 12,5,

15,0, 17,5 e 20 g L⁻¹, relativas às misturas 50:50, 60:40, 70:30 e 80:20 % (m/m), respectivamente.

Adicionalmente, às amostras já mencionadas para as análises de reologia, foi adquirido um HA comercial aplicado para fins de preenchimento intradermal, com o nome comercial Derma Hyal[®], da empresa OFT Vision[®]. As concentrações desses produtos preenchedores comerciais adquiridos foram de 20 e 30 g L⁻¹ e foram avaliadas nessas condições, denominadas neste trabalho com as siglas HAC20 e HAC30, respectivamente.

3.4.1 Reologia em regime não oscilatório

A viscosidade aparente das amostras foi medida com a variação da taxa de cisalhamento de 0,01 até 200 s⁻¹ e depois o retorno de 200 até 0,01 s⁻¹. Os resultados foram analisados pelos modelos de Ostwald-de-Waele e o de Moore (STEFFE, 1996).

Sendo a equação de Ostwald-de-Waele:

Equação 11

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

Onde, K é o coeficiente de consistência, cuja unidade no sistema internacional é dada em Pa.sⁿ, η é a viscosidade, dada em Pa.s. O expoente n é o índice de comportamento de fluxo, e é adimensional.

A equação 12 é referente ao modelo de Moore:

Equação 12

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (\tau \dot{\gamma})}$$

Onde, η_∞ é a viscosidade a taxa de cisalhamento infinita (Pa s), η₀ é a viscosidade a taxa de cisalhamento zero (Pa s) e τ é o tempo de relaxação de Moore (s).

3.4.2 Reologia em regime oscilatório

Primeiramente, foram realizados os testes de tensão para determinar a região de comportamento viscoelástico para cada amostra. Após essa análise, nessa região, foi escolhida a tensão de 5 Pa para os testes de varredura de frequência. A faixa avaliada de frequência (ω) foi de 0,01 até 20 Hz. Os módulos de armazenamento (G') e o de perda (G'') foram analisados pela lei da potência, usando as equações 13 e 14:

Equação 13

$$G' = k' \omega^{n'}$$

Equação 14

$$G'' = k'' \omega^{n''}$$

Onde, k' (Pa s^n) e k'' (Pa s^n) são os coeficientes lineares, n' e n'' são os coeficientes angulares da frequência para o G' e o G'' , respectivamente.

3.4.3 Análise do comportamento reológico pelo modelo da fluência e recuperação

As medidas da compliância (J , Pa^{-1}) em função do tempo (s) foi determinada dentro da região viscoelástica. No modo de fluência, foi usada uma tensão constante de 3 Pa, por 150 s, mantida a temperatura a 25°C. E, no modo da recuperação, a tensão foi removida e a compliância foi observada por 300 s, na mesma temperatura.

3.6 Análises das amostras *in vitro*

3.6.1 Ensaios colorimétricos para determinação de citotoxicidade e proliferação celular

Para as análises de citotoxicidade e proliferação celular foram avaliadas as amostras de HA, GA, GG e as misturas de HA:GA e HA:GG, bem como as

misturas com adição de melatonina (MEL). Estas misturas com amostras do fármaco serão denominadas com as siglas HA:GA+MEL e HA:GG+MEL.

Comparativamente foi avaliada a amostra comercial de HA de preenchimento, o Derma Hyal[®] (HAC, ou seja, o HAC20 e HAC30).

A MEL é um hormônio endógeno presente no corpo humano e pode ser usada como um medicamento, pois tem efeitos sob a ação de radicais livres, potencial anti-inflamatório e antioxidante, além de estudos que relatam que a MEL, apesar de não poder ser considerada como agente rejuvenescedor, apresenta propriedades benéficas ao envelhecimento humano (KARASEK, 2004; HACIŞEVKI e BABA, 2018).

As amostras binárias de polissacarídeos foram preparadas na porcentagem de 50:50 (m/m) e, adicionalmente, a concentração da MEL foi de 0,5 mg mL⁻¹. Foram preparadas em tampão fosfato (pH 7,4) e, posteriormente foram autoclavadas a 121°C, por 30 minutos. Testes de viscosidade foram realizados com as amostras após a autoclavagem e não foram observadas alterações no comportamento viscoso (dados não apresentados).

3.6.2 Cultivo celular e ensaios *in vitro* com as amostras

A linhagem celular Vero (célula renal, com morfologia epitelial, do *African Green Monkey - Cercopithecus aethiops*) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas e mantidas em meio de cultivo suplementado soro fetal e antibióticos.

Com relação aos polissacarídeos, para os testes de MTT, primeiramente, foi feito um ensaio piloto para analisar as concentrações de 1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e de 500 µg mL⁻¹, as quais foram importantes para uma avaliação ampla e de conhecimento do comportamento das amostras em relação a citotoxicidade.

Numa segunda etapa de avaliação as concentrações foram de 10, 20, 30, 40 e 50 µg mL⁻¹. E na terceira fase de experimentos as concentrações foram de 2, 4, 6, 8 10 µg mL⁻¹.

Para os experimentos com o Cristal Violeta, as concentrações dos polissacarídeos utilizadas foram de 2, 4, 6, 8 10, 20, 30, 40 até 50 µg mL⁻¹.

Todos os ensaios, com exceção do piloto, foram realizados em triplicatas experimentais, mensuradas por espectrofotometria e os resultados estão representados pelas médias de porcentagem de citotoxicidade em relação ao controle \pm erro padrão.

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software Past, onde foram aplicados testes de normalidade dos dados e feita a análise de variância One-way Anova, seguido do teste Tukey.

Os experimentos foram realizados no Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP) em parceria com a Prof^a Dr^a Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, Dr^a Ana Carolina Irioda e Msc Bassam Felipe Mogharbel.

3.6.3 Preparo das células e dos polissacarídeos para os cultivos

As células VERO foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^3 cels/poço e cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12, meio nutritivo para o cultivo celular), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos, 100 UI mL penicilina; 0,1 mg mL estreptomicina A seguir, foram ambientalizadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, foram adicionadas as amostras dos polissacarídeos (previamente autoclavadas) em diferentes concentrações e, então, as placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24, 48 e 72 horas até a análise. Os ensaios foram realizados em quintuplicadas amostrais e triplicatas experimentais tanto para os tratamentos quanto para o controle (sem tratamento).

3.6.4 Ensaio colorimétrico pelo método do MTT

Após os períodos de incubação, foi adicionado MTT diluído em meio de cultivo para que a concentração final deste sal no poço fosse de 0,0005 g mL⁻¹. Após incubar as células por 3 horas, a 37°C e 5% CO₂, o meio de cultivo foi descartado com auxílio de micropipeta, retirando-se assim o sal não metabolizado, mantendo as placas de cultivo as células com os cristais de formazan. Foi adicionado aos poços 100 μ L de DMSO para dissolver esses

cristais, as placas foram mantidas sob agitação lenta por no mínimo 30 min e, então, analisadas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 595 nm.

As porcentagens de citotoxicidade em relação ao controle celular foram obtidas pela relação: $((\text{média da absorbância da amostra} - \text{média da absorbância do branco}) / (\text{média da absorbância do controle} - \text{média da absorbância do branco})) \times 100$.

3.6.5 Ensaio colorimétrico pelo método do Cristal Violeta

Inicialmente, após cada período de incubação, o meio foi removido das placas de cultivo e então foram feitas três lavagens com tampão fosfato; adicionou-se glutaraldeído a 2,5 % para fixar as células, incubando por 90 minutos em repouso e temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi removida, lavou-se novamente com tampão fosfato e adicionou-se 200 µL do reagente cristal violeta a 0,25 g L⁻¹ (NewProv®) e a placa foi mantida em repouso por 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, foram feitas duas lavagens com água Milli-Q, e adicionado ácido acético a 33 % para solubilizar o corante retido no citoplasma das células e, então, as placas foram incubadas em agitador por 30 min. Após esse período, as leituras da absorbância foram feitas em leitor Elisa, no comprimento de onda de 595 nm.

Os dados obtidos por absorbância foram convertidos a número de células através de uma curva padrão por interpolação linear. Para a construção da curva foram feitos experimentos com concentrações celulares que variaram de 0,5 x 10³ a 100 x 10³ (VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

O uso do SEC, também conhecida como cromatografia de permeação em gel (GPC), é uma técnica cromatográfica de fase líquida que tem como método a separação da amostra em análise pelo tamanho das moléculas que a constituem.

Um dos detectores acoplado à coluna e mais utilizado é o índice de refração (IR), o qual avalia a diferença entre o índice de refração da solução onde a amostra está dispersa em relação ao solvente sem a amostra (WILLIAMS, 2018). Os cromatogramas obtidos para as amostras deste trabalho foram organizados comparativamente entre o HA, a GA e a mistura HA:GA 50:50 (Figura 11), bem como entre o HA, a GG e a mistura HA:GG 50:50 (Figura 12). E os resultados foram apresentados com o detector de IR apenas, uma vez que os detectores de LALLS e RALLS, indicaram picos com o mesmo perfil e nos mesmos volumes de eluição do IR. Assim, os volumes nos picos da eluição das amostras detectados pelo IR, LALLS e RALLS foram usados para os cálculos da massa molar ponderal média (M_w).

O perfil cromatográfico da amostra do HA mostrou a presença de um pico de eluição principal em 6,9 mL que não é monodisperso, corroborando com estudos da literatura (COWMAN e MENDICHI, 2004). A presença de um segundo pico no volume de 9,4 mL muito menor em altura e largura que o principal, portanto em pequena percentagem na amostra, indicou a presença de uma segunda família de moléculas de HA com menores M_w . E, foi considerado normal aparecer na amostra, considerando a biossíntese desse material biológico.

A GA apresentou um único pico, característico de homogeneidade da amostra, o pico de eluição com volume em 7,1 mL, e altura menor que a do HA. No entanto, a GG tem volume de eluição em 7,6 mL com altura do pico muito próxima ao HA, mostrando que as duas galactomananas são diferentes, também, em termos de volume hidrodinâmico.

FIGURA 11. PERFIL DE ELUIÇÃO PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DA MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) 50:50 (m/m), NA CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mg mL⁻¹, EM SOLUÇÃO AQUOSA 0,1 mol mL⁻¹ DE NaNO₃.

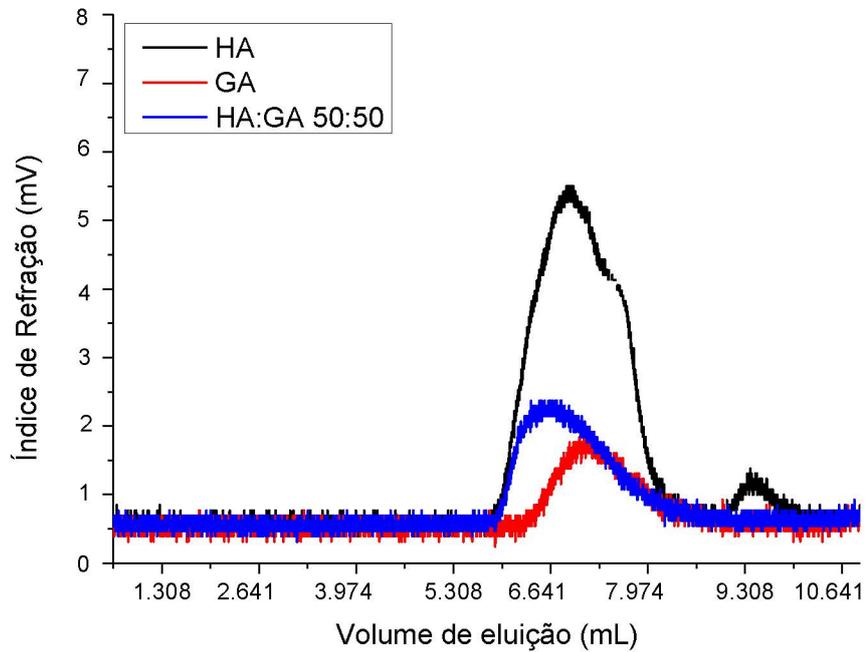
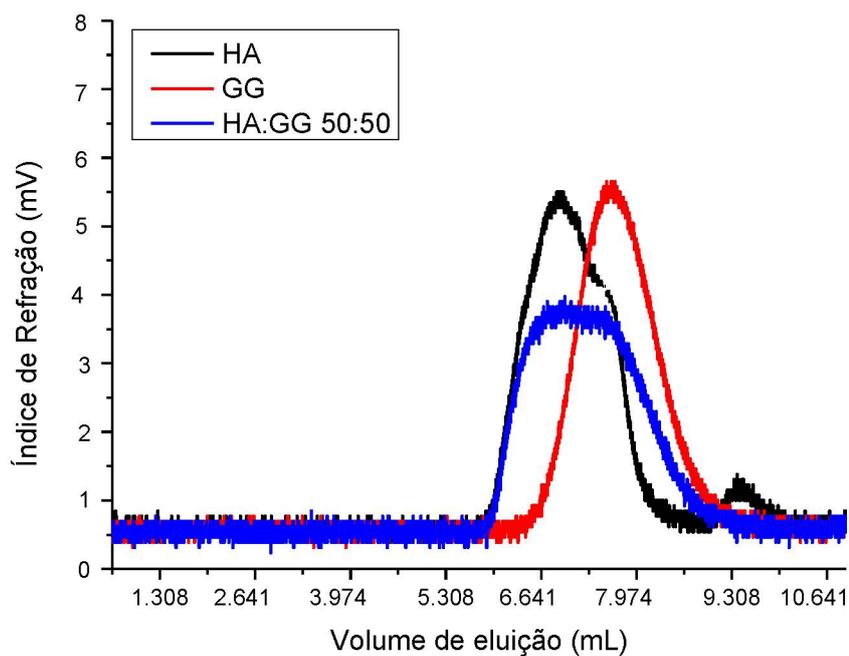


FIGURA 12. PERFIL DE ELUIÇÃO PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DA MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) 50:50 (m/m), NA CONCENTRAÇÃO 0,5 mg mL⁻¹, EM SOLUÇÃO AQUOSA 0,1 mol mL⁻¹ DE NaNO₃.



No perfil das misturas estudadas pode-se observar que começaram a eluir junto com o HA, mas apresentaram picos mais alargados, indicativo característico de dispersões contendo populações de moléculas com M_w diferentes. Para a HA:GA, a altura do pico ficou entre a altura de eluição do HA e GA isolados, indicando interação físico-química entre os dois polissacarídeos, por um aparente aumento da M_w da mistura. Para o sistema HA:GG, o perfil da mistura é mais alargado e com final em volume menor que os do HA e da GG isolados, possivelmente a interação da GG com o HA se deu com família de moléculas de HA de menor M_w .

De modo geral, pode-se afirmar que o HA apresentou maior volume hidrodinâmico quando comparado às demais amostras estudadas, visto que volume de eluição não é necessariamente relacionado a M_w , porque pela técnica, a separação se dá pelo volume hidrodinâmico das moléculas dos polissacarídeos, ou seja, quanto maior o volume hidrodinâmico, menor o volume de eluição (KASAAI, 2018).

Através dos cromatogramas obtidos pelos detectores de IR e espalhamento de luz, foi possível caracterizar a homogeneidade e calcular os valores de M_w para os polissacarídeos isolados, que estão dispostos na Tabela 4.

TABELA 4. VALORES DE dn/dc E M_w DETERMINADOS PARA AS AMOSTRAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), GALACTOMANANA DE GUAR (GG).

	dn/dc ($mL\ g^{-1}$)	M_w $10^6\ (g\ mol^{-1})$
HA	0,175	15,4
GA	0,133	2,17
GG	0,155	3,15

O parâmetro de M_w para os polissacarídeos é um fator determinante em diversas características, tais como nas viscosidades e nas propriedades de geleificação. Para os cálculos da M_w através da técnica de SEC é importante adicionar o valor do incremento do índice de refração (dn/dc), que é um parâmetro essencial na determinação de M_w e característico de cada amostra. O dn/dc é um valor referente a relação entre o índice de refração do solvente que também é o eluente, em função da concentração da amostra. Valores de

dn/dc diferentes descritos na literatura, mostraram a determinação de diferentes valores de M_w , porque afetaram a integração dos picos cromatográficos (WILLIAMS, 2018).

Foram relatados diversos valores de M_w para o HA e as GMs, na literatura. Essas diferenças, podem estar relacionadas as fontes de obtenção, extração, processos de purificação, bem como as condições experimentais, como a técnica empregada, o solvente, o pH e a temperatura, por exemplo. Os valores de M_w em g mol^{-1} para o HA são comumente encontrados entre 10^5 e 10^7 (GIJI e ARUMUGAM, 2014; ROCA-MARTINEZ e AYGLON, 2019). Para as GMs, de acordo com a Comissão de Regulamentação Europeia para aditivos alimentares, existem especificações de M_w em g mol^{-1} que podem variar entre 5×10^4 e 3×10^6 para GA e 5×10^4 e 8×10^6 (Commission Regulation (EU) 231/2012, 2012).

Observou-se que a M_w da GG determinada foi maior que a da GA, semelhante a outros resultados da literatura (DEA e MORRISON, 1975; JO et al., 2018). Portanto, os valores de M_w para os polissacarídeos isolados encontrados neste trabalho estão dentro dos relatados na literatura, onde a ordem da maior para a menor ficaria HA>GG>GA.

Se comparados os perfis das misturas com o das galactomananas isoladas, pode-se observar que houve interação entre os dois polissacarídeos, com aumento do volume hidrodinâmico das misturas em relação ao das GM isoladas.

4.2 Potencial Zeta

O potencial zeta das amostras isoladas e das misturas a 50:50 e 80:20 (m/m), foram realizadas com o intuito de se avaliar a estabilidade coloidal dos sistemas e estão dispostas na Tabela 5.

Sabe-se que o potencial zeta é dependente do pH, por isso, conforme observado para todas as amostras em pH 7,4, os valores foram negativos, indicando que as cargas residuais das cadeias dos polissacarídeos, nessas condições, são negativas (SILVA et al., 2018).

TABELA 5. POTENCIAL ZETA DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS AMOSTRAS A 25 g L⁻¹ EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), GALACTOMANANA DE GUAR (GG) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO ± DESVIO PADRÃO.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
HA	-44,89 ± 0,2
GA	-2,81 ± 0,5
GG	-6,75 ± 0,3
HA:GA 50:50	-42,01 ± 0,2
HA:GG 50:50	-40,91 ± 0,2
HA:GA 80:20	-48,59 ± 0,2
HA:GG 80:20	-42,19 ± 0,3

Para sistemas coloidais, os potenciais abaixo de -30 e acima de +30 são considerados estáveis. Para o HA isolado, o valor de -44,89 mV é um indicativo de que em meio fisiológico, o HA possui boa estabilidade (ALMALIK et al., 2013; YANG et al., 2012). Já para a GA e GG isoladas, observou-se valores próximo a zero que indicaram baixa estabilidade coloidal e mostraram tendência a agregação quando relacionado as cargas; porém, as dispersões das galactomananas são estáveis quando relacionadas à estabilização estérica que ocorre no meio, e que estão relacionadas à entropia. Portanto, no que diz respeito a GA e a GG, possivelmente os grupamentos hidroxilas pouco desprotonados nessa condição de pH, e responsáveis por essa carga negativa, estão mais expostos na GG e podem ser relacionados às unidades de galactose que estão em maior quantidade na GG quando comparada a GA.

Com relação às misturas, os valores de potencial zeta são um indicativo de estabilidade coloidal dos sistemas formados, com valores próximos ao do HA isolado, e que pode sugerir que na sinergia a parte mais externa é referente ao HA, visto que pelo método de potencial de fluxo, o potencial zeta é relacionado ao potencial elétrico do plano de cisalhamento da camada que adsorve na superfície do porta amostra, quando formam um canal de fluxo capilar (ANTON PAAR, 2019). Também foi observado que entre as misturas contendo 50:50 e 80:20 de HA:GA/HA:GG, aquelas com maior quantidade de HA apresentaram maior estabilidade coloidal.

4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

4.3.1 RMN para as Galactomananas (GA e GG)

Com o intuito de caracterizar as galactomananas deste trabalho quanto a sua estrutura, através dos espectros de HSQC foram encontrados os deslocamentos químicos característicos de unidades de manose e galactose, apresentados na Tabela 6. De forma geral, os deslocamentos comuns entre as duas galactomananas não se diferem, e as peculiaridades de cada uma delas se dão, principalmente, pelos deslocamentos referentes às substituições nas unidades de manose (região de C-4).

Além dos deslocamentos já mencionados, os demais apresentados na Tabela 6, são comprovados pela literatura (MUSCHIN e YOSHIDA, 2012; SOUZA et al., 2009; GRASDALEN e PAINTER, 1980).

TABELA 6. DESLOCAMENTOS (δ , ppm) OBTIDOS POR ESPECTROS DE HSQC DE AMOSTRAS DE GALACTOMANANAS DE ALFARROBA E GUAR (GA E GG).

	GA				GG			
	Manose		Galactose		Manose		Galactose	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)
1	101,894	4,762	100,659	5,047	101,850	4,763	100,635	5,039
2	71,816	4,135	71,266	3,861	71,732	4,137	71,272	3,857
3	73,269	3,825	71,289	3,944	73,236	3,821	71,297	3,934
4 I	78,269	3,817	71,133	4,033	78,525	3,845	71,147	4,025
4 II	78,281	3,854			78,602	3,897		
4 III	78,548	3,908			78,632	3,949		
5	76,901	3,561	73,029	3,913	76,921	3,561	73,039	3,909
6I	68,402	3,994			68,402	3,976		
6III	68,463	3,824	62,105	3,773	68,819	3,819	62,067	3,768

I: duas unidades contínuas de manose substituídas por galactose; II: díades onde somente uma das duas unidades de manose são substituídas; III: unidades não substituídas de manose são adjacentes a outras unidades.

Através dos espectros de RMN-¹H, foi possível identificar para a GA (Figura 13) e GG (Figura 14) os deslocamentos referentes ao H-1 das unidades de α -D-galactose e β -D-manose a δ 5,047 e 4,762 ppm para a GA e δ 5,039 e

4,763 ppm para a GG, respectivamente, os quais estão ligados aos carbonos anoméricos de cada uma das galactomananas. A partir dos deslocamentos de H-1 de cada um dos monossacarídeos e as respectivas integrações dos deslocamentos foi possível mensurar as razões de manose/galactose (Man/Gal) nas estruturas dos polissacarídeos. Para a GA, a razão foi de $\sim 3,04$ e para a GG de $\sim 1,5$. Na diversidade com que a natureza se apresenta para esses biopolímeros, encontra-se uma gama de galactomananas com diferentes graus de substituição de galactose, e conseqüentemente, diferentes razões de Man/Gal podem ser obtidas, onde estudos relatados em literatura mostraram essas variações. Por exemplo, para a galactomanana de guar foram descritas razões entre 1,6 e 1,8 (CHENG et al., 2002), para as extraídas da semente de *Caesalpinia ferrea*, razão de 2,1 (SOUZA et al., 2009) e a de *Leucaena leucocephala*, razão 1,9 (SIERAKOWSKI et al., 2000) e de sementes de *Cassia fastuosa* e de *Schizolobium amazonicum* com razão de 3,0 (PETKOWICZ et al., 1998). Esses valores, portanto, variam em função da espécie vegetal, formas de extração e processos de purificação.

FIGURA 13. ESPECTRO DE RMN-¹H DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), OBTIDOS A 70°C, EM D₂O E TMSP COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm. INTEGRAÇÃO DE H-1 PARA DETERMINAR A RAZÃO MANOSE/GALACTOSE.

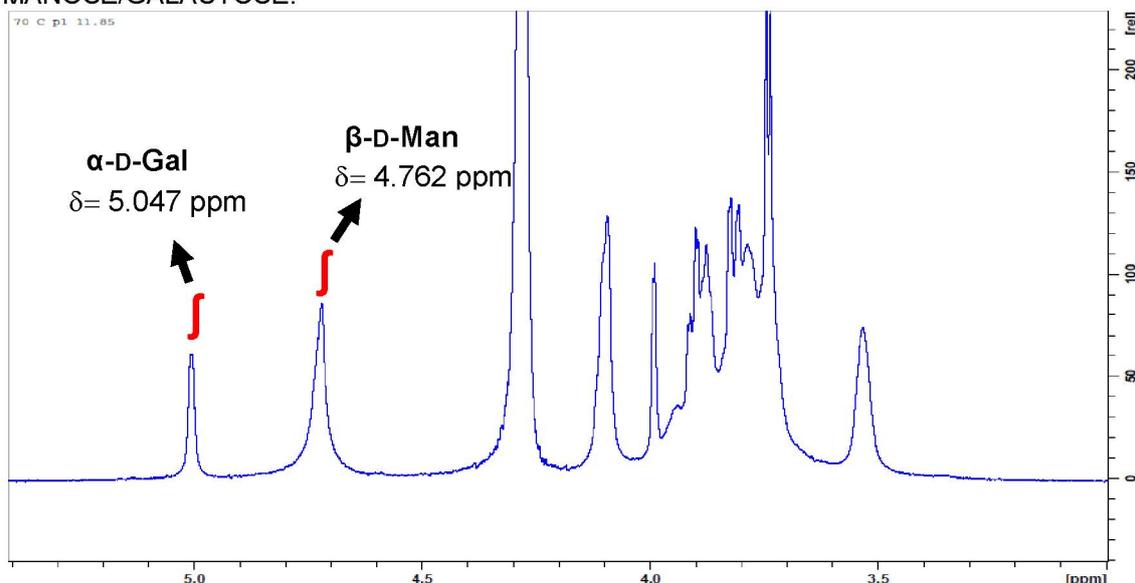
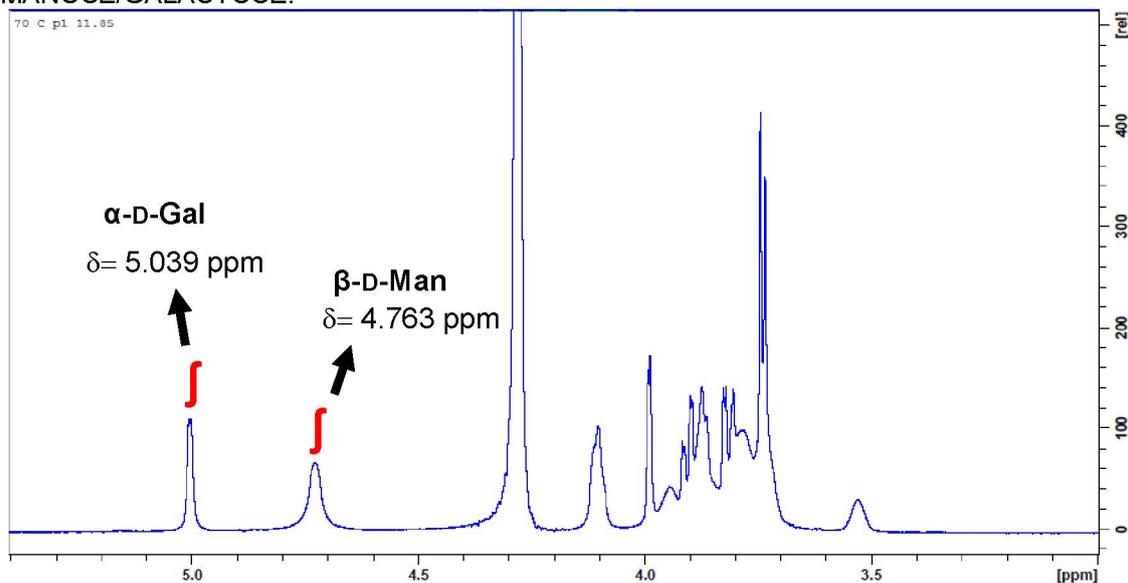


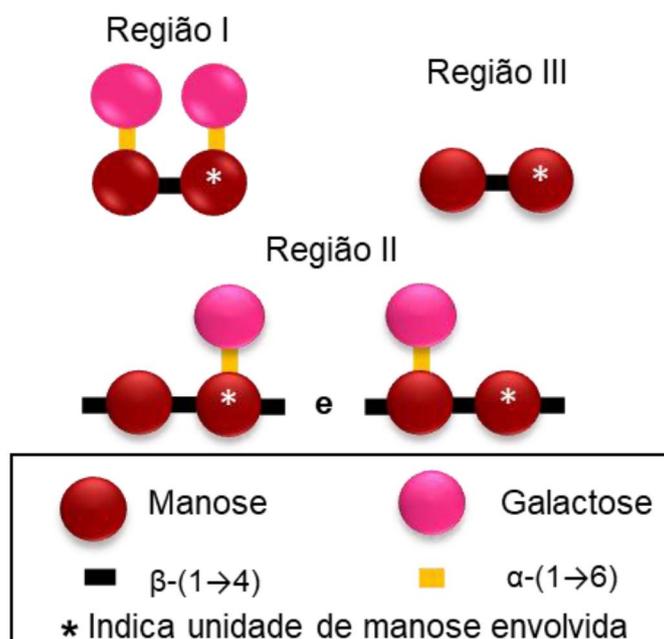
FIGURA 14. ESPECTRO DE RMN-¹H DA GALACTOMANANA DE GUAR (GG), OBTIDOS A 70°C, EM D₂O E TMS⁺ COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm. INTEGRAÇÃO DE H-1 PARA DETERMINAR A RAZÃO MANOSE/GALACTOSE.



Já foi mencionado em literatura que a GG tem mais unidades de manose substituídas por galactose quando comparada com a GA (DEA e MORRISON 1975). Através dos espectros de HSQC foi possível identificar os deslocamentos referentes ao C-4 e H-4 de manose não substituída (menor proporção), parcialmente substituída e não substituída por galactose. De acordo com Dea e Morrison (1975), as integrais dos deslocamentos de C-4 podem indicar a distribuição das regiões da cadeia principal de manose que são substituídas por galactose, indicadas por região I, II e III, como ilustrado na Figura 15, indicadas por I (¹³C/¹H δ 78,269/3,817 ppm), II (¹³C/¹H δ 78,281/3,854 ppm) e III (¹³C/¹H δ 78,548/3,908 ppm) para GA e I (¹³C/¹H δ 78,525/3,845 ppm), II (¹³C/¹H δ 78,602/3,897 ppm) e III (¹³C/¹H δ 78,563/3,949 ppm) para GG. Primeiramente, I é atribuída a duas unidades contínuas de manose substituídas por galactose; II são díades nas quais somente uma das duas unidades de manose são substituídas; e III quando unidades não substituídas de manose são adjacentes a outras unidades do mesmo monossacarídeo (DEA e MORRISON, 1975; DE SOUZA et al., 2010). A somatória das integrais destas regiões pode dar uma indicação do grau da distribuição das ramificações na estrutura principal. Para a GA, a proporção foi de 16,3% para I, 51,2% para II e 32,5% para III. A GG apresentou uma proporção de 49,0% para I, 43,1% para II e 7,9% para III. Confirmando que há uma porcentagem maior de regiões que apresentam

galactose para a GG com relação a GA, enquanto a porcentagem de região não substituída é maior para a GA. De posse desses resultados e sabendo que a massa molar de cada unidade de manose é a mesma da de galactose foi possível encontrar a razão Man/Gal, como sendo 3 para a GA e 1,56 para a GG. Resultados esses muito próximos aos encontrados na região de H-1 do espectro de RMN-¹H.

FIGURA 15. ESQUEMA DA DISTRIBUIÇÃO DAS RAMIFICAÇÕES POR GALACTOSE NAS UNIDADES DE MANOSE, REGIÃO DE C-4, NA ESTRUTURA DAS GALACTOMANANAS.



4.3.2 RMN para o Ácido Hialurônico

Com relação ao HA, os deslocamentos químicos encontrados esses foram correspondentes aos relatados na literatura (BOCIEK et al., 1980; ELELLA et al., 2018) e estão descritos na Tabela 7. Esses correspondem aos deslocamentos referentes aos monossacarídeos que compõe a estrutura, os quais são ácido glucurônico e N-acetilglucosamina, identificados no espectro por HSQC. Através de RMN-¹H, foi possível encontrar um deslocamento em δ ~2,038 ppm, que é referente ao próton metil do N-acetil (-COCH₃).

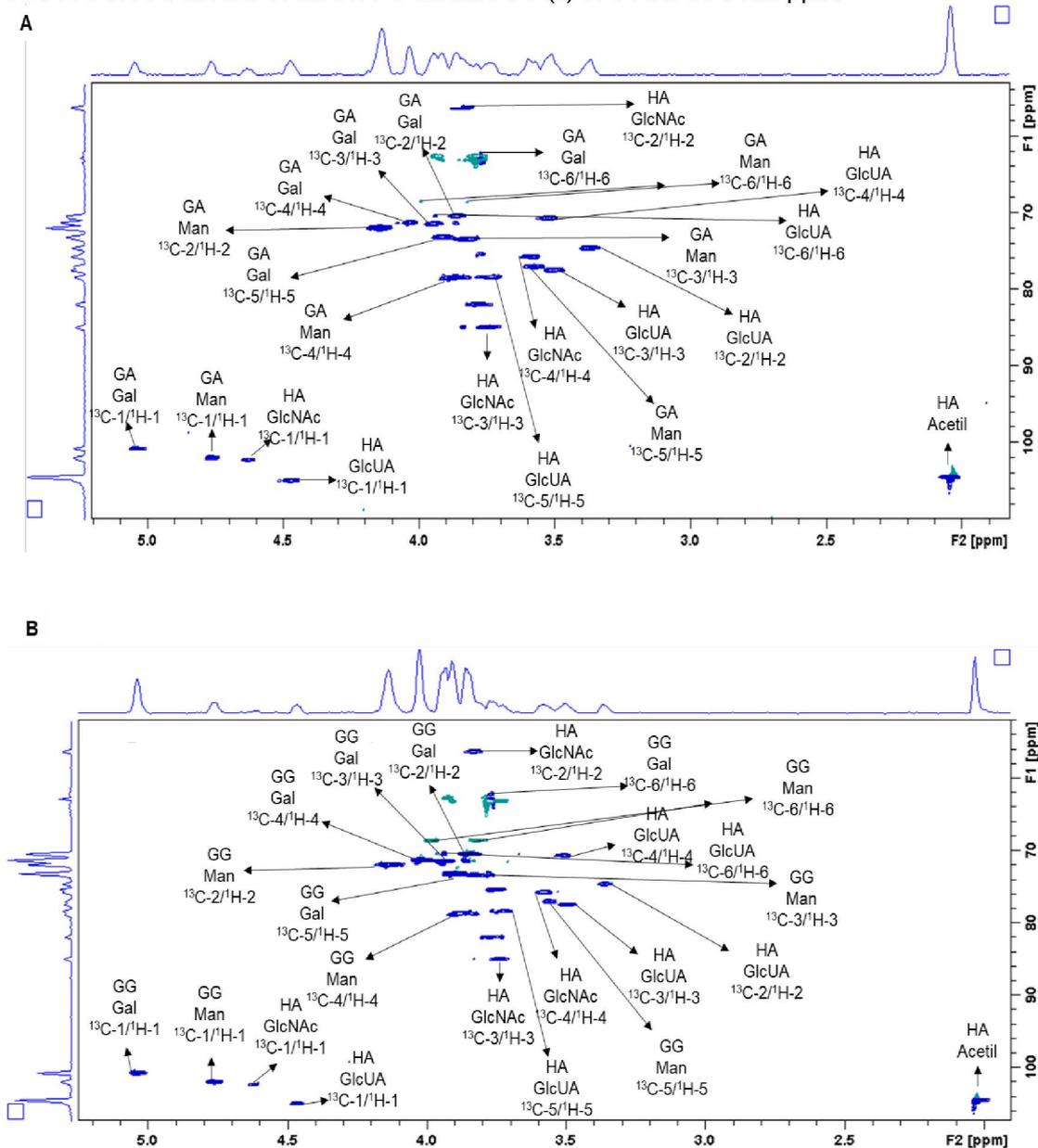
TABELA 7. DESLOCAMENTOS (δ , ppm) OBTIDOS POR ESPECTROS DE HSQC PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA).

	Ácido Hialurônico			
	Ácido glucurônico		N-acetilglucosamina	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	104,860	4,465	102,197	4,611
2	74,489	3,367	56,166	3,834
3	75,723	3,578	84,849	3,735
4	81,808	3,776	70,506	3,501
5	78,248	3,727	77,454	3,472
6			62,7	3,90
				3,744

4.3.3 RMN para as Misturas (HA:GA e HA:GG)

A Figura 16 mostra os espectros de HSQC obtidos para as misturas HA:GA e HA:GG.

FIGURA 16. ESPECTROS DE HSQC PARA AS MISTURAS A: ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E B: ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), OBTIDOS A 70°C, EM D₂O E TMSP COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm.

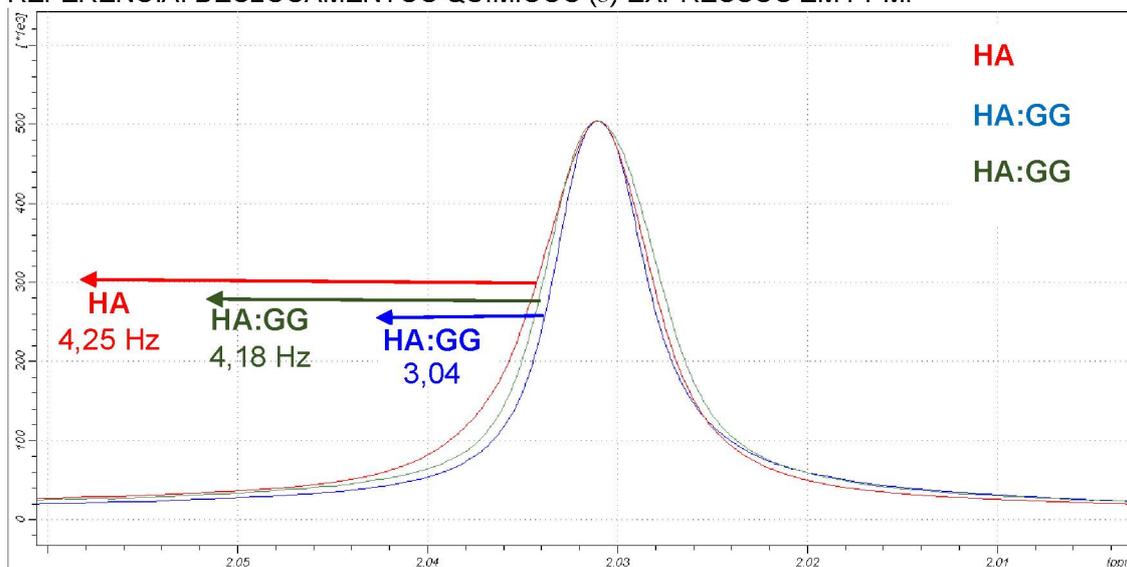


A Figura 17 indica os deslocamentos referentes ao grupamento metil das unidades de N-acetilglucosamina, comparativamente a estrutura do HA nas misturas se apresentaram mais avolumados (em δ , ~2,028 ppm para HA:GG, e ~2,035 ppm para HA:GA) do que para o do HA isolado (em δ , ~2,015 ppm). Foram medidos os valores da meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$, $\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_2$) desses deslocamentos e encontrados os valores de 4,25 Hz, 4,18 Hz e 3,04 Hz para HA, HA:GG e HA:LBG, respectivamente. A diminuição do T2 observada pelo menor

$\Delta\nu_{1/2}$ pode ser um indicativo de interação intermolecular entre os polissacarídeos devido o processo de mobilidade e relaxação dos spins. Quanto maior esse processo de relaxamento maior seria a mobilidade, que é atribuída ao relaxamento transversal (T2) (MORRIS, 1980; BOURBON et al., 2010; SASSAKI et al., 2014), e com a seguinte sequência de mobilidade de HA>HA:GG>HA:LBG.

Assim, quando comparado os polissacarídeos isolados às misturas, foi possível observar uma tendência ao alinhamento das moléculas, aumentando a anisotropia em função do campo aplicado. Portanto, um magnetismo diferente ocorreu alterando os deslocamentos químicos, onde, o movimento de elétrons ao redor do núcleo foi diferente para a mistura dos polissacarídeos HA:GA e HA:GG.

FIGURA 17. A: REGIÃO DOS ESPECTROS DE RMN-¹H DO GRUPO METIL DA N-ACETILGLUCOSAMINA DO ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E DESSE NAS MISTURAS ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) (50:50), OBTIDOS A 70°C, EM D₂O E TMSP COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.



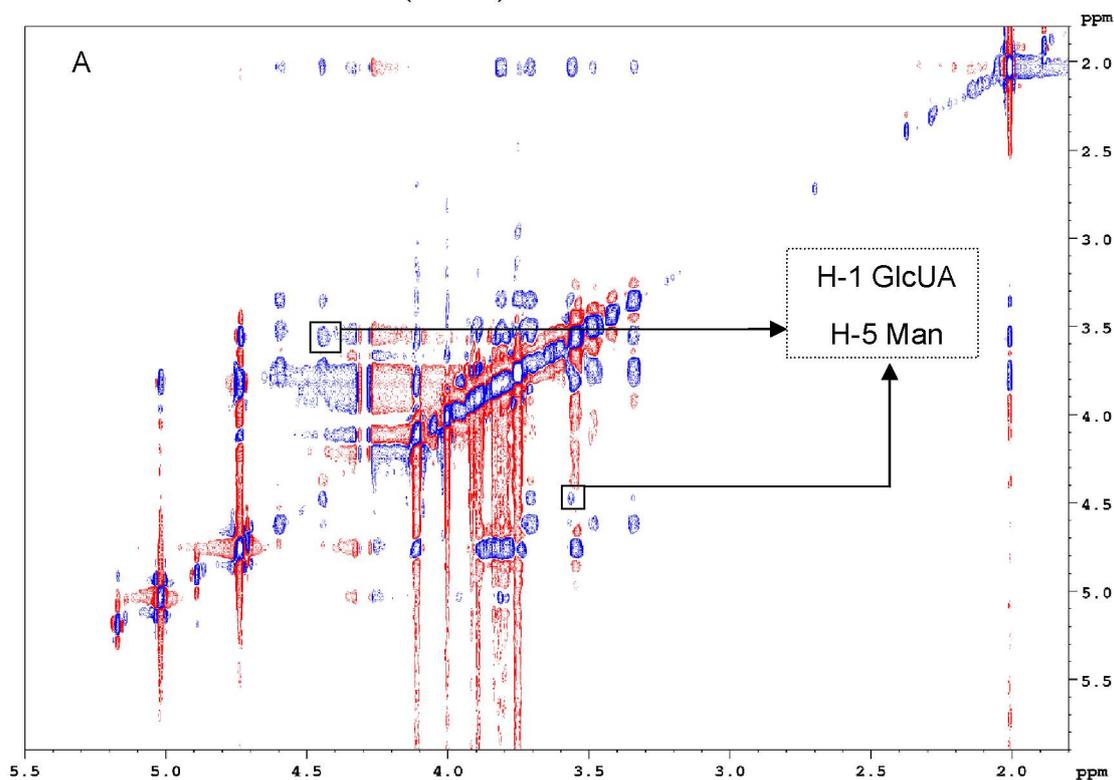
No estudo das estruturas de polissacarídeos pela técnica de RMN, existe uma dificuldade para a definição correta dos deslocamentos da região entre H-2 e H-6, principalmente quando se estuda interação entre diferentes polissacarídeos. Por isso, os espectros bidimensionais podem ajudar na elucidação das estruturas e das respectivas interações. Assim, as amostras foram avaliadas pelo espectro de NOESY, o qual relaciona por espectro

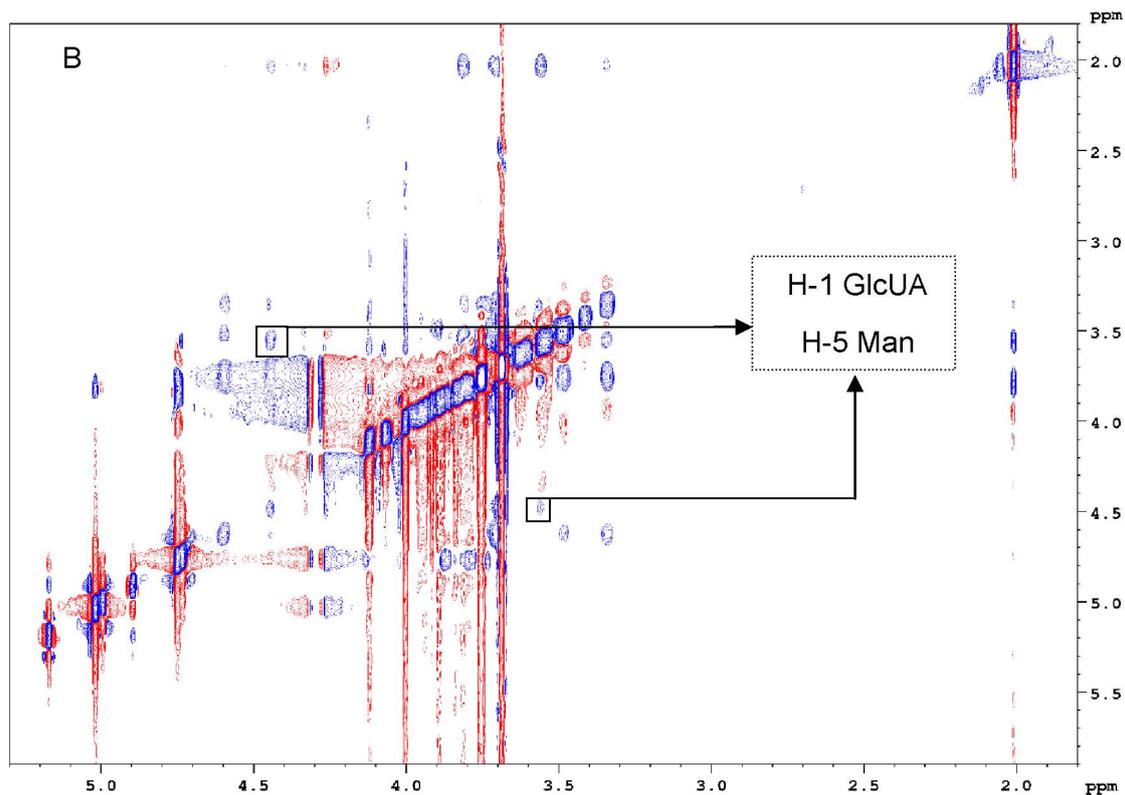
bidimensional interações entre ^1H - ^1H , o qual pode identificar associações intermoleculares e identificar ligações, onde os deslocamentos são detectados quando dois núcleos estão próximos (distância entre 0,3 e 0,5 nm) (TAKEMASA e NISHINARI, 2016). Com base nesses espectros foi possível confirmar que ocorreu interação entre o HA e GA (Figura 18: A) e entre o HA e GG (Figura 18: B).

Para as duas misturas, foi possível observar a interação entre o H-1 da unidade de ácido glucurônico (δ 4,451 ppm) com o H-5 da unidade de manose (δ 3,561 ppm).

Em relação as duas galactomananas e suas interações com o HA, pode-se afirmar que a estrutura é um fator importante na interação. Sabe-se que a GA é uma galactomanana menos substituída por galactose que GG. Logo, GA apresentou maior viscosidade e possivelmente apresentou melhor interação com o HA pela cadeia principal. Pode-se sugerir que a interação acontece na cadeia principal (unidades de manose) com as unidades de ácido glucurônico da estrutura de HA (TAKEMASA e NISHINARI, 2016).

FIGURA 18. ESPECTROS NOESY, OBTIDOS A 70°C, EM D_2O E TMSPO COMO REFERÊNCIA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM ppm. A: MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E B: ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG).





4.4 Reologia

4.4.1 Testes em diferentes condições, para amostras de HA, GA e GG, no regime não oscilatório

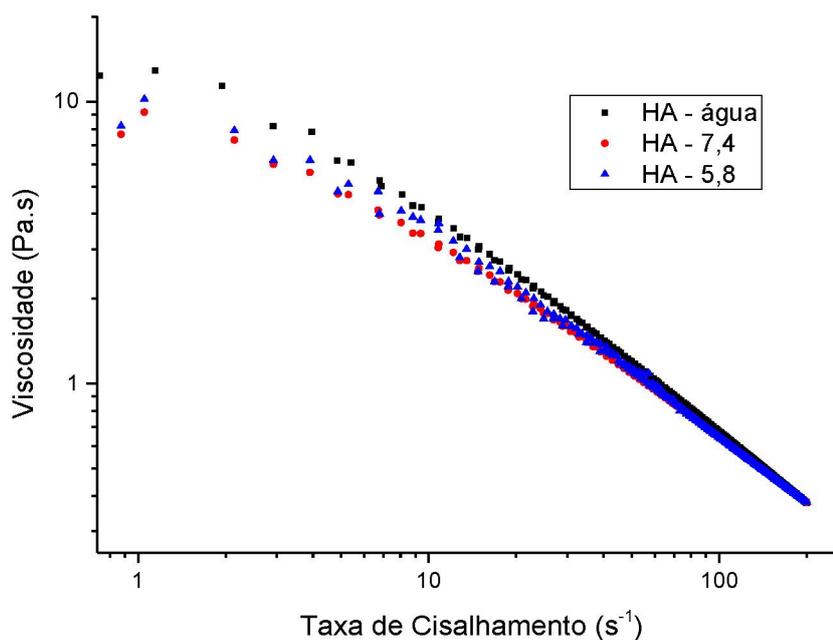
Nos resultados obtidos para três amostras independentes observou-se um desvio de 0,5-2%, nos valores de viscosidade aparente, de comportamento viscoso e do elástico em todos os experimentos dentro, portanto, do erro do equipamento e de procedimento, por isso optou-se pela apresentação de apenas uma das curvas para cada avaliação.

Nos primeiros testes foram avaliados a influência do pH e da concentração para cada polissacarídeo isolado (HA, GA e GG). Na concentração de 10 g L^{-1} , os polissacarídeos foram dispersos em água ultrapura, tampão fosfato a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 5,8 e a pH 7,4 e, então, submetidos aos ensaios no reômetro. O pH 5,8 foi escolhido por ser o pH próximo ao da pele humana e o pH 7,4 por ser o pH do meio fisiológico.

A Figura 19 se refere à curva de fluxo de uma amostra de HA na concentração de 10 g L^{-1} dispersa em água, a qual, em toda faixa de

cisalhamento avaliada, se comportou como um fluido pseudoplástico, ou seja, com o aumento da taxa de cisalhamento, diminui concomitantemente a viscosidade aparente, que pode indicar um alinhamento das cadeias com o aumento do fluxo reduzindo, assim, a viscosidade. A maior contribuição observada para a pseudoplasticidade do HA atribuiu-se à ruptura das ligações de hidrogênio intermoleculares durante o cisalhamento, ou seja, daquelas formadas entre as unidades das cadeias adjacentes (MALEKI et al., 2008). Outro fator interessante a ser mencionado, nessa figura, é que a viscosidade aparente obtida com o aumento da taxa de cisalhamento se sobrepõe à viscosidade aparente obtida com a diminuição da taxa de cisalhamento mostrando que, a característica do fluido se manteve, independente do tempo dessa análise.

FIGURA 19. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 10 g L⁻¹ DISPERSO EM ÁGUA, TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 E 5,8, A 25°C.

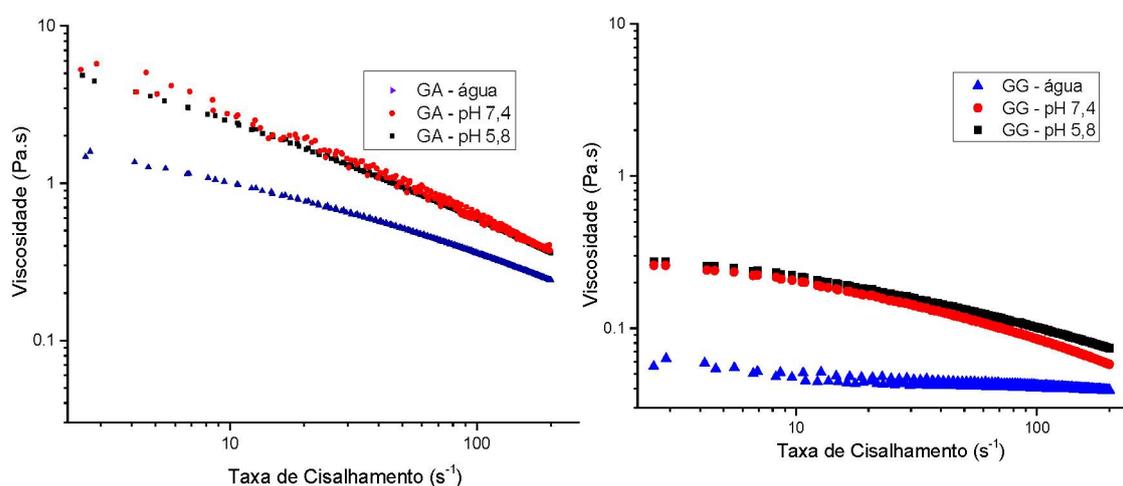


Também na Figura 19, observou-se que o HA apresentou um comportamento pouco variável na presença de tampão e na alteração de pH. Maleki et al. (2008) em estudo com uma amostra de HA de massa molar de $1,6 \times 10^6$ g mol⁻¹ observaram que o pH não teve grande influência sobre o comportamento viscoso quando o valor estava entre 4 e 11. E, abaixo de pH 4 ou acima de 11, pode ocorrer degradação das cadeias, através da clivagem das

ligações glicosídicas por hidrólise, ou ainda por β -eliminação, assim como podem ocorrer ruptura das interações intramoleculares, ou seja, aquelas envolvidas internamente entre as unidades de carboidrato constituintes das cadeias do polissacarídeo. Assim, considerando os pHs utilizados nos ensaios, inclusive em água pura, esses não afetaram a estrutura do HA quanto a alteração da sua carga superficial, visto que as viscosidades ficaram próximas entre si, nessas condições de estudo.

No caso das galactomananas dispersas em água, essas apresentaram menor viscosidade aparente em toda a faixa de taxa de cisalhamento analisada, quando comparadas as amostras preparadas em tampão; e menor viscosidade quando comparadas com o perfil do HA (Figura 20). Essa viscosidade menor pode ser explicada pela diferença entre os valores de massa molar e, também, pela estrutura das galactomananas que são neutras e com isso podem favorecer maior agregação das cadeias, logo menor concentração, quando comparadas à de polissacarídeo carregados, como é o caso do HA (CARNEIRO-DA-CUNHA et al., 2011).

FIGURA 20. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS AMOSTRAS DE GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) E DE GALACTOMANANA DE GUAR (GG) A 10 g L⁻¹ NOS SOLVENTES: ÁGUA, TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 E 5,8, A 25°C.



Em especial, a GG em água apresentou comportamento de um fluido Newtoniano, enquanto nos demais solventes teve um caráter pseudoplástico. Esse comportamento da GG, possivelmente, se deve porque a quantidade de suas ramificações é maior, portanto, tem a cadeia principal de unidades de

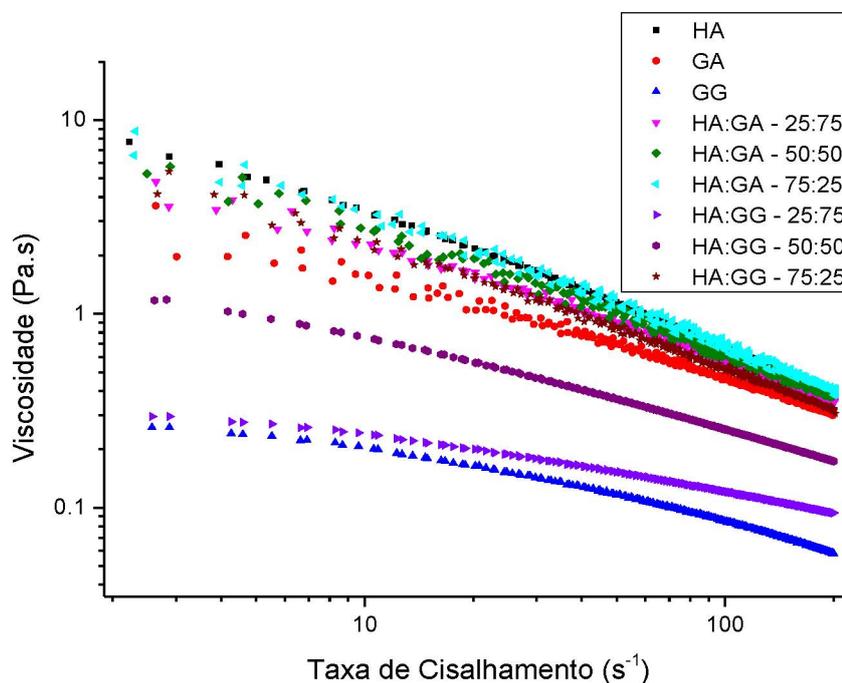
manose mais substituída por galactose e é mais solúvel em água, quando comparada com a GA. No caso da GG em água, o comportamento Newtoniano pode sugerir que os emaranhados das cadeias foram rompidos pelo cisalhamento, mas foram equilibrados pela formação de novos emaranhamentos, e não ocorreram mudanças na viscosidade (SITTIKIYOTHIN et al., 2005). No caso da GA, com o aumento da taxa de cisalhamento aconteceu uma diminuição da viscosidade aparente, que pode indicar modificações na organização macromolecular das dispersões. O aumento da taxa de cisalhamento tendeu a alinhar as moléculas em direção ao fluxo e concomitantemente a viscosidade aparente diminuiu, pelo rompimento de ligações de hidrogênio intra-moleculares.

A variação da viscosidade com a alteração do solvente aquoso, pode ser explicada pela diferença de força iônica dos meios, onde em água as cadeias tendem a ter maior propensão a agregar, diminuindo a viscosidade da dispersão quando comparada aos dois tampões estudados. Para as amostras preparadas em tampão, foram observadas maior viscosidade. Essa diferença de comportamento das galactomananas conforme o meio de dispersão, foi bastante evidente para a GG, possivelmente porque possui maior quantidade de grupamentos OH disponíveis na estrutura quando comparada a GA que, possui menor teor de substituição por galactose na cadeia principal de manose (CARNEIRO-DA-CUNHA et al., 2011).

Visto os resultados obtidos e considerando a necessidade de experimentos *in vitro* de citotoxicidade e proliferação celular o solvente escolhido para a sequência de experimentos foi o tampão fosfato em pH 7,4 que, também, é próximo ao pH fisiológico. Demais concentrações foram avaliadas, como segue.

Com o intuito de se conhecer o comportamento viscoso das misturas de HA e GA e de HA e GG, a Figura 21 apresenta os resultados do comportamento viscoso dessas nas proporções de HA:GA e HA:GG de 50:50, 25:75 e 75:25 (% m/m), comparativamente aos polissacarídeos isolados. No perfil das curvas observou-se que a viscosidade aumentou com o aumento da porcentagem de HA e, por consequência, aumentou o caráter pseudoplástico.

FIGURA 21. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS AMOSTRAS A 10 g L^{-1} DAS MISTURAS DE MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), BEM COMO PARA OS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C .



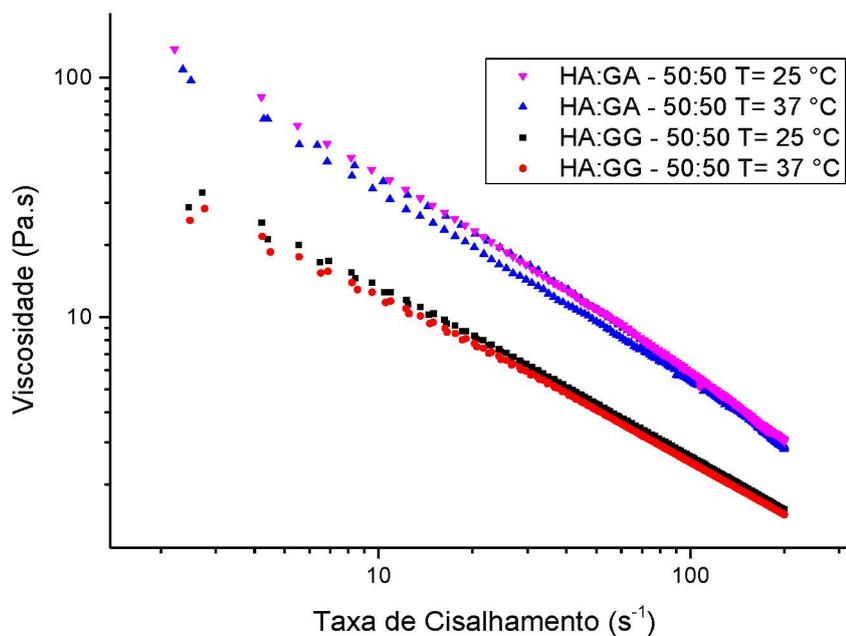
Nas análises do comportamento viscoelástico dessas amostras (dados não apresentados), observou-se características de géis fracos, onde as misturas de HA:GG foram as mais fracas, por terem apresentado viscosidade dinâmica complexa menor que a de HA:GA e, mais próximas à do HA isolado, nas misturas HA:GA com maiores porcentagens de HA.

Também foram avaliadas as curvas de viscosidade nas concentrações de 15 , 20 e 25 g L^{-1} e com diferentes porcentagens (m/m) dos polímeros para as misturas. Pode-se afirmar que, com o aumento da porcentagem de HA, houve um aumento da viscosidade das misturas. Porém, apenas na concentração de 25 g L^{-1} pode ser observado o sinergismo, os dados serão abordados e discutidos nos próximos tópicos. Portanto, por reologia concluiu-se que a concentração, ou seja, a quantidade de moléculas é um fator importante para a avaliação dessa propriedade.

Também foram realizados testes com variação de temperatura na concentração de 25 g L^{-1} , para misturas com 50:50 (% m/m), na temperatura do corpo humano, 37°C (Figura 22). Tanto as misturas de HA:GA como as de HA:GG apresentaram boa estabilidade com essa variação de temperatura, visto

que as diferenças de viscosidade entre as temperaturas de 25°C e a de 37°C são mínimas. Visando, por exemplo, a temperatura próxima de armazenamento de um produto em prateleira (próximo de 25°C), e a de quando o produto possa ser aplicado no corpo humano (aproximadamente 37°C), pode-se observar que a mistura em relação à viscosidade foi estável a essa variação de condições térmicas. A temperatura é uma variável importante de ser estudada, visto que pode afetar a viscosidade e a interação no corpo humano, no caso de aplicações médicas, por exemplo.

FIGURA 22. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS MISTURAS A 25 g L⁻¹ DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) (50:50, m/m), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C E A 37°C.



Os primeiros experimentos efetuados com os polissacarídeos isolados e em diferentes condições das misturas foram importantes para escolher e definir as melhores condições, para que assim se pudesse detalhar os estudos reológicos. Assim, foi escolhida a concentração de 25 g L⁻¹, visto que essa foi também a maior concentração em que foi possível dispersar os três polissacarídeos sem variação de temperatura ou de tempo de agitação. Também foi a concentração onde se obteve melhores comportamentos das misturas, como será apresentado a seguir.

4.4.2 Regime não oscilatório

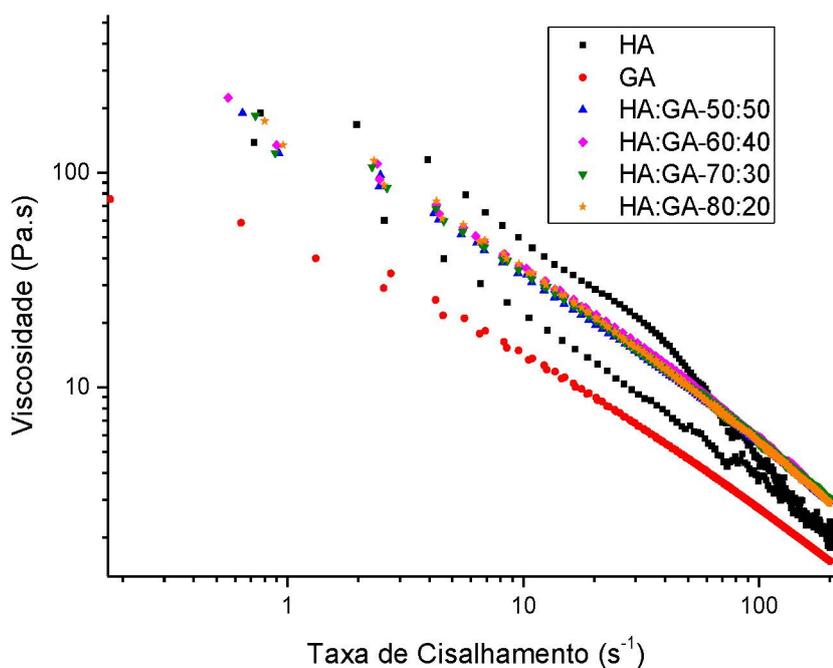
4.4.2.1 Sistema HA:GA, polissacarídeos isolados e as misturas

A Figura 23, apresenta as curvas de viscosidade obtidas para uma das amostras dos polissacarídeos isolados e para uma das misturas a 25 g L^{-1} , na temperatura de 25°C . Um comportamento distinto ocorreu com o HA em relação às demais amostras, onde nessa concentração e faixa de varredura de cisalhamento ocorreu histerese, ou seja, na curva de fluxo, a varredura de cisalhamento no sentido do aumento de $0,1$ até 200 s^{-1} e, posteriormente, a do decréscimo de 200 até $0,1 \text{ s}^{-1}$, a viscosidade foi menor na segunda etapa (retorno), diferindo do comportamento do HA em concentrações menores mostrando, portanto, que o HA apresentou viscosidade dependente do tempo nessa concentração. Esse comportamento pode estar relacionado com o volume hidrodinâmico das cadeias de HA nessa concentração. As cadeias do polímero interagiram com o aumento da taxa de cisalhamento, e quando essa taxa se tornou alta o suficiente para ultrapassar a velocidade em que a estrutura pode relaxar, as cadeias se aproximaram e interagiram hidrodinamicamente e, por consequência, se distorceram e como consequência a viscosidade caiu (COWMAN, 2005). Assim, quando a dispersão estava em repouso, tendeu a ter uma maior resistência ao fluxo e após essa interação das estruturas relaxadas, existiu uma menor resistência ao fluxo e, por isso, a viscosidade foi menor.

As misturas com 50, 60, 70 e 80 % (m/m) de HA mostraram o aparecimento de sinergismo de forma que não ocorreu mais a histerese observada para o HA isolado. Isso possivelmente ocorreu porque quando os dois polissacarídeos foram misturados houve uma maior interação entre as cadeias formando uma rede a qual, após ser deformada pelo cisalhamento, teve maior facilidade de se reorganizar em campo mais baixo de fluxo, quando, comparada a do HA isolado, na mesma concentração. E em taxas de cisalhamento maiores que aproximadamente 60 s^{-1} , as misturas apresentaram maior viscosidade que a dos polissacarídeos isolados. Em repouso, essas misturas também apresentaram viscosidade maior que a dos polissacarídeos isolados. Outro fator de destaque foi que todas as misturas apresentaram comportamento viscoso muito semelhante. Chamando atenção, principalmente, a mistura contendo 50%

de HA e 50% de GA, que manteve os mesmos valores de viscosidade que os das misturas com porcentagens em massa mais altas de HA.

FIGURA 23. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DAS MISTURAS DO SISTEMA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C .



De forma complementar, todas as curvas de viscosidade foram tratadas por modelos matemáticos de Ostwald de Waele e de Moore e avaliadas sobre as características dos parâmetros de cada modelo, os quais estão apresentados na Tabela 8. Observou-se que para o sistema HA:GA, houve uma boa adequação dos modelos estudados, principalmente para a GA isolada e as misturas, onde os valores de R^2 obtidos estão entre 0,979 e 0,999.

TABELA 8. VALORES DE REGRESSÃO DAS CURVAS DE VISCOSIDADE, PELOS MODELOS DE OSTWALD DE WAELE E O DE MOORE, PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) ISOLADAS E PARA AS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.

Amostras (%, m/m)	Ostwald de Waele			Moore			
	K (Pa.s ⁿ)	n	R ²	η_{∞} (Pa.s)	η_0 (Pa.s)	τ (s)	R ²
HA 100	176,17 $\pm 0,05$	0,26 $\pm 0,03$	0,869	0,22 $\pm 0,03$	158,65 $\pm 0,05$	0,34 $\pm 0,03$	0,989
GA 100	55,85 $\pm 0,05$	0,37 $\pm 0,02$	0,979	0,75 $\pm 0,02$	52,52 $\pm 0,02$	0,27 $\pm 0,02$	0,999
HA:GA 50:50	195,21 $\pm 0,01$	0,23 $\pm 0,01$	0,999	0,82 $\pm 0,02$	135,50 $\pm 0,01$	0,30 $\pm 0,01$	0,999
HA:GA 60:40	210,06 $\pm 0,04$	0,25 $\pm 0,03$	0,999	0,83 $\pm 0,01$	151,65 $\pm 0,05$	0,31 $\pm 0,01$	0,999
HA:GA 70:30	216,8 $\pm 0,02$	0,25 $\pm 0,03$	0,989	0,93 $\pm 0,01$	143,82 $\pm 0,02$	0,31 $\pm 0,01$	0,999
HA:GA 80:20	226,3 $\pm 0,01$	0,26 $\pm 0,02$	0,999	0,97 $\pm 0,02$	167,95 $\pm 0,05$	0,36 $\pm 0,03$	0,999

Pelo modelo de Ostwald de Waele foi possível obter o índice de comportamento (n), o qual, quanto mais próximo de 0, corresponde a maior característica de um fluido pseudoplástico, enquanto que para o valor que se aproxima de 1 caracteriza um fluido Newtoniano. Os sistemas avaliados mostraram comportamento de fluido pseudoplástico, com relação aos polímeros isolados, onde o HA teve comportamento mais pseudoplástico quando comparado a GA, o que está relacionado com os valores de M_w . E as misturas com maiores teores de HA apresentaram valores de n semelhantes ao do HA. Outro parâmetro possível de se estudar foi o coeficiente de consistência (K), relacionado a viscosidade, assim sendo, quanto maior esse índice, maior é a viscosidade do fluido. Para os polímeros isolados, observou-se que o valor de HA foi pouco mais de três vezes maior do que para a GA e também relacionado aos valores de massa molar de cada amostra. Com relação às misturas, observou-se aumento do índice com o aumento da porcentagem de HA; e esses valores foram maiores do que para o HA, podendo indicar um sinergismo entre os dois polissacarídeos corroborando com o que foi observado visualmente nas curvas de viscosidade e, também, no volume hidrodinâmico no perfil de eluição por SEC.

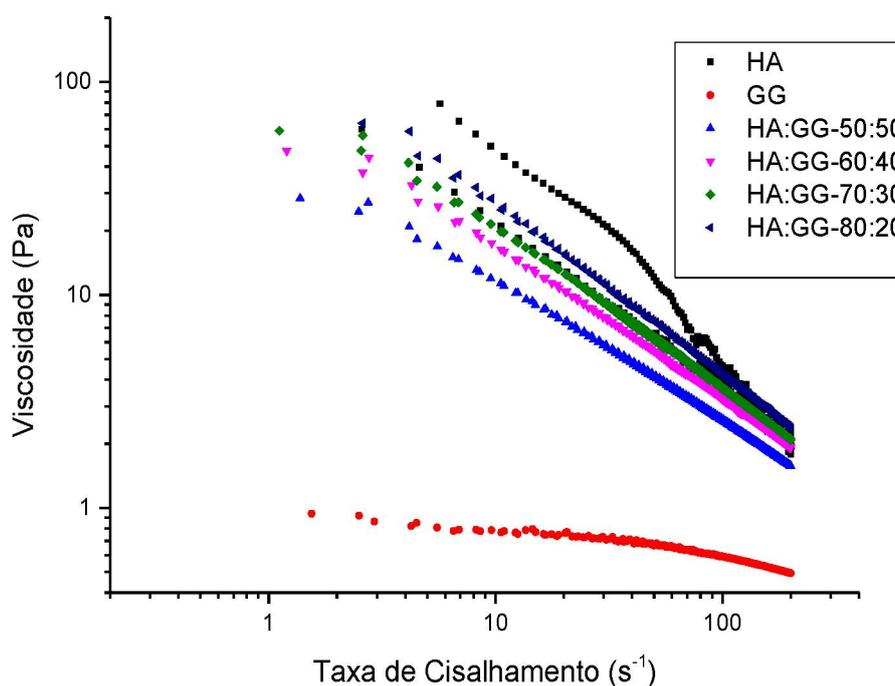
As curvas de viscosidade avaliadas, pelo modelo de Moore, para o sistema HA:GA, puderam informar parâmetros relacionados a viscosidade a uma taxa de cisalhamento tendendo a zero (η_0), que indica a viscosidade do fluido a baixas taxas de cisalhamento e, quanto maiores as interações inter-cadeias e a M_w , maior será a η_0 (RAZAVI et al., 2016). Para o HA, o valor encontrado foi aproximadamente três vezes maior em comparação com a GA, em coerência com a sua maior M_w , e as misturas apresentaram valores próximos ao HA com o aumento da porcentagem de HA nas misturas.

O tempo de relaxação (τ), define o tempo típico que macromoléculas levam para retornar ao equilíbrio após o cisalhamento, e seguiu a tendência da η_0 na qual o HA valor foi superior ao GA, enquanto que as misturas também apresentaram valores de aumento com a maior porcentagem de HA. Maiores valores do tempo de relaxação indicaram que o aumento do emaranhamento das cadeias levou a diminuição do movimento das cadeias individuais e, assim, aumentaram o tempo que as cadeias precisam para voltar ao equilíbrio (BOURBON et al., 2010). Aparentemente, a GA possui uma estrutura mais flexível quando comparada a do HA, já que os menores valores de viscosidade a baixas taxas de cisalhamento indicaram uma estrutura tendendo a maior flexibilidade. Com relação às misturas, podem ocorrer interações e aglomerações devido as interações entre as cadeias dos polissacarídeos e as suas cargas. Na condição de pH 7,4 dos ensaios, o HA é aniônico e a GA é neutra, apresentando assim maior expansão das cadeias nas misturas e que, conseqüentemente, aumentaram a viscosidade. Com relação à viscosidade tendendo a taxa de cisalhamento infinito (η_{∞}), essa pode dar informações sobre a consistência de um produto durante o processamento, como o bombeamento, por exemplo. Quanto maior for o valor, maior seria a energia requerida para o processo (HESARINEJAD et al., 2014). Observou-se que o HA teve o menor valor, porém, para as misturas a η_{∞} aumentou com o aumento da porcentagem de HA, indicando um comportamento que necessita de mais energia para as misturas fluírem, quando comparado à dos polímeros isolados.

4.4.2.2 Sistema HA:GG, polissacarídeos isolados e as misturas

Avaliando as curvas de viscosidade da Figura 24, foi nítida a diferença de comportamento entre a GG e os demais sistemas.

FIGURA 24. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS MISTURAS ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C .



O comportamento do HA isolado já foi comentado quando apresentado na Figura 23 e comparado com o sistema HA:GA. No caso das misturas HA:GG, não se observou histerese, como foi visto para o HA isolado. Isso foi um fator interessante no comportamento do fluido com a aplicação de uma taxa de cisalhamento, onde a variação da viscosidade foi a mesma, independente se avaliada em taxas crescentes ou decrescentes de cisalhamento. E se observou sinergismo nas misturas dos polissacarídeos, tendendo a se aproximar do HA, e mais evidente para a mistura HA:GG 80:20, onde toda a curva de viscosidade ficou entre as curvas de ida e de volta do HA.

As curvas de viscosidade dos sistemas de HA:GG também foram avaliadas pelos mesmos modelos usados para a mistura HA:GA, e os resultados

estão apresentados na Tabela 9. O índice de comportamento (n) mostrou uma grande diferença para os polímeros isolados, indicando que a GG teve um comportamento bem próximo a um fluido Newtoniano (0,85) quando comparado ao HA (0,26) e, as misturas mostraram uma diminuição desse índice, com o aumento da porcentagem de HA. O coeficiente de consistência (K) do HA encontrado foi de aproximadamente 150 vezes maior do que para a GG e, com relação às misturas, esse valor aumentou com o aumento da quantidade de HA, mas ficaram abaixo do HA isolado. Isso foi relacionado a estrutura mais ramificada da GG e que atribui maior solubilidade, além da diferença nos valores de M_w .

As curvas de viscosidade do sistema HA:GG também foram analisadas pelo modelo de Moore e estão apresentadas na Tabela 9.

TABELA 9. VALORES DE REGRESSÃO DAS CURVAS DE VISCOSIDADE, PELOS MODELOS DE OSTWALD DE WAELE E O DE MOORE, PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG) ISOLADAS E PARA AS SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.

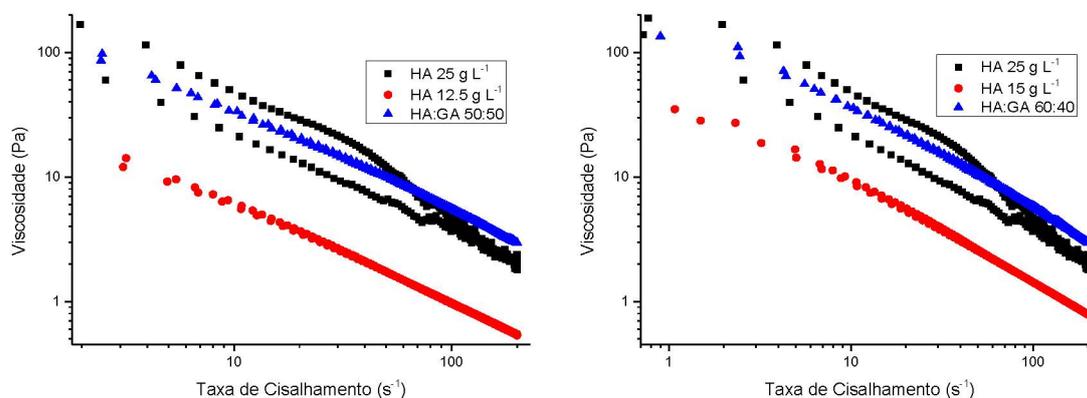
Amostras (%, m/m)	Ostwald de Waele			Moore			
	K (Pa.s ⁿ)	n	R ²	η_{∞} (Pa.s)	η_0 (Pa.s)	τ (s)	R ²
HA	176,17	0,26	0,869	0,22	158,65	0,34	0,989
100	$\pm 0,05$	$\pm 0,03$		$\pm 0,03$	$\pm 0,05$	$\pm 0,03$	
GG	1,13	0,85	0,929	0,39	0,89	0,017	0,979
100	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$		$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	
HA:GG	42,4	0,41	0,989	0,90	38,22	0,23	0,999
50:50	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$		$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	
HA:GG	66,5	0,37	0,969	0,91	66,45	0,29	0,999
60:40	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$		$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	
HA:GG	81,12	0,36	0,959	1,03	78,34	0,24	0,999
70:30	$\pm 0,02$	$\pm 0,04$		$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	
HA:GG	150,23	0,23	0,989	1,31	130,73	0,38	0,999
80:20	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$		$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$	

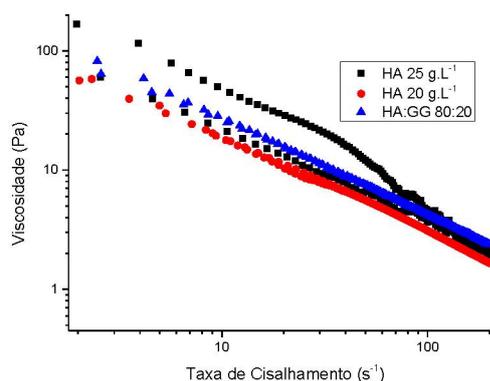
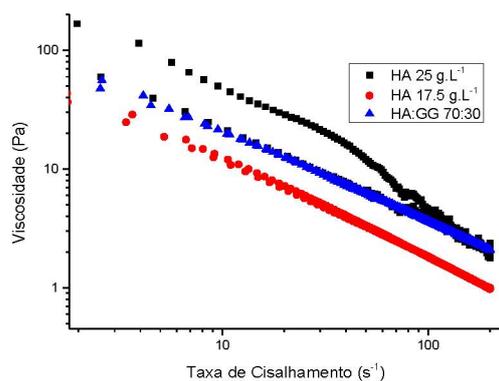
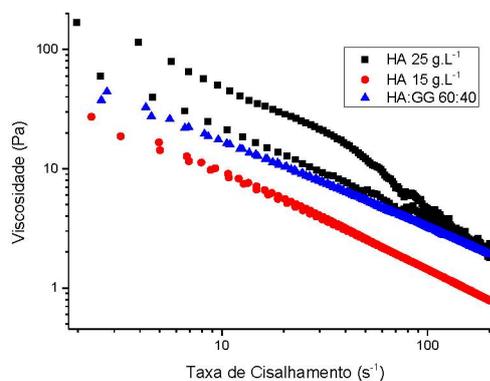
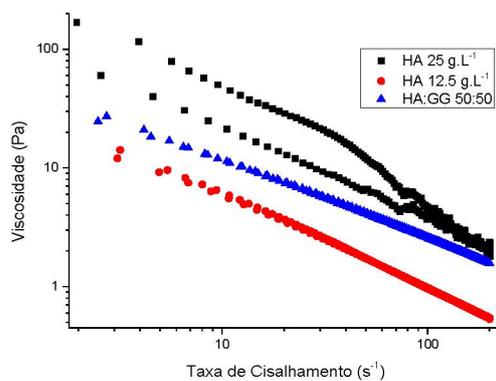
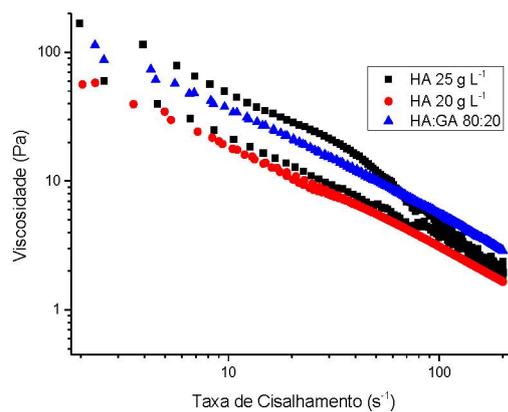
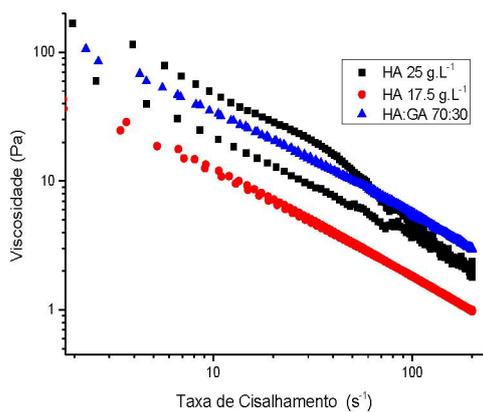
Os valores de η_0 e η_{∞} seguiram a mesma tendência para as misturas onde, com o aumento da concentração de HA, aumentaram. Com relação aos polissacarídeos isolados, a η_0 foi muito maior para o HA em relação a GG que por suas ramificações é bem mais flexível, enquanto as misturas mostraram

valores mais próximos ao HA. Já a η_{∞} foi maior para a GG em relação ao HA e as misturas apresentaram valores crescentes, e até aproximadamente 3 vezes maior que o dos polissacarídeos isolados. Os valores de τ para as misturas seguiram a tendência de aumentar com o aumento da concentração de HA, apresentando, portanto, maior tempo de relaxação devido ao aumento dos emaranhados.

A fim de comprovar que o aumento da viscosidade foi uma resposta ao comportamento sinérgico e não apenas efeito do solvente, foram realizados experimentos comparativos com a amostra de HA diluída, em relação ao volume total desse nas misturas. Por exemplo, se inicialmente o HA foi preparado a 25 g L^{-1} , assim, na mistura 50:50 (m/m), teria a concentração de $12,5 \text{ g L}^{-1}$. Para as misturas 60:40, 70:30 e 80:20 as concentrações do HA foram de 15 g L^{-1} , $17,5 \text{ g L}^{-1}$ e 20 g L^{-1} respectivamente, como pode ser observado na Figura 25 para as misturas HA:GA e HA:GG. O comportamento de todas as amostras comprovou que houve efeito sinérgico das misturas dos polissacarídeos, visto que as concentrações das diluições do polissacarídeo isolado apresentaram menor viscosidade comparadas às viscosidades das misturas.

FIGURA 25. CURVAS DE VISCOSIDADE DAS MISTURAS A 25 g L^{-1} DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) E ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) COMPARATIVAS AO ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) ISOLADO NA MESMA CONCENTRAÇÃO, E CONCOMITANTE AO HA NA CONCENTRAÇÃO DILUÍDA NA MISTURA.





Assim, quando comparados, os sistemas das misturas HA:GG e HA:GA, mostraram que houve um aumento da viscosidade que pode indicar sinergia

entre os polissacarídeos. Porém, para o sistema HA:GG, apesar de ter aumentado a viscosidade, não ocorreu uma interação tão significativa com o aumento da viscosidade e maior do que para os dois polímeros isolados, como a que ocorreu para a mistura HA:GA.

Como observado visualmente e pelas curvas de viscosidade, as galactomananas apresentaram comportamentos diferentes entre si e as regressões obtidas pelos modelos de Ostwald de Waele e de Moore confirmaram esse fato. As misturas de HA:GA mostraram características de interações intercadeias mais fortes e maior emaranhamento entre as cadeias quando comparadas com as misturas de HA:GG. Portanto, esses resultados sugeriram que existe uma dependência das quantidades de unidades de galactose e as regiões de ramificação nas cadeias principais para a interação com o HA, ou seja, existiu uma dependência da organização estrutural e do volume hidrodinâmico que a molécula ocupou, não necessariamente relacionado a M_w , visto que a M_w da GG determinada foi maior que a da GA. (DEA e MORRISON, 1975; JO et al., 2018).

Outro comportamento interessante dos sistemas e que pode ser mencionado é o pseudoplástico. Visto para as condições avaliadas no uso de soluções injetáveis, como no caso de preenchimentos, por exemplo. Os fluidos pseudoplásticos se caracterizam por apresentarem alta viscosidade em baixas ou nenhuma taxa de cisalhamento, e com o aumento do cisalhamento a viscosidade diminui. Assim, as altas viscosidades podem ajudar o polímero em solução a permanecer na posição esperada quando injetado; e a baixa viscosidade é desejável durante o procedimento de injeção a alto cisalhamento, diminuindo com isso a dor do paciente (DODERO et al., 2019).

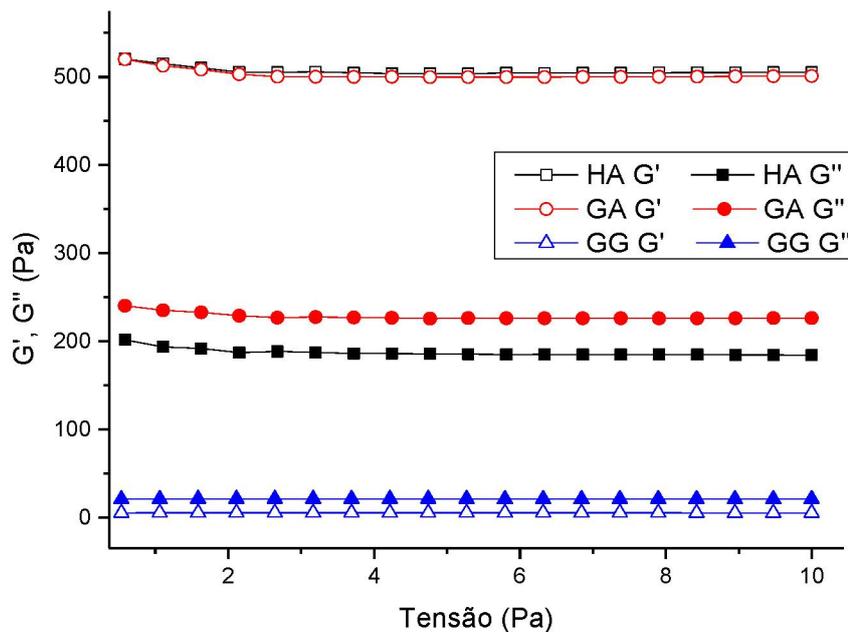
4.4.3 Regime oscilatório

4.3.3.1 Sistema HA:GA, polissacarídeos isolados e as misturas

Como mencionado nos materiais e métodos, os testes foram realizados, primeiramente, para determinar a região viscoelástica linear de cada um dos sistemas, sendo assim, todos os resultados apresentados foram realizados

dentro dessa faixa, região de platô onde não há variação da frequência, a Figura 26 mostra as curvas de tensão para HA, GA e GG isolados.

FIGURA 26. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, 25°C .



A Figura 27 mostra as curvas de frequência para os polissacarídeos isolados e as misturas HA:GA. Para todas as amostras analisadas, os módulos G' (elástico ou de armazenamento) e o G'' (viscoso ou de perda) apresentaram comportamentos muito próximos. Os valores dos módulos G' e G'' para os polissacarídeos isolados próximos ao das misturas indicaram que, assim como apresentado nas curvas de viscosidade, houve uma boa sinergia entre o HA e a GA na mistura, especialmente com 50% (m/m) de cada amostra isolada.

Apesar da GA isolada ter apresentada uma viscosidade significativamente menor que a do HA isolado e as misturas, no que diz respeito ao comportamento viscoelástico não se observou muitas discrepâncias nos módulos G' e G'' dentro da faixa de frequência avaliada, ao se comparar a GA, o HA e as suas misturas nas diferentes proporções. Particularmente, para a GA, os módulos G' e G'' tiveram valores muito próximos em baixas frequências (próximos a 1 rad s^{-1}), e

com o aumento dessa frequência vão se afastando, mas em toda a faixa o G' foi sempre maior.

Para o HA e as misturas HA:GA, observou-se que a baixos valores de frequências o G'' foi maior e, com o aumento da varredura de frequência, os módulos se transpassaram ($G'=G''$); e, posteriormente, o G' apresentou maiores valores em maiores valores de frequência, comportamento esse conhecido como *cross over*. Os valores dessa transposição de G' e G'' e as respectivas frequências de onde ocorreram, estão dispostos na Tabela 10. Para as misturas os valores dos módulos $G'=G''$ tiveram relação com a porcentagem de HA, onde se observou que quanto maior, também maior foi a tendência em se aproximar do valor obtido para o HA isolado. Para a GA isolada não ocorreu esse comportamento e pode-se afirmar que esses são sistemas com características de gel fraco, visto que em altas frequências o G' foi predominante em relação ao G'' (RAZAVI et al., 2016). Para esse comportamento do HA e das misturas ao longo da varredura de frequência, pode-se afirmar que em baixas frequências, onde a escala de tempo de deformação foi mais longa, as cadeias poliméricas se desentrelaçaram, originando comportamento característico de um líquido viscoso (G' maior). Já em frequências intermediárias, as cadeias não conseguiram ficar totalmente livres nos emaranhados, com a escala de tempo menor, e se comportaram como uma rede elástica ($G'=G''$). E, em altos valores de frequência que correspondem a pequenas escalas de tempo, as cadeias do polímero tiveram menor mobilidade (G'' maior). Esse comportamento pode estar relacionado com a massa molar visto que, com o aumento desta, as cadeias do polímero demoram mais para se desemaranhar (DODERO et al., 2019).

Os valores dos módulos G' e G'' pela varredura de frequência, foram avaliados pela lei da potência (equações 13 e 14) para cada uma das amostras, com o intuito de avaliar as respectivas dependências e estão apresentadas na Tabela 10.

Os parâmetros de n' e n'' se relacionam a lei da potência para os módulos elástico e viscoso, respectivamente. Quanto maior esse valor, maior seria a dependência do fluido para esse módulo, quando avaliado o G' em relação à frequência, para um gel covalente $n' = 0$, enquanto para géis físicos, o n' deve ser maior que 0 e menor que 1. E, quando o n' for igual ou próximo a 1, o fluido se comporta como um gel de caráter viscoso (HESARINEJAD et al., 2014).

FIGURA 27. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA AS AMOSTRAS A 25 g L⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS MISTURAS DE MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, 25°C.

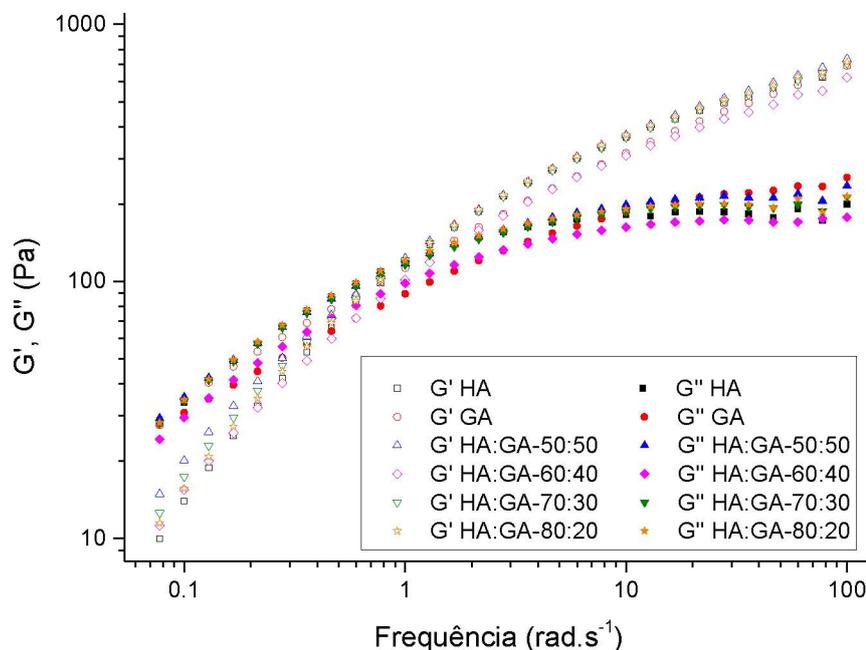


TABELA 10. VALORES DE CROSS OVER ($G'=G''$) E AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS (rad s⁻¹), E OS PARÂMETROS DA LEI DA POTÊNCIA APLICADA À G' E G'' PARA AS AMOSTRAS A 25 g L⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.

Amostras (%, m/m)	$G'=G''$ (Pa)	ω (rad.s ⁻¹)	G'			G''		
			k' (Pa.s ⁿ)	n'	R^2	k'' (Pa.s ⁿ)	n''	R^2
HA 100	118,5	1	138,9 $\pm 0,06$	0,36 $\pm 0,03$	0,979	108,2 $\pm 0,05$	0,15 $\pm 0,04$	0,759
GA 100	-	-	124,3 $\pm 0,05$	0,38 $\pm 0,02$	0,999	93,4 $\pm 0,04$	0,24 $\pm 0,03$	0,959
HA:GA 50:50	105,2	0,78	142,2 $\pm 0,03$	0,37 $\pm 0,03$	0,989	111,6 $\pm 0,06$	0,18 $\pm 0,04$	0,879
HA:GA 60:40	93	0,88	117,8 $\pm 0,04$	0,37 $\pm 0,03$	0,989	92,8 $\pm 0,03$	0,18 $\pm 0,02$	0,859
HA:GA 70:30	110	0,87	140,4 $\pm 0,03$	0,36 \pm 0,02	0,989	108,7 $\pm 0,04$	0,17 $\pm 0,03$	0,849
HA:GA 80:20	120	1	144,4 $\pm 0,03$	0,36 $\pm 0,02$	0,979	111,5 $\pm 0,04$	0,17 $\pm 0,02$	0,839

Nas misturas de HA:GA, para todas as amostras existiu uma dependência muito próxima do G' , ou seja, os valores de n' não variaram muito (entre 0,36 e 0,38), já com relação ao G'' , a GA isolada apresentou maior dependência quando comparada aos demais sistemas. Entretanto o HA apresentou menor dependência do módulo viscoso, e para as misturas ficaram entre esses dois valores, porém, mais próximas ao do HA. Sendo assim, todas as amostras do sistema HA:GA, tiveram um comportamento de gel físico. O k' e k'' são duas constantes relacionadas ao G' e G'' , respectivamente, onde pode-se observar que a GA teve a menor dependência, enquanto que para as misturas o valor aumentou com o aumento da porcentagem de HA.

4.4.3.1 Sistema HA:GG, polissacarídeos isolados e as misturas

Quando se avaliou os sistemas de HA:GG, notou-se que os módulos G' e G'' para a GG foram consideravelmente menores, quando comparados ao HA isolado e às misturas HA:GG (Figura 28). Em toda faixa de frequência avaliada, a GG teve G'' maior, indicando que não tinha característica de gel e sim de uma dispersão viscoelástica. Porém, nas misturas houve uma tendência a formação de gel fraco, comportamento esse dependente do HA nessa mistura. Assim como observado para as misturas de HA:GA, as de HA:GG também apresentaram *cross over* dos módulos, os quais estão apresentados na Tabela 11. Ficou evidente que existe um aumento do valor dos módulos linearmente com o aumento da porcentagem de HA. E ocorreu o inverso na frequência, ou seja, com o aumento da porcentagem de HA, o entrecruzamento dos módulos, ocorreu em menores valores de frequência.

As curvas de G' e G'' versus a frequência, para o sistema HA:GG, foram submetidas a avaliação pela equação da lei da potência (Tabela 11). Observou-se que existiu uma grande diferença de comportamento da GG em relação às demais amostras, a qual teve o maior valor de n' (0,98), mostrando a grande dependência para esse índice, porém, com grande dependência do componente viscoso. Enquanto o HA apresentou os menores valores e as misturas tenderam para o comportamento do HA, indicando, portanto, um caráter de gel físico.

FIGURA 28. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA AS AMOSTRAS 25 g L⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E AS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, 25°C.

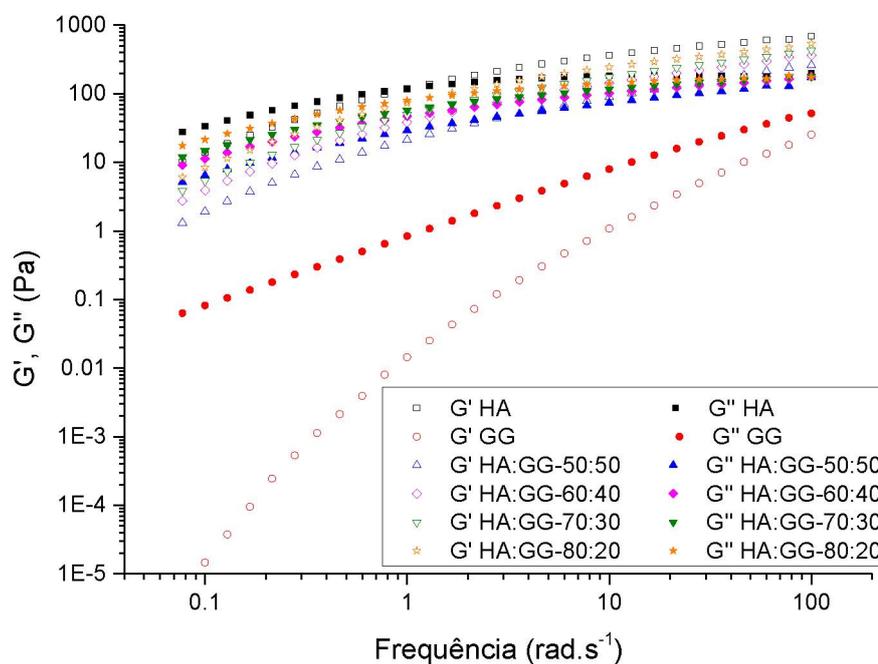


TABELA 11. VALORES DE CROSS OVER ($G'=G''$) E AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS (rad s⁻¹), E PARÂMETROS DA LEI DA POTÊNCIA APLICADA À G' E G'' PARA AS AMOSTRAS A 25 g L⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO ± DESVIO PADRÃO.

Amostras (%, m/m)	$G'=G''$ (Pa)	ω (rad s ⁻¹)	G'			G''		
			k' (Pa s ⁿ)	n'	R^2	k'' (Pa s ⁿ)	n''	R^2
HA	118,5	1	138,9	0,36	0,97	108,2	0,15	0,75
100			± 0,06	± 0,03		± 0,05	± 0,04	
GG	-	-	0,1	0,98	0,99	1,3	0,8	0,99
100			± 0,01	± 0,05		± 0,03	± 0,02	
HA:GG	50,8	3	26,4	0,51	0,99	29,8	0,37	0,98
50:50			± 0,04	± 0,04		± 0,02	± 0,03	
HA:GG	64,1	2,2	46,7	0,46	0,99	7,4	0,3	0,97
60:40			± 0,05	± 0,02		± 0,03	± 0,04	
HA:GG	70,1	1,7	59,1	0,44	0,99	57,3	0,27	0,97
70:30			± 0,04	± 0,03		± 0,03	± 0,03	
HA:GG	87,4	1,3	86,9	0,41	0,99	76,5	0,21	0,97
80:20			± 0,03	± 0,03		± 0,04	± 0,04	

Estudos da literatura sugeriram que, o resultado de G' , na frequência de 0,7 Hz (ou $4,4 \text{ rad s}^{-1}$) pode ser considerado para avaliar informações sobre a fisiologia da pele quando submetida a tensão de um preenchimento dérmico, além de se mostrar uma faixa de avaliação mais reprodutiva. Visto que o G' indica a resistência a deformação enquanto o fluido de preenchimento é injetado, e quanto maior o valor G' melhor seria na resistência às tensões da pele, onde existe maior atividade muscular e maior efeito da gravidade (DODERO, et al., 2019). Mas, os valores variaram com os diferentes tipos de HA encontrados comercialmente, por exemplo, com relação a concentração e as modificações (SUNDARAM et al., 2010). Neste trabalho os dados obtidos serão comentados mais adiante e comparados com os relatos da literatura para produtos comerciais.

4.4.4 Avaliação do comportamento reológico pelo modelo de Cox Merz

Muitos polímeros em solução apresentaram sobreposição das viscosidades obtidas pelos modos não oscilatório e oscilatório, através da lei de Cox-Merz (COX e MERZ, 1958). Onde a viscosidade aparente, obtida pelo modo não oscilatório, foi comparada a viscosidade dinâmica complexa, obtida pelo modo oscilatório. Onde a viscosidade aparente (η_{ap} versus $\dot{\gamma}$) é característica de parâmetros como: orientação, emaranhamento, enquanto a viscosidade dinâmica complexa (η^* versus ω) descreve a flexibilidade molecular na região viscoelástica do polissacarídeo (WU et al., 2018). A lei de Cox Merz é descrita, a seguir, pela equação 15:

Equação 15

$$\eta^*(\omega) = \eta_{ap}(\dot{\gamma})_{\dot{\gamma}=\omega}$$

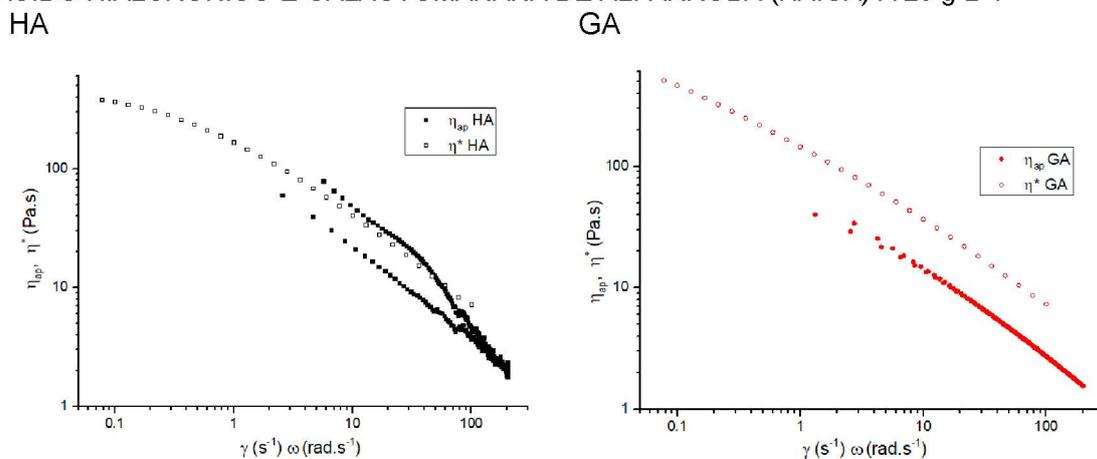
A Figura 29, apresenta os resultados para o HA, a GA ambos isolados e para as suas misturas. Principalmente para as misturas, houve uma boa sobreposição das duas curvas de viscosidade, o que indicou que se enquadraram ao modelo aplicado.

A GA, não se enquadrou bem ao modelo, onde a viscosidade dinâmica complexa foi maior que a aparente, esse comportamento pode ser um indicativo

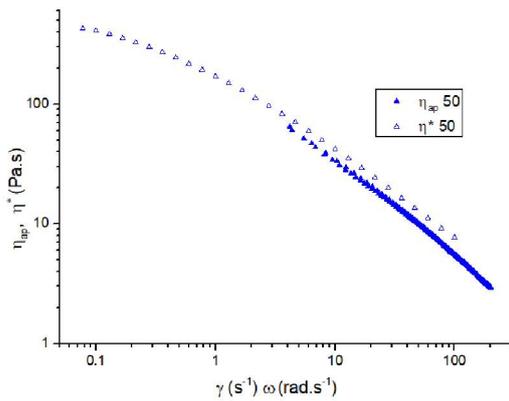
de que as cadeias poliméricas formaram uma rede tênue que permaneceram integras sob baixas oscilações, mas podiam ser rompidas com o cisalhamento contínuo, também indicando a presença de emaranhados ou agregados (PIRES e SANTANA, 2011).

O estudo do sistema HA:GG pela lei de Cox Merz, Figura 30, mostrou que, principalmente, as misturas se enquadraram no modelo, ou seja, as curvas de η_{ap} e η^* ficaram sobrepostas. Como já mencionado anteriormente, foram observadas diferenças entre as duas galactomananas também com relação ao modelo de Cox Merz, onde a GG exibiu melhor adequação do modelo quando comparada com a GA. Já para as misturas, dentro de suas características, existiu uma adequação boa ao modelo. Os pequenos desvios para HA e GG, podem estar relacionados a rígidos entrelaçamentos/associações das cadeias ou a fatores relacionados à relaxação intermolecular (WU et al., 2018).

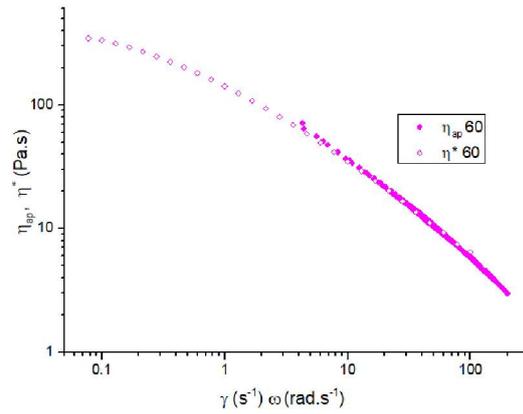
FIGURA 29. VISCOSIDADE APARENTE (η_{ap}) EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO ($\dot{\gamma}$) E VISCOSIDADE DINÂMICA (η^*) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (ω), PELO MODELO DE COX MERZ, PARA AS AMOSTRAS DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DAS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA) A 25 g L⁻¹.



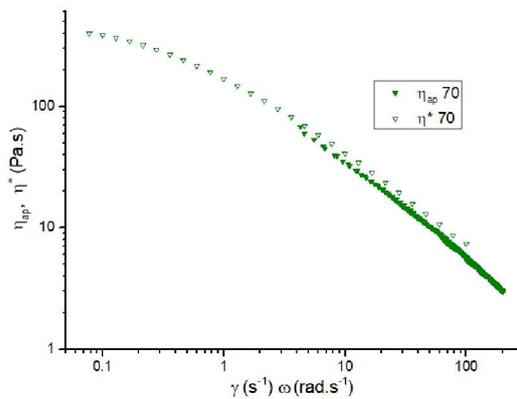
HA:GA-50:50



HA:GA-60:40



HA:GA-70:30



HA:GA-80:20

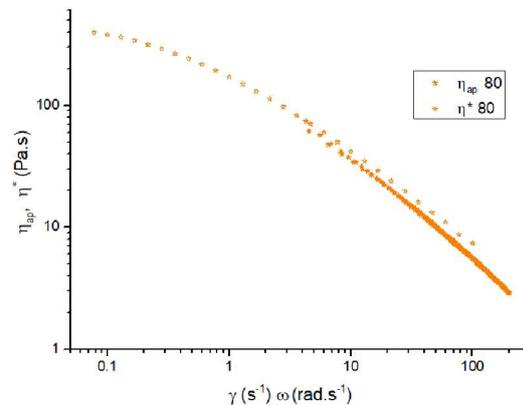
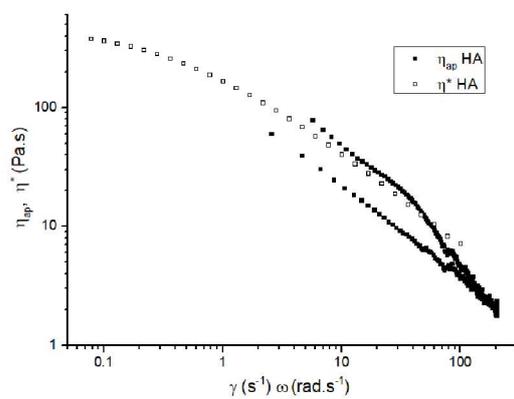
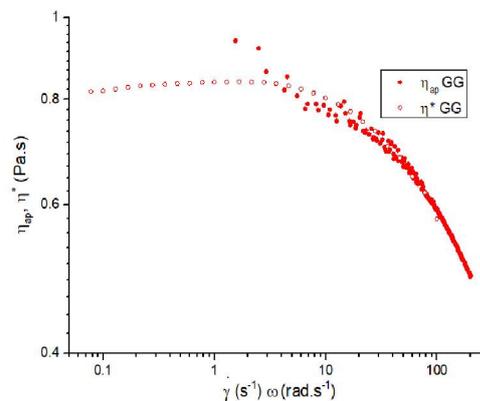


FIGURA 30. VISCOSIDADE APARENTE (η_{ap}) EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISLHAMENTO ($\dot{\gamma}$) E VISCOSIDADE DINÂMICA (η^*) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (ω), PELO MODELO DE COX MERZ, PARA AS AMOSTRAS DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DAS MISTURAS ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) A 25 g L⁻¹.

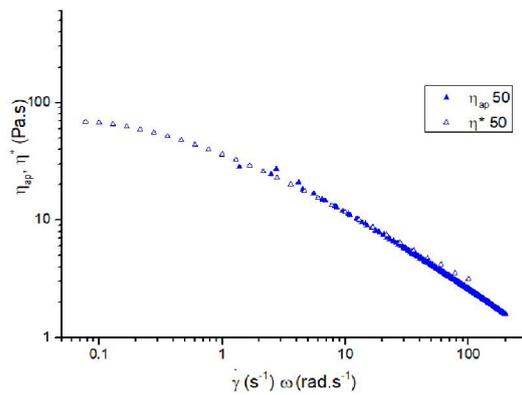
HA



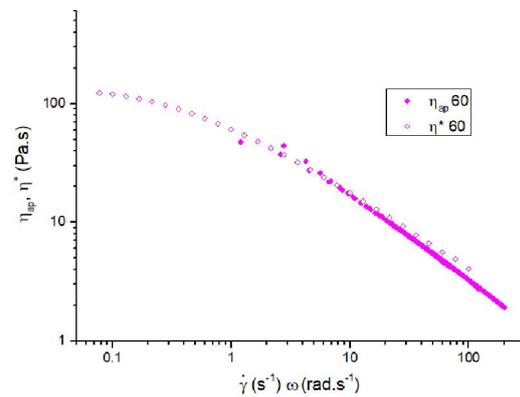
GG



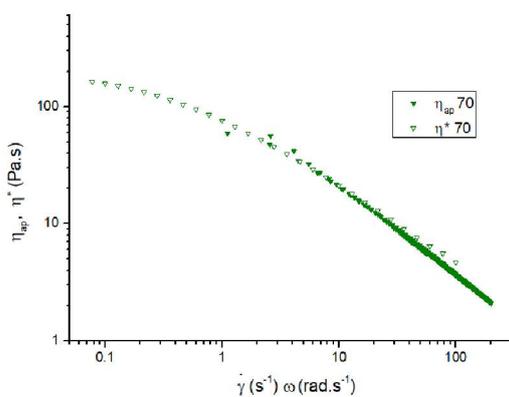
HA:GG-50:50



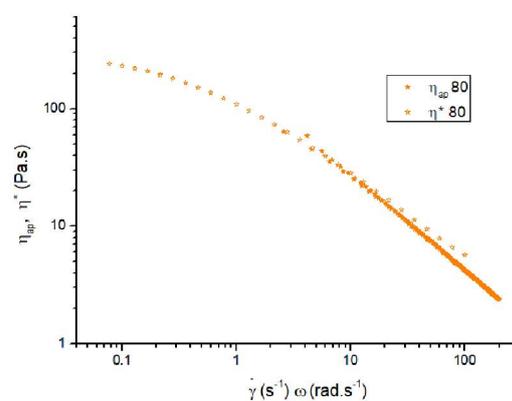
HA:GG-60:40



HA:GG-70:30



HA:GG-80:20



4.4.5 Análise do comportamento reológico pelo modelo da fluência e recuperação

A observação do comportamento elástico e/ou viscoso de um fluido, também pode ser avaliada pelo teste de fluência e recuperação, onde, na fase da fluência é aplicada uma tensão fixa por um determinado tempo e, na fase da recuperação, a tensão é totalmente retirada.

A compliância (J) é dada pela razão entre a tensão e a deformação que o fluido sofre e é relacionada com o tempo. Quanto maior a compliância, mais fácil será deformar o fluido por uma tensão aplicada.

Através das curvas obtidas, portanto, foi possível identificar na parte correspondente a fluência, o valor da resposta instantânea da compliância no momento em que o fluido foi submetido a tensão (J_0); o valor da compliância no máximo de deformação correspondeu ao último tempo que o fluido esteve sob tensão ($J_{máx}$). No momento da recuperação, foi possível observar o valor da

compliância no platô, ou seja, após o momento da retirada da tensão em que o fluido entrou em equilíbrio (J_{∞}) (YILMAZ et al., 2012).

Para os sistemas HA:GA e HA:GG a porcentagem de recuperação do fluido, quando submetidos a uma tensão de 5 Pa por 150 segundos e depois de ter sido retirada, foi avaliada por mais 300 segundos, através da equação 16:

Equação 16

$$\% \text{ Recuperação} = \left[\frac{(J_{\text{máx}} - J_{\infty})}{J_{\text{máx}}} \right] \times 100$$

Ao se avaliar a característica da GA e das misturas HA:GA com relação ao comportamento nas curvas de fluência e recuperação (Figura 31 e Tabela 12), observou-se um comportamento interessante. Os valores de J_0 foram muito próximos para todas as amostras e as curvas tenderam a se comportar de forma muito parecida, com exceção para a GA que, teve menor valor de deformação ($J_{\text{máx}}$), no momento em que recebeu tensão (fluência). E, na fase da recuperação, teve uma perda maior da compliância, ou seja, se deformou mais, obtendo assim, menor recuperação em comparação às demais amostras. A GA isolada apresentou um comportamento mais elástico. Porém, o comportamento mais viscoso que o apresentado pelo HA isolado ficou mais evidente nas misturas, as quais variaram pouco entre si com comportamento muito próximo ao HA isolado.

FIGURA 31. CURVAS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E DE SUAS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C .

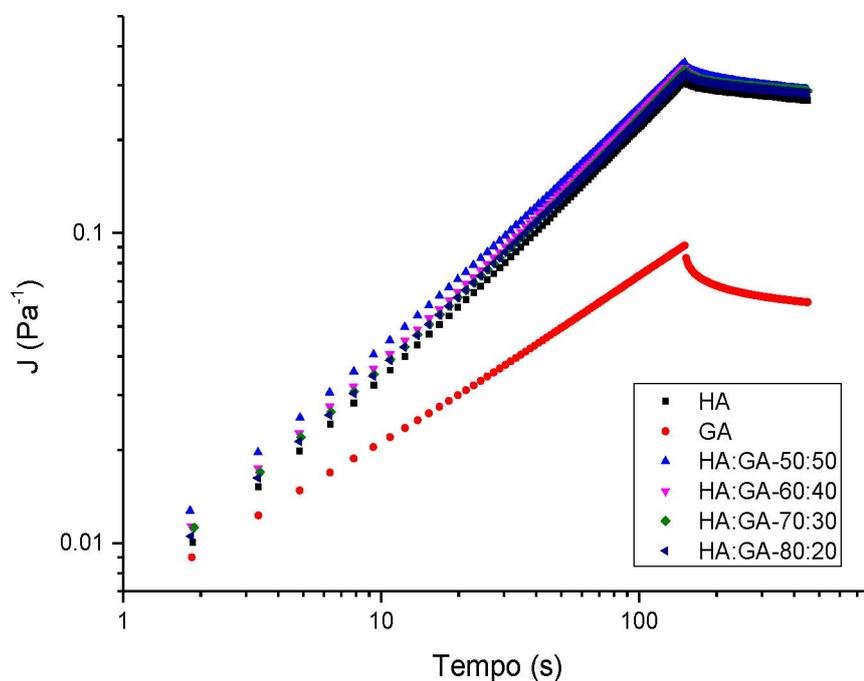


TABELA 12. COMPLIÂNCIA INICIAL (J_0), COMPLIÂNCIA MÁXIMA ($J_{m\acute{a}x}$), COMPLIÂNCIA NO INFINITO (J_∞) E PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO PARA A ANÁLISE DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.

Amostras (%, m/m)	J_0 (Pa^{-1})	$J_{m\acute{a}x}$ (Pa^{-1})	J_∞ (Pa^{-1})	Recuperação %
HA	0,010	0,311	0,268	14
100	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	
GA	0,009	0,091	0,060	34
100	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	$\pm 0,001$	
HA:GA	0,013	0,354	0,290	18
50:50	$\pm 0,001$	$\pm 0,004$	$\pm 0,001$	
HA:GA	0,011	0,342	0,285	17
60:40	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,005$	
HA:GA	0,011	0,337	0,288	14
70:30	$\pm 0,001$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$	
HA:GA	0,011	0,328	0,281	14
80:20	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,001$	

Para o sistema HA:GG, a GG foi a mais facilmente deformada com relação ao HA isolado e as misturas. O HA foi mais difícil de se deformar e, com relação as misturas, a compliância aumentou com a diminuição da porcentagem de HA, como pode ser observado na Figura 32 e Tabela 13.

Para os polissacarídeos isolados foi bastante evidente a diferença entre o HA e a GG. A compliância inicial foi mais de 100 vezes maior para o HA, assim como o J_{∞} indicando que o HA teve maior resistência à deformação quando comparada a da GG. Para as misturas, o comportamento tendeu a se aproximar do HA, quanto maior a porcentagem desse na amostra. Mas, apresentaram maior valor de J_0 e menor valor de porcentagem de recuperação quando comparados a do HA isolado. Nota-se um comportamento mais característico de um fluido viscoso do que elástico visto que, após a retirada da tensão (recuperação), foi pequena a deformação, como pode ser notado pela porcentagem de recuperação obtida, especialmente para a GG.

FIGURA 32. CURVAS DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO PARA AS AMOSTRAS a 25 g L^{-1} DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS E PARA AS MISTURAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, A 25°C .

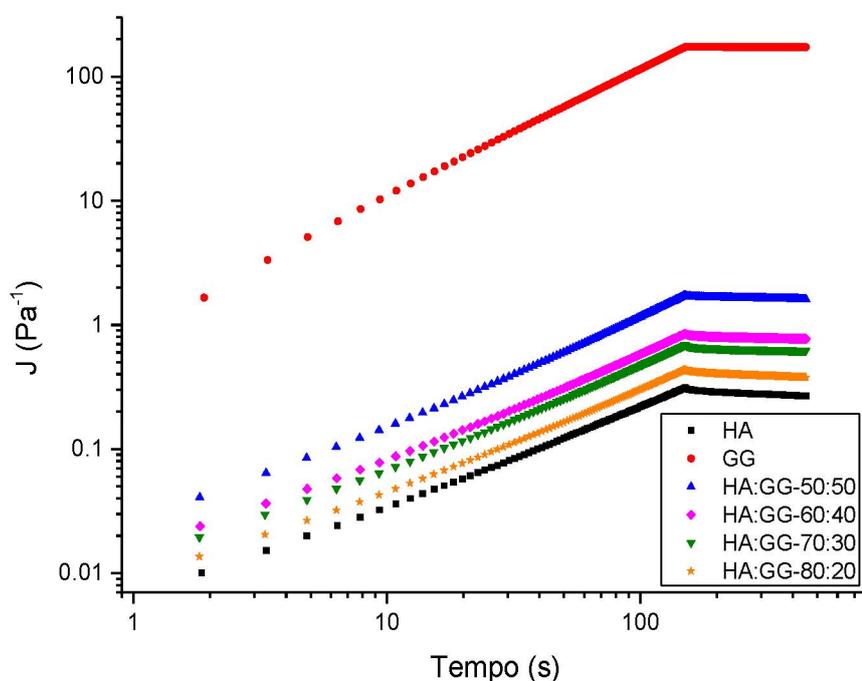


TABELA 13. COMPLIÂNCIA INICIAL (J_0), COMPLIÂNCIA MÁXIMA ($J_{máx}$), COMPLIÂNCIA NO INFINITO (J_∞) E PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO PARA A ANÁLISE DE FLUÊNCIA E RECUPERAÇÃO PARA AS AMOSTRAS A 25 g L⁻¹ DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG) E PARA SUAS MISTURAS. VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.

Amostras (%, m/m)	J_0 (Pa ⁻¹)	$J_{máx}$ (Pa ⁻¹)	J_∞ (Pa ⁻¹)	Recuperação %
HA 100	0,010 $\pm 0,001$	0,311 $\pm 0,001$	0,268 $\pm 0,002$	14
GG 100	1,667 $\pm 0,003$	173,2 $\pm 0,05$	172,7 $\pm 0,03$	0,3
HA:GG 50:50	0,041 $\pm 0,001$	1,729 $\pm 0,001$	1,606 $\pm 0,004$	7
HA:GG 60:40	0,024 $\pm 0,001$	0,850 $\pm 0,003$	0,772 $\pm 0,003$	9
HA:GG 70:30	0,019 $\pm 0,001$	0,689 $\pm 0,001$	0,623 $\pm 0,003$	10
HA:GG 80:20	0,014 $\pm 0,001$	0,438 $\pm 0,002$	0,377 $\pm 0,003$	14

Ao se comparar os resultados dos sistemas de HA:GA e HA:GG nos testes de fluência e recuperação, principalmente no caso das galactomananas, observou-se uma grande diferença, tanto no comportamento viscoso e elástico, como nas porcentagens de recuperação. Confirmando que na estrutura, a quantidade de ramificações por galactose, influenciou no comportamento com a aplicação da tensão com o tempo sugerindo, durante a sinergia, dois tipos de diferentes interações nas GMs. Para os dois sistemas, é nítido que as misturas tenderam ao comportamento do HA isolado e que se comportaram como fluidos viscoelásticos.

4.4.6 Análise do comportamento reológico das amostras comerciais, HAC20 e HAC30, comparativamente com o HA, a GA, a GG e as misturas

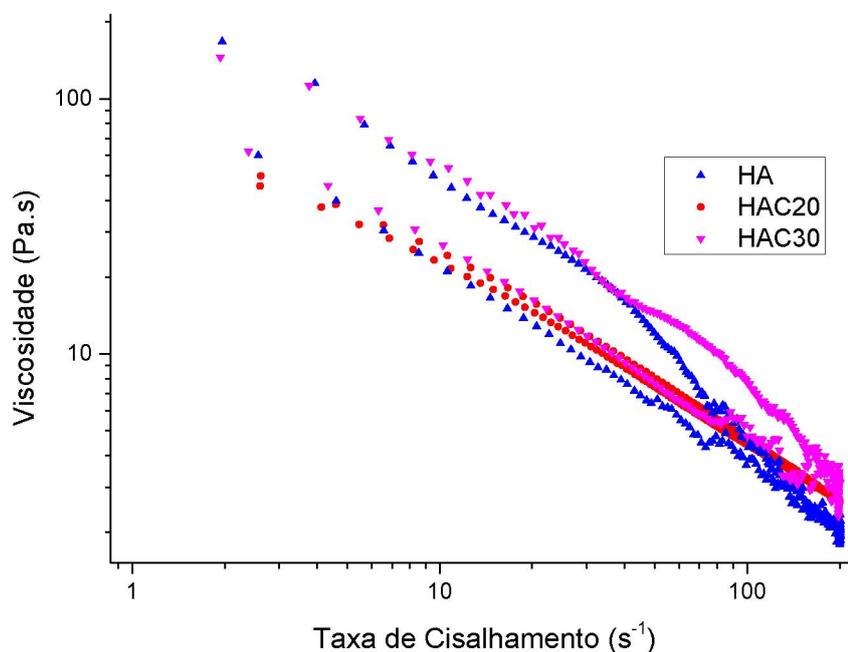
As amostras comerciais de ácido hialurônico injetável (HAC20 e HAC30) procedentes da Derma Hyal[®], são apresentadas em seringa de vidro de 1 mL contendo 20 e 30 g L⁻¹, respectivamente, e foram preparadas em veículo

tamponado estabilizado em pH 7 segundo a empresa, e possuem massa molar de $1,5 \times 10^6$ g mol⁻¹, segundo Salles et al. (2009).

As recomendações de aplicações da empresa fornecedora para o uso do HAC20 são para correções de rugas da testa, linhas suaves ou moderadas e rugas nasolabiais (popularmente conhecidas como bigode chinês). Para o HAC30 as aplicações são para preenchimentos e aumento de volume. Importante ressaltar que essas amostras de ácido hialurônico não têm qualquer tipo de agente reticulante ou espessante.

Quando comparados ao HA da Sigma avaliado nesse trabalho (Figura 33 e Tabela 14), pode-se afirmar que o comportamento viscoso do HAC30 foi muito semelhante, principalmente com relação a histerese. Os modelos matemáticos de Ostwald de Waele e Moore foram aplicados e confirmaram as semelhanças visuais.

FIGURA 33. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 25 g L⁻¹, EM TAMPÃO FOSFATO PH 7,4, E ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L⁻¹ (HAC20) E 30 g L⁻¹ (HAC30), A 25°C.



Em baixas taxas de cisalhamento foi possível observar que as viscosidades do HAC30 e do HA Sigma (25 g L⁻¹) foram próximas, confirmadas pela apresentação visual e pelo valor de η_0 obtido pelo modelo de Moore.

Contudo, com o aumento da taxa de cisalhamento, a viscosidade do HA diminuiu mais em comparação a do HAC30 que, também, pode estar relacionada aos valores obtidos para η_0 e τ , no modelo de Moore. Através do modelo de Ostwald de Waele, os índices K e n indicaram que, de modo geral, as viscosidades do HA e do HAC30 são próximas e que o comportamento pseudoplástico foi semelhante para as duas amostras, resultados esses provenientes dos valores próximos de concentração e da massa molar que são as mesmas para as duas amostras.

A amostra HAC20 teve a menor viscosidade quando comparada a HA e HAC30 e apresentou comportamento pseudoplástico característico, comprovado pelo índice K e o valor de n do modelo de Ostwald de Waele. Ao contrário das maiores concentrações, essa amostra não mostrou histerese, ou seja, não houve diferença de viscosidade após aplicação de uma taxa de cisalhamento. Pelo modelo de Moore, pode-se verificar que a η_0 de HAC20 foi pouco menos da metade do HA e HAC30, enquanto o índice η_0 foi bem maior indicando que, a taxas de cisalhamento tendendo ao infinito, a HAC20 teve a maior resistência ao cisalhamento, em função das interações intra e intermoleculares não desfeitas nesses valores de cisalhamento.

TABELA 14. VALORES DE REGRESSÃO DAS CURVAS DE VISCOSIDADE, PELOS MODELOS DE OSTWALD DE WAELE E O DE MOORE, PARA AS AMOSTRAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 25 g L⁻¹, DE ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L⁻¹ (HAC20) E 30 g L⁻¹ (HAC30). VALOR MÉDIO ± DESVIO PADRÃO.

Amostras	Ostwald de Waele			Moore			
	K (Pa s ⁿ)	n	R ²	η_{∞} (Pa s)	η_0 (Pa s)	τ (s)	R ²
HA	176,17 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,869	0,22 ± 0,03	158,65 ± 0,05	0,34 ± 0,03	0,989
HAC20	98,54 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,989	1,0 ± 0,03	69,1 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,999
HAC30	127,87 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,899	0,19 ± 0,02	156,34 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,899

As análises no modo oscilatório comparativas do HA Sigma às outras amostras comerciais (Derma Hyal[®]) também se apresentaram semelhantes. O perfil dos módulos G' e G'' na varredura de frequência, apresentados na Figura 34, foram semelhantes, onde o G'' foi maior a menores frequência, ocorreu o

cross over e, em maiores frequências, o valor de G' foi maior. Assim, os produtos comerciais HAC20 e HAC30 também apresentaram comportamento característico de gel fraco. A Tabela 15, apresenta os valores dos módulos quando ocorreu o *cross over*. O tratamento dos módulos pela lei da potência revelou que os valores de n' e n'' correlacionaram uma dependência maior de G' , sendo característica de géis físicos e que, quanto maior foi a concentração de ácido hialurônico, maiores também foram os índices avaliados.

FIGURA 34. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 25 g L⁻¹, EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, E ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L⁻¹ (HAC20) E 30 g L⁻¹ (HAC30), A 25°C.

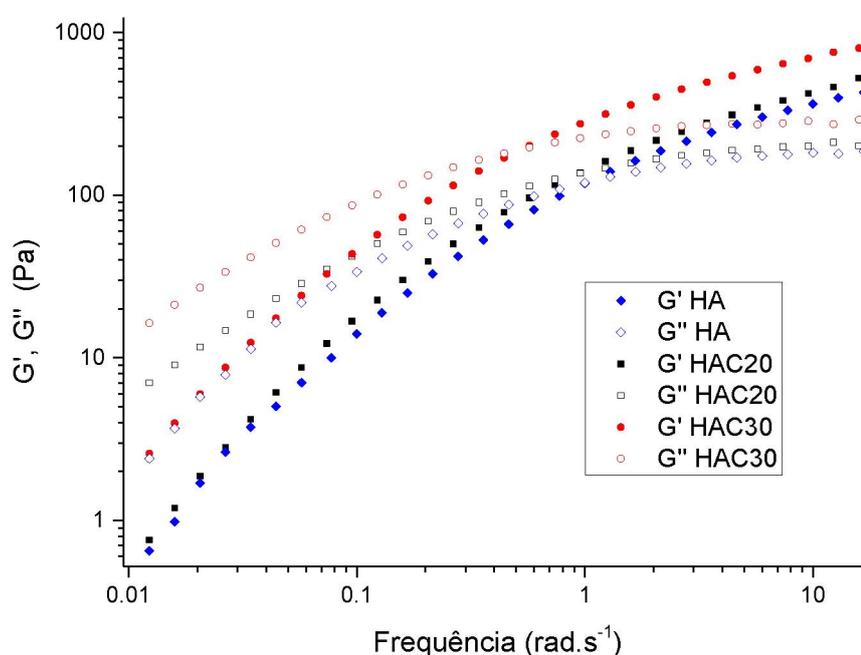


TABELA 15. VALORES DE *CROSS OVER* ($G'=G''$) E AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS (rad s⁻¹), E PARÂMETROS DA LEI DA POTÊNCIA APLICADA A G' E G'' PARA AS AMOSTRAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) A 25 g L⁻¹, DE ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L⁻¹ (HAC20) E 30 g L⁻¹ (HAC30). VALOR MÉDIO \pm DESVIO PADRÃO.

Amostras	$G'=G''$ (Pa)	ω (rad s ⁻¹)	G'			G''		
			k' (Pa s ^{n'})	n'	R^2	k'' (Pa s ^{n''})	n''	R^2
HA	118,5	1	138,9 $\pm 0,06$	0,36 $\pm 0,03$	0,979	108,2 $\pm 0,05$	0,15 $\pm 0,04$	0,759
HAC20	136,11	0,96	135,82 $\pm 0,03$	0,35 \pm 0,03	0,989	113,51 $\pm 0,02$	0,14 $\pm 0,03$	0,959
HAC30	198,44	0,57	256,43 $\pm 0,02$	0,45 $\pm 0,02$	0,979	182,11 $\pm 0,03$	0,23 $\pm 0,02$	0,869

Como apresentado previamente na introdução, a reologia é um estudo importante para se conhecer o comportamento de preenchimentos faciais injetáveis. Comparativamente a Tabela 3 (Revisão de Literatura) e a Tabela 16 apresentam os mesmos valores dos parâmetros para as amostras estudadas e para as suas misturas, bem como para os produtos comerciais.

TABELA 16. VALORES DE η^* E G' A $4,4 \text{ rad s}^{-1}$ PARA AS AMOSTRAS A 25 g L^{-1} DE ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), GALACTOMANANA DE GUAR (GG) E DAS MISTURAS, BEM COMO PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO COMERCIAL DA DERMA HYAL A 20 g L^{-1} (HAC20) E 30 g L^{-1} (HAC30).

Amostra	η^* (Pa s)	G' (Pa)	Amostra	η^* (Pa s)	G' (Pa)
HA	71,13	264,87	GG	0,83	0,27
HAC20	82,22	187,97	100		
HAC30	136,9	274,31	HA:GG	18,05	57,0
GA	61,80	225,03	50:50		
100			HA:GG	28,74	94,27
HA:GA	72,73	267,8	60:40		
50:50			HA:GG	34,77	117,9
HA:GA	60,44	225,57	70:30		
60:40			HA:GG	47,89	169,57
HA:GA	71,1	263,13	80:20		
70:30					
HA:GA	72,64	269,51			
80:20					

Primeiramente, com relação aos ácidos hialurônicos avaliados, observou-se que o HA apresentou a menor η^* quando comparada com a do HAC20 e do HAC30; e os valores de G' ficaram entre as duas respectivas amostras. Isso revelou que o HA comercial usado neste trabalho, apesar de ter uma baixa resistência as forças de cisalhamento da agulha, e que depois de aplicado teria propensão a espalhar pela derme (parâmetros referentes a η^*), apresentaria resistência as mudanças da pele, tendo características para aplicações em regiões do rosto que têm alto nível de atividade muscular, e poderia atuar para suporte, levantamento (*lifting*) e até como modelador de lábios. Para o HAC20 e o HAC30, foi mencionado pela empresa que o HAC20 pode ser usado como

preenchimento para linhas de expressão suaves ou moderadas, contudo, pelo apresentado por Sundaram et al. (2010), com os valores de η^* e G' encontrados em nossa avaliação, esse produto poderia ser usado com função de estimulação da produção de ácido hialurônico e não como preenchimento, visto que tenderia a se espalhar pela região aplicada, pois o efeito seria de menor duração quando comparado ao do HA e do HAC30. Com relação ao HAC30, esse foi apresentado pela empresa como preenchimento para locais com regiões bastante relaxadas e para a diminuição de rugas.

Caso as misturas HA:GA e HA:GG pudessem ser injetadas, os parâmetros de η^* e G' encontrados para o sistema HA:GA, seria sugestivo o uso como preenchimento para regiões com leves forças tensionais da pele, e teria facilidade em fluir pela agulha para a aplicação. Fato esse que levaria a uma menor sensação de dor pelo paciente durante o procedimento da injeção, tendo valores de η^* e G' muito próximos ao do HA isolado e G' acima do HAC20. Já com relação ao sistema HA:GG as misturas poderiam ser para alterações sutis na derme, e apenas a mistura HA:GG 80:20 foi a que teve o G' pouco maior que o HAC20.

Comparativamente a outros produtos como preenchedores faciais comerciais, os estudos reológicos desenvolvidos por Sundaram et al. (2010), Tabela 3 (Revisão de Literatura), mostraram que as amostras aqui estudadas seriam consideradas com baixos valores de viscosidade e de elasticidade. Para esses dados e aplicações, existem as vantagens e desvantagens.

As desvantagens no uso de preenchimentos com baixa viscosidade e elasticidade são a maior quantidade de material a ser aplicada para um resultado mais expressivo, com menor tempo de duração do resultado, ou seja, o corpo absorveria mais rapidamente, e as rugas de maior intensidade não seriam totalmente retiradas.

Com relação as vantagens, pode-se mencionar a maior propensão do preenchimento se espalhar pelo tecido conferindo maior hidratação à pele, com distribuição e homogeneização pelos tecidos, sem fragmentação do gel (MOLLIARD et al., 2018). E oposto ao dos preenchimentos com altas viscosidades e elasticidade que tenderiam a deixar a região aplicada mais firme. Por exemplo, o resultado de lábios aumentados com esses diferentes ácidos hialurônicos seriam, conseqüentemente, diferentes com relação ao volume.

Além disso, no caso de algum tipo de rejeição, o uso de produtos com baixas viscosidades pode ser benéfico pois, esses podem ser totalmente revertidos, com o uso da hialuronidase, que é a enzima que atua na despolimerização do ácido hialurônico diminuindo assim seu efeito no tecido da derme.

4.5 Estudos das amostras *in vitro*

4.5.1 Pelo método do MTT

Com relação a análise de citotoxicidade pelo método do MTT, essa foi mensurada pela atividade metabólica das células, e, quanto maior o valor da leitura da absorbância, maior é a atividade mitocondrial das células e/ou maior o número de células no poço devido a maior quantidade de formazan convertido (coloração arroxeadada) e, conseqüentemente, menor é a citotoxicidade. Os dados obtidos estão apresentados em grupos de 24, 48 e 72 horas, e as diferenças significativas entre os tratamentos foram mensuradas com $p < 0,05$ pela análise de variância One-way ANOVA, onde são indicados os valores de $F(\text{crítico}) = F$ calculado, seguido dos valores de p , para todos os grupos. As amostras que apresentaram diferenças significativas foram tratadas pelo pós teste de Tukey. Os resultados para os experimentos de MTT estão apresentados em porcentagem de citotoxicidade em relação ao controle.

4.5.1.1 Experimentos com concentrações de 1 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Como mencionado em materiais e métodos, foram estudadas, inicialmente, concentrações entre 1 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, importantes para o conhecimento da citotoxicidade das amostras pelo método do MTT. Para esse teste piloto, somente os polissacarídeos isolados e as misturas foram avaliados. As figuras com os dados estão apresentadas no Apêndice (Figuras S1 a S5). Para todas as amostras avaliadas, observou-se um aumento na absorbância com o tempo de análise, indicando aumento de atividade celular com o tempo, porém esse aumento é mais expressivo para os controles, indicando citotoxicidade dos tratamentos avaliados, como pode ser observado pelas porcentagens de citotoxicidade apresentadas.

De modo geral, para essas primeiras análises, pode-se afirmar que o HA isolado, nas primeiras 24h as concentrações apresentaram melhor resposta em termos de atividade mitocondrial quando comparado aos demais tempos de avaliação. Porém, em 48 e 72h, todas as concentrações são citotóxicas com porcentagens máximas de citotoxicidade de 10% em 24h, 20% em 48h e 40% em 72h, onde há variações significativas entre as amostras.

A GA e a GG tiveram comportamento citotóxico para as células em todas as concentrações e tempos avaliados e, em algumas concentrações, alcançaram mais de 50% de toxicidade. Para GA todas as concentrações e tempos de avaliação diferem entre si. Para a GG foram encontradas diferenças entre todas as variáveis nos tempos de 48 e 72h.

Com relação as misturas, a adição de HA as GMs melhoraram o comportamento das amostras quando comparadas as GMs isoladas, porém não o suficiente para que não houvesse citotoxicidade e os valores obtidos pelas análises são muito próximos entre as duas misturas.

A partir desses resultados, foi possível escolher uma nova faixa de concentração para avaliação das amostras, como descrita a seguir.

4.5.1.2 Experimentos com concentrações de 10 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Os resultados dos experimentos com as concentrações entre 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estão apresentados entre as Figuras 35 à 42, e as médias de porcentagem de citotoxicidade em relação ao controle \pm erro padrão estão na Tabela S1 do Apêndice.

Pelo ensaio de MTT para essas concentrações e tempos de avaliação, o HA (Figura 35) mostrou que não houve diferença significativa entre as concentrações e tempos de análise pelo teste ANOVA [$F(1,783)=1,739$, $p=0,043$] e a porcentagem máxima de citotoxicidade foi em torno de 25% em 72h de análise. Para o HAC (Figura 36) foram encontradas diferenças significativas [$F(1,751)=4,574$, $p=5,6 \times 10^{-7}$], entre a concentração a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h com a concentração a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h de análise, bem como a concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h, e com a de 20, 30 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h. A maior toxicidade observada foi cerca de 15%.

FIGURA 35. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

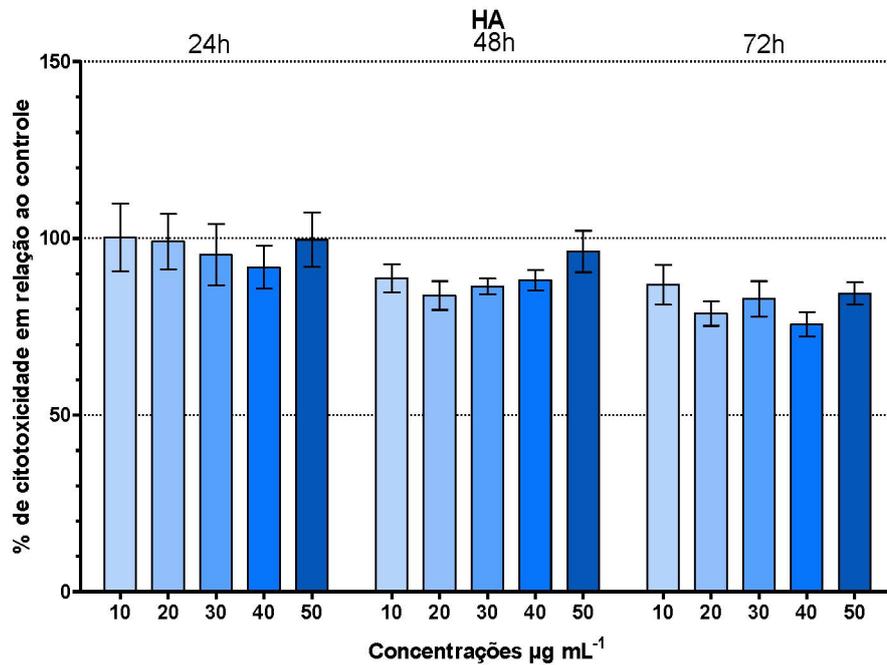
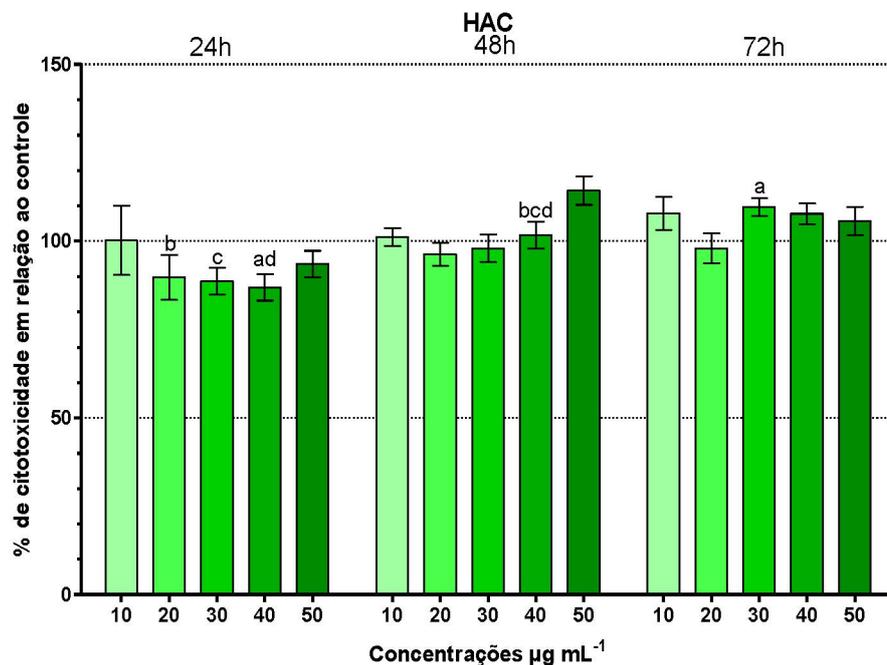


FIGURA 36. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO DERMA HYAL (HAC), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



Para as GMs, apresentadas nas Figuras 37 e 38, pode-se afirmar que tiveram maior porcentagem de citotoxicidade quando comparadas ao HA e HAC. Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações e tempos

de estudo para a GA [F (1,747)=1,147, p=0,319]. No entanto, a GG indicou diferenças significativas pelo teste ANOVA [F (1,747)=2,379, p=0,005], no tempo de 24h, entre 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h; também 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h entre 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nos tempos de 48h e 72h. A concentração a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h foi diferente das concentrações a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h, além de 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h; e a concentração a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h foi diferente significativamente da concentração a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h. A concentração 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h foi diferente da concentrações a 30 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h. Também pode ser observado que a GG teve melhor comportamento quanto comparada a GA, visto que a redução de atividade mitocondrial máxima encontrada para a GG foi em torno de 25%, e para a GA foi de 35%, ambas em 72h de análise.

FIGURA 37. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

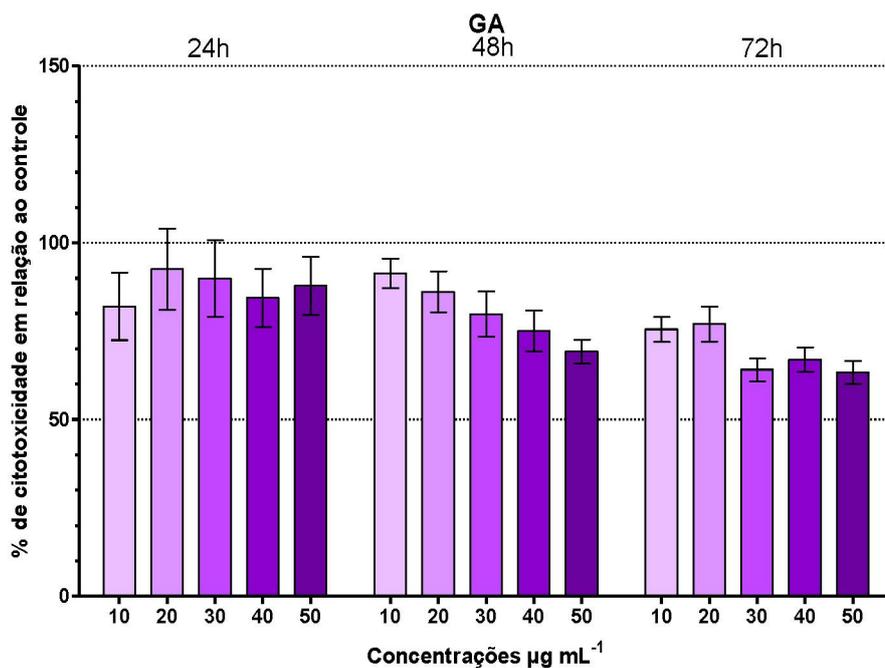
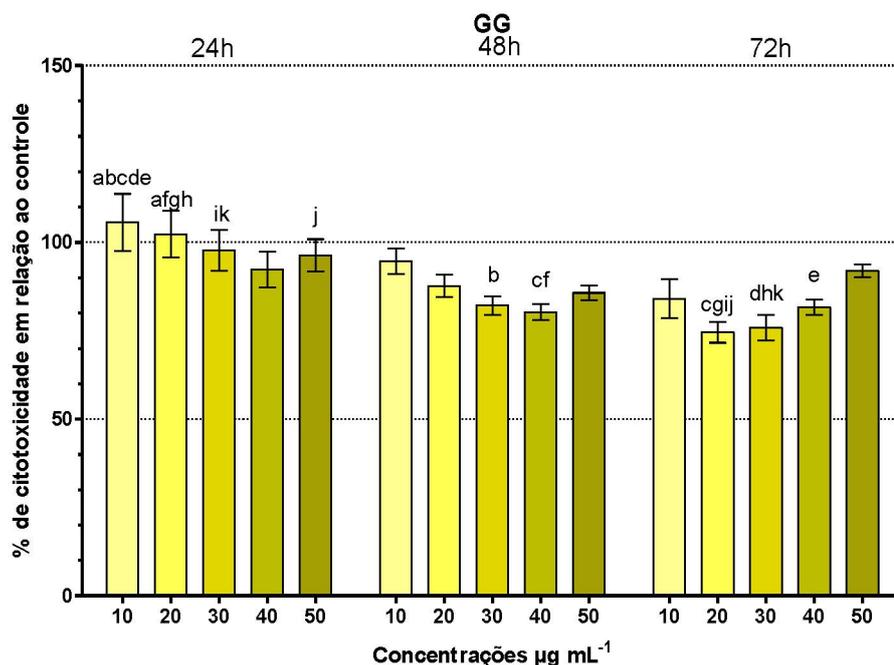


FIGURA 38. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE GUAR (GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



As misturas de HA e GMs, apresentaram comportamentos diferentes. A mistura HA:GA (Figura 39) apresentou um aumento na atividade mitocondrial quando comparada a GA isolada. Porém, para a HA:GG (Figura 40) em comparação a GG isolada, houve uma diminuição das porcentagens, principalmente em 24h. Para as concentrações e tempos estudados, a HA:GA mostrou diferença significativa [F (1,739)=4,328, $p=1 \times 10^{-6}$], no tempo de 24h a concentração de 10 µg mL⁻¹; teve diferença significativa das concentrações de 30 e 40 µg mL⁻¹ em 48h e, também, em 72h para as concentrações de 30, 40 e 50 µg mL⁻¹. Em 48h de análise, a concentração de 10 µg mL⁻¹ teve resposta diferente das concentrações a 30, 40 e 10 µg mL⁻¹ em 72h. Em 72h a concentração de 50 µg mL⁻¹ apresentou resposta diferente das concentrações a 20, 30 e 40 µg mL⁻¹ em 24h. Para a mistura HA:GG houve porcentagens de citotoxicidade diferentes significativamente para a concentração a 10 µg mL⁻¹ em 48h comparada a de 30 e 40 µg mL⁻¹ em 24h e de 20, 30, 40 e 50 µg mL⁻¹ em 72h [F (1,739)=2,794, $p=8 \times 10^{-4}$].

FIGURA 39. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

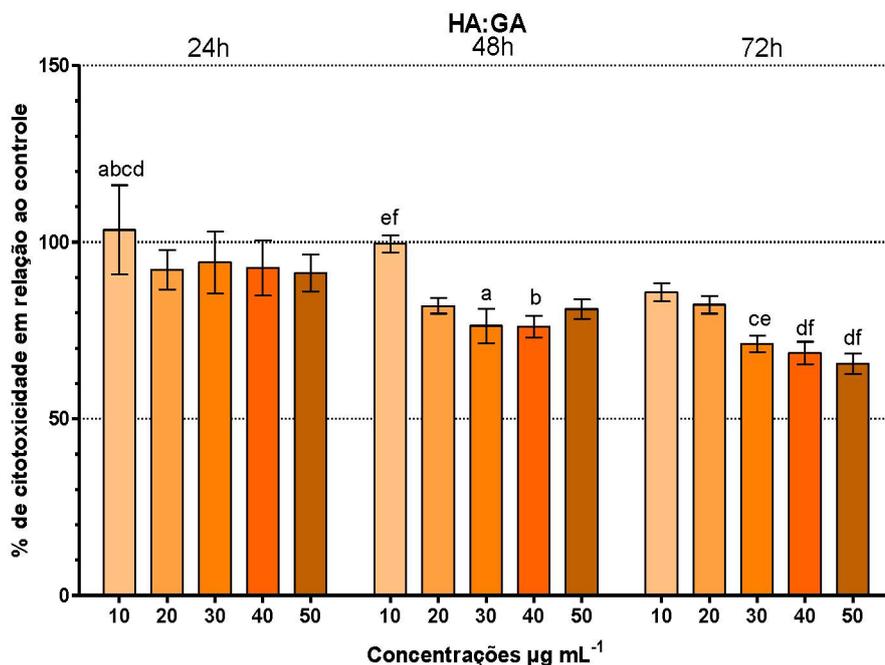
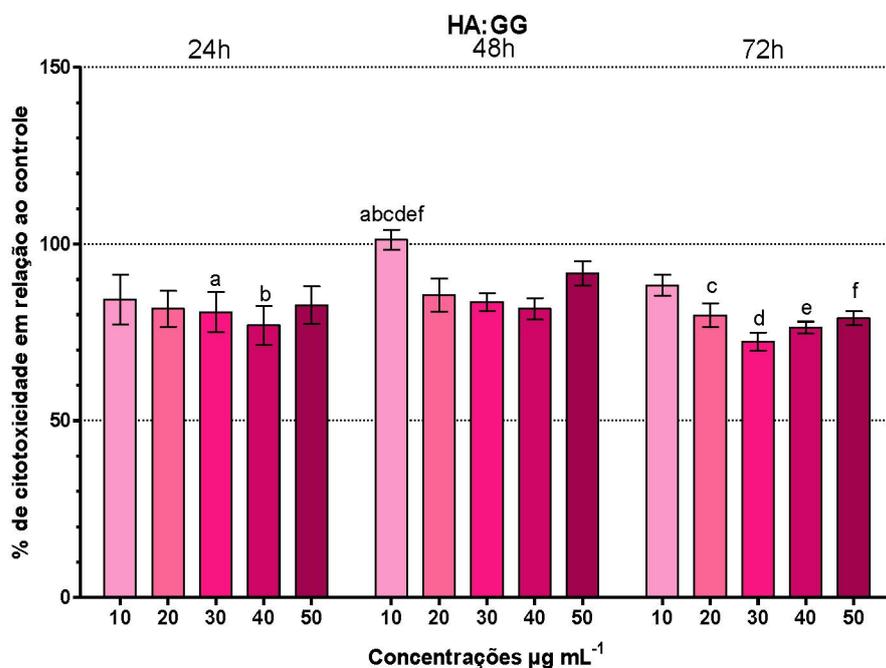


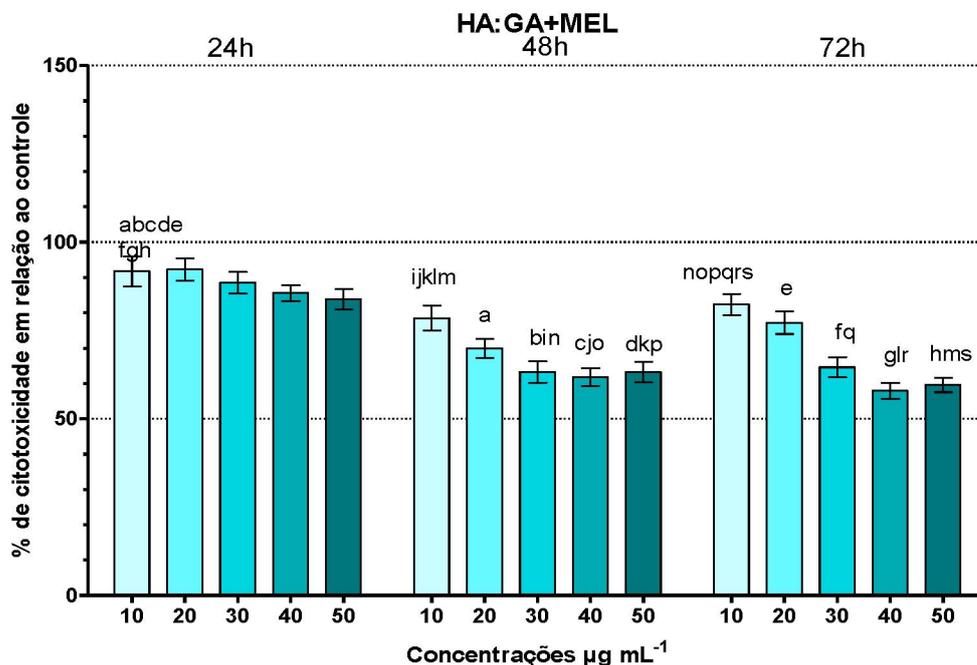
FIGURA 40. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



Para as misturas com MEL, dispostas nas Figuras 41 e 42, foram observadas maiores diferenças significativas dos valores de toxicidade celular

entre as concentrações. Para HA:GA+MEL [F (1,739)=17,518, $p=3 \times 10^{-28}$], as concentrações comparadas no tempo de 24h não diferiram entre si, apenas quando comparadas aos tempos de 48h e 72h. Para a concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as respostas foram diferentes em 48h e 72h. Para as concentrações de 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; a concentração 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h repetiu o perfil da de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h. A concentração de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h foi diferente das concentrações a 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h e 72h. As concentrações a 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h foram diferentes significativamente das concentrações a 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48 e 72h. No tempo de 48h também foram encontradas diferenças significativas entre as respostas para a concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h, além das concentrações a 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h. A concentração a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h teve resposta diferente das concentrações a 30 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h. E a resposta a concentração 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi diferente das concentrações 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h. Com relação ao tempo de 72h diferenças foram encontradas para a concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; com as concentrações a 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h e 72h; e a concentração a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi diferente da concentração 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h. Além das concentrações a 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h; a concentração 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi diferente das concentrações a 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h.

FIGURA 41. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GA+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



A HA:GG+MEL apresentou diferença significativa [F (1,739)=3,391, $p=6 \times 10^{-5}$] a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos tempos de 24h e 48h. E a concentração a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h também apresentou resposta diferente das concentrações a 20, 30, 40 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h, e a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h.

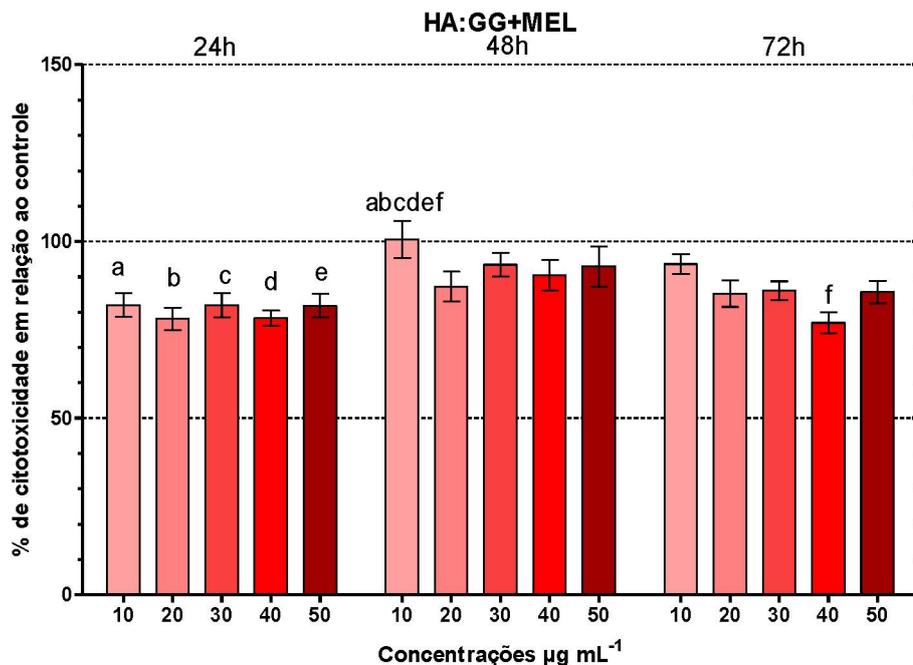
Comparando as duas misturas HA:GA+MEL e HA:GG+MEL, foi possível observar que a mistura HA:GG+MEL teve o melhor comportamento de atividade mitocondrial quando comparada a HA:GA+MEL, visto as maiores porcentagens observadas para HA:GG+MEL nos tempos de avaliação. As diferenças significativas de citotoxicidade puderam ser observadas nos tempos de 48h para as concentrações 10, 30, 40 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, e em 72h para 30, 40 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A MEL foi adicionada somente nessa parte do trabalho para que se pudesse conhecer o comportamento citotóxico do fármaco em combinação com os polissacarídeos aqui estudados e, pudesse ser uma sugestão de um bioativo adicional na mistura com o HA, já que esse fármaco tem uso potencial com ação antioxidante.

Ensaio de reologia foram feitos com as misturas HA:GA+MEL e HA:GG+MEL e, observou-se que não houve alterações no comportamento

viscoso e viscoelástico, quando comparado às misturas sem a adição de MEL (dados não apresentados).

FIGURA 42. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GG+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



Com o intuito de comparar as amostras deste estudo com o produto comercial usado como preenchedor dérmico, foram feitas avaliações estatísticas entre cada concentração nos determinados tempos entre o HAC e as demais amostras.

Comparativamente, entre o HA e o HAC foram encontradas diferenças significativas apenas em 72h nas concentrações 30, 40 µg mL⁻¹. Mostrando que na faixa de concentrações de 10 a 50 µg mL⁻¹ o HA da Sigma tem comportamento de toxicidade celular próximo ao comercial preenchedor dérmico.

A comparação entre o HAC e as misturas HA:GA e HA:GG apresentaram respostas similares. HAC e HA:GA diferiram na citotoxicidade significativamente principalmente no tempo de 72, para as concentrações 10, 30, 40 e 50 µg mL⁻¹, e em 48h nas concentrações 40 e 50 µg mL⁻¹. As comparações entre HAC e HA:GG mostraram diferenças significativas para as concentrações 30, 40 e 50 µg mL⁻¹ em 72h, e apenas na concentração de 50 µg mL⁻¹ em 48h.

Quando observados os resultados de maneira geral, notou-se, principalmente para as misturas, maior citotoxicidade nas concentrações acima de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, por isso foram planejados experimentos em menores concentrações, afim de se conhecer o comportamento dos polissacarídeos. Esses resultados estão descritos no próximo tópico.

4.5.1.3 Experimentos com concentrações de 2 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$

Uma observação importante para essa faixa de concentração, foi a repetição da concentração a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após o estudo das concentrações citadas no tópico anterior, novas concentrações foram escolhidas para prosseguir os ensaios, incluindo a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ já analisada. Como esses foram realizados em dias diferentes, com lotes de reagentes diferentes, optou-se por apresentar novamente os dados dessa concentração.

Os resultados para as concentrações de 2, 4, 6, 8 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, estão organizados entre as Figuras 43 e 50, bem como na Tabelas S2 do Apêndice.

Primeiramente, com relação aos polissacarídeos isolados, o HA não apresentou diferença significativa entre as concentrações e tempos avaliados, onde os valores de citotoxicidade não ultrapassaram 15%, como apresentado na Figura 43 [$F(1,739)=0,993$, $p=0,461$].

Com relação ao prechedor comercial HAC (Figura 44), foram observadas diferenças significativas da toxicidade [$F(1,753)=2,622$, $p=0,0018$] entre as concentrações $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 24h e a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h de análise. Nos tempos de avaliação ficou nítido uma redução da atividade mitocondrial linear com o aumento da concentração, indicada pela diminuição da porcentagem de citotoxicidade, mais expressiva no tempo de 24h, visto as diferenças citadas.

FIGURA 43. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

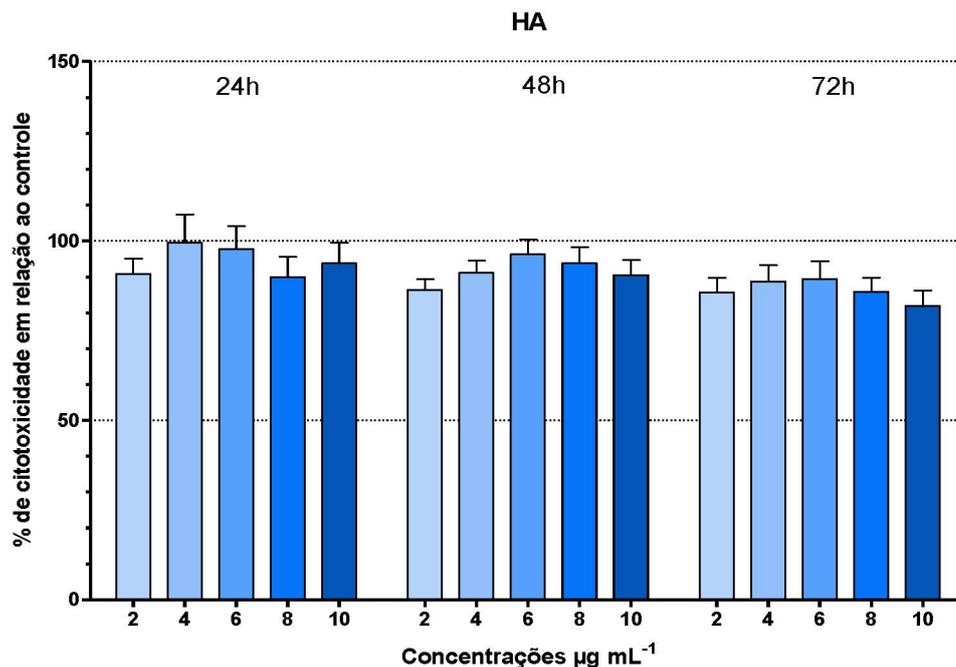
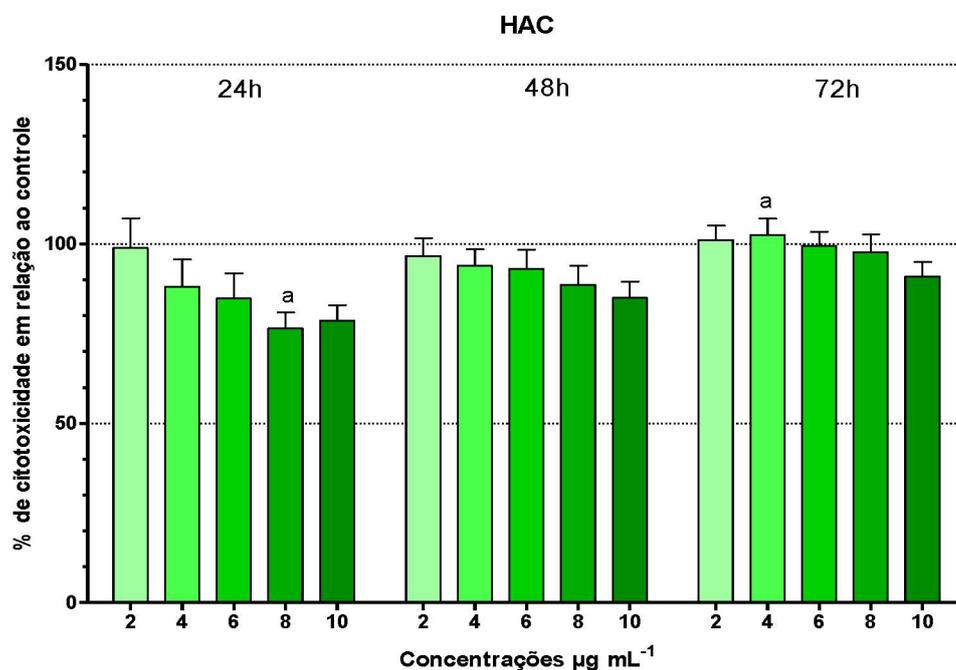


FIGURA 44. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO DERMA HYAL (HAC), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



Para a GA não ocorreram variações expressivas de comportamento entre as concentrações estudadas, logo não houve diferenças significativas entre as variáveis, como pode ser observado na Figura 45 [F (1,747)=1,456, p=0,132]. A

GG (Figura 46) nessas concentrações, apresentou comportamento mais citotóxico quando comparada a GA, com aumento da toxicidade celular com o aumento da concentração; sem apresentar diferenças significativas entre os tratamentos [F (1,747)=1,382, p=0,166].

As misturas (apresentadas nas Figuras 47 e 48) apresentaram comportamento parecido aos dos polissacarídeos isolados nessas concentrações. Para HA:GA não houve diferença significativa entre os tratamentos [F (1,739)=1,699, p=0,058]. Enquanto para HA:GG apenas foi encontrada diferença significativa entre as concentrações 2 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 48h [F (1,747)=2,116, p=0,0128].

FIGURA 45. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

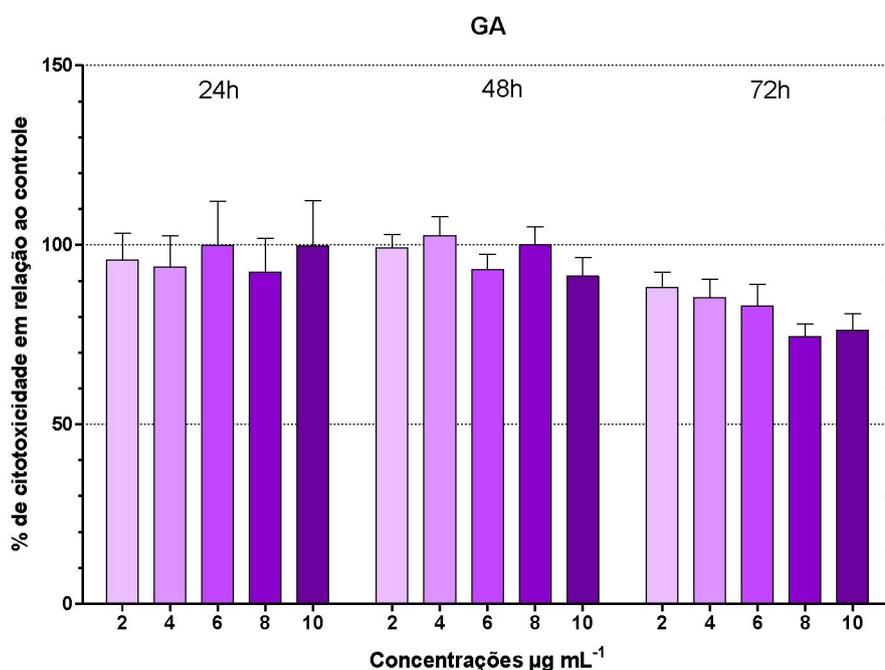


FIGURA 46. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE GUAR (GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

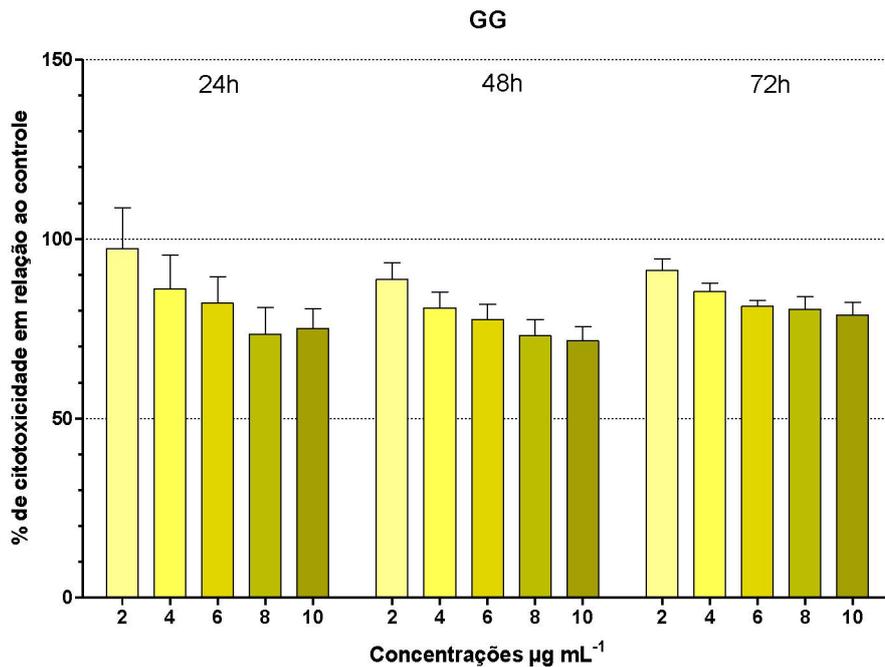


FIGURA 47. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

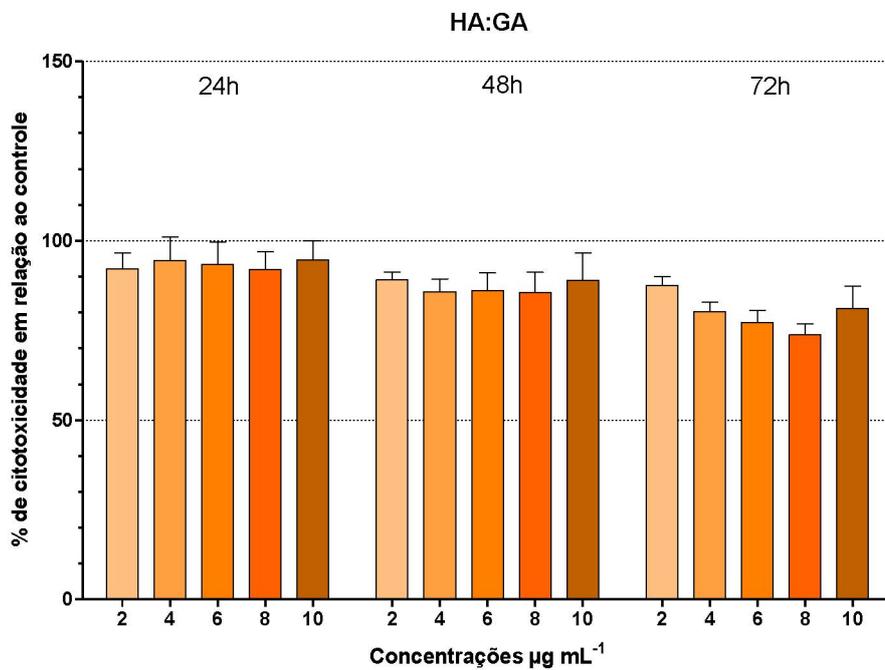
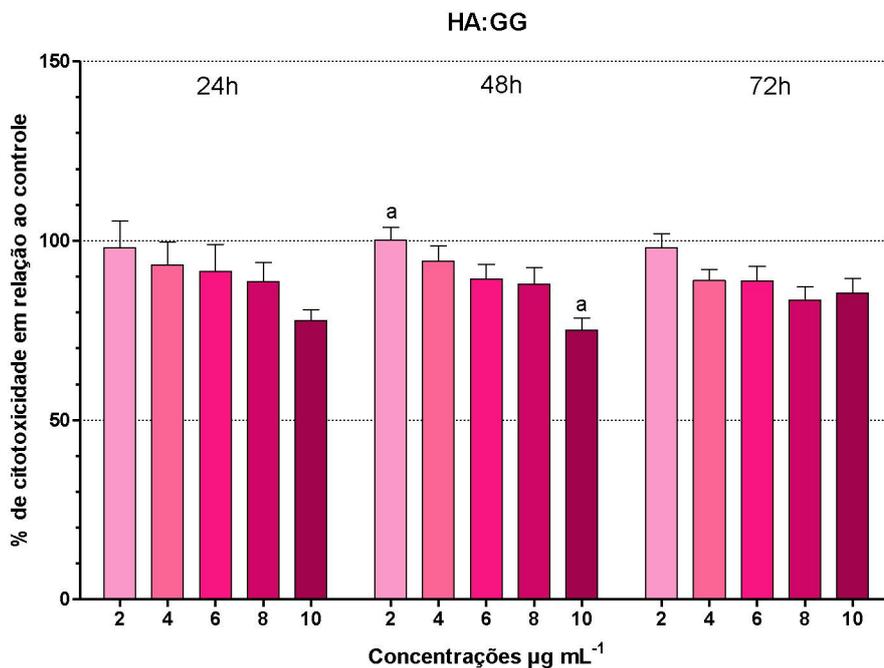


FIGURA 48. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



As Figuras 49 e 50 mostram o comportamento das misturas com MEL. Para a HA:GA+MEL foi observado o mesmo comportamento das concentrações da GA isolada, onde não foram observadas diferenças significativas [F (1,747)=1,301, p=0,21]. A mistura HA:GG+MEL mostrou diminuição da atividade mitocondrial com o aumento da concentração e foram observadas diferenças significativas entre as concentrações [F (1,747)=4,03, p=5 x 10⁻⁶]. A concentração a 2 µg mL⁻¹ em 24h foi diferente da concentração a 10 µg mL⁻¹ em 24h, e também diferiu das concentrações a 8 e 10 µg mL⁻¹ em 48 e 72h; a concentração a 2 µg mL⁻¹ em 72h foi diferente das concentrações a 8 e 10 µg mL⁻¹ em 48h e 72h.

FIGURA 49. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GG+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

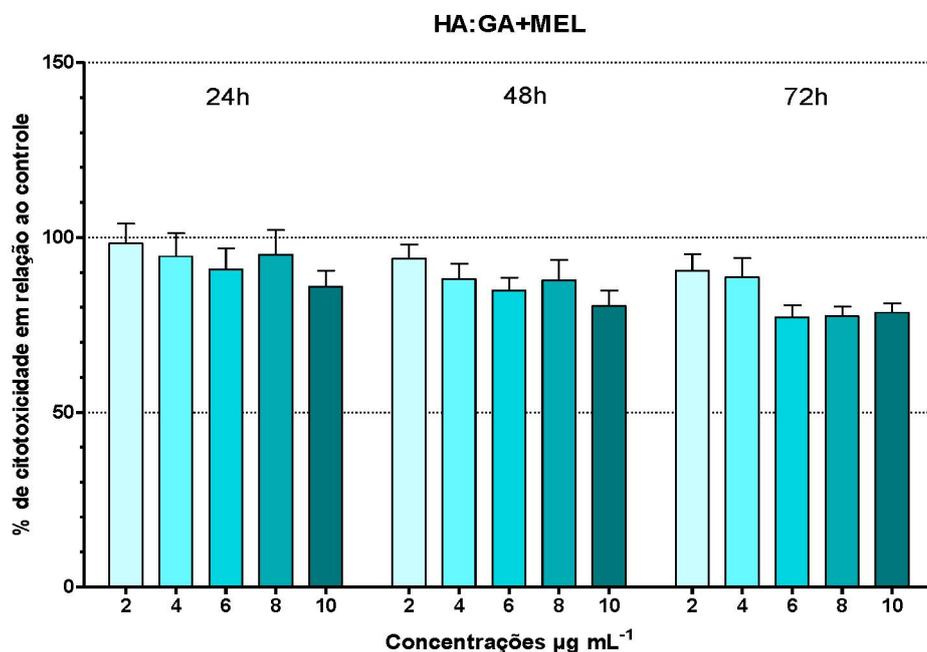
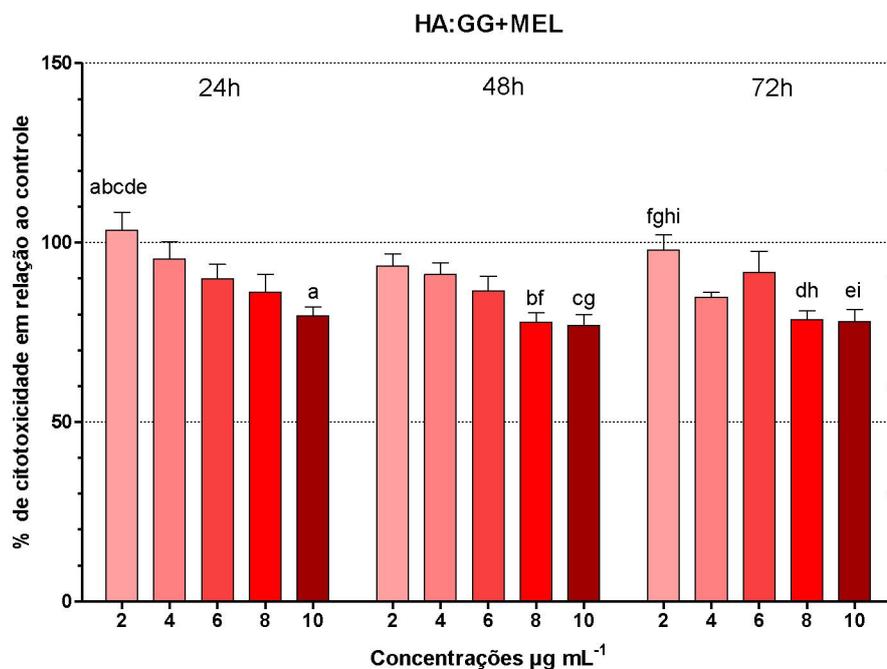


FIGURA 50. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GA+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



De modo geral, para as análises de MTT nos tempos e concentrações avaliadas, pode-se afirmar que, principalmente, na faixa de 2 a 50 µg mL⁻¹, os

polissacarídeos estudados, se mostraram potenciais para prosseguir com novos estudos para aplicações. Visto que para a ISO 10993-5:2009 que regulariza parâmetros para análises *in vitro* de produtos médicos, materiais com até 30% de citotoxicidade são aceitáveis para aplicações.

Estudos do comportamento de células VERO em relação ao efeito do HA, indicaram que a massa molar e a concentração são fatores importantes na proliferação e diferenciação celular. Assim, descritos na literatura, experimentos *in vitro* com HA de alta massa molar (maiores que $1 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$), na faixa de concentração entre 50 até $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ relataram citotoxicidade celular de fibroblastos (YONEDA et al., 1988), já outros autores indicaram que podem inibir a proliferação de fibroblastos (de 50 até $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) (BODO et al., 1993).

Outros estudos *in vitro* com células de osteoblastos, usando HA de alta massa molar, apresentaram inibição da proliferação das células (concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (KUNZE et al., 2010), e para o com de baixa massa molar (menores que $5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) relataram o contrário (PILLONI e BERNARD, 1998).

Galactomananas de *Dimorphandra gardneriana* (massa molar de $3.9 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$), estudadas com células Vero, apresentam baixa toxicidade, sendo apenas a concentração de $1,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 72h atóxica (NETO et al., 2014).

Estudos usando células HeLa e galactomanana de *Mimosa scabrella*, nativa (massa molar de $570.600 \text{ g mol}^{-1}$) e outra parcialmente degradada via glicosidade (massa molar de $35.080 \text{ g mol}^{-1}$), indicaram que não afetaram a citotoxicidade em concentrações maiores que $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 48h (NOLETO et al., 2009).

4.5.2 Pelo método do Cristal Violeta

Os resultados obtidos nas análises pelo método de Cristal Violeta para a faixa de concentrações de 2 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ mencionadas nos materiais e métodos, estão dispostos entre as Figuras 51 e 58. No Apêndice, estão organizadas as tabelas de cada amostra separadamente para auxílio na interpretação dos dados. Primeiramente, será discutido o comportamento das amostras isoladas

para que se possa discutir as comparações entre as amostras, assim como foi descrito para as análises do MTT.

Como houveram várias diferenças significativas entre as amostras analisadas, para os dados de cristal violeta, serão indicados as amostras que não apresentaram diferenças significativas, ao contrário do apresentado em MTT onde se indicou as amostras que apresentavam diferenças significativas.

Para todas as amostras ocorreu um comportamento semelhante. Quando observadas as concentrações dentro do mesmo tempo de avaliação, não houve diferença significativa, ou seja, no tempo de 24h não houve diferença entre as concentrações, o mesmo comportamento se repete para os tempos de 48h. Porém, as concentrações são diferentes significativamente quando comparadas às outras concentrações nos diferentes tempos.

Foi possível observar também que houve um aumento na quantidade de células ao longo das 72h de análise, indicando que ocorreu um aumento na densidade celular, mostrando que os polissacarídeos em estudos não inibiram a atividade celular, quando comparados as células que não receberam tratamento (controle). Com exceção ao HAC, que em 72h as concentrações avaliadas tiveram menor quantidade de células quando comparadas ao tempo de 48h, uma possível explicação seria porque atingiu o limite do tamanho do poço para a proliferação celular, visto que a quantidade máxima de células entre todos os tratamentos foi de aproximadamente 20.000 células.

FIGURA 51. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA) EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

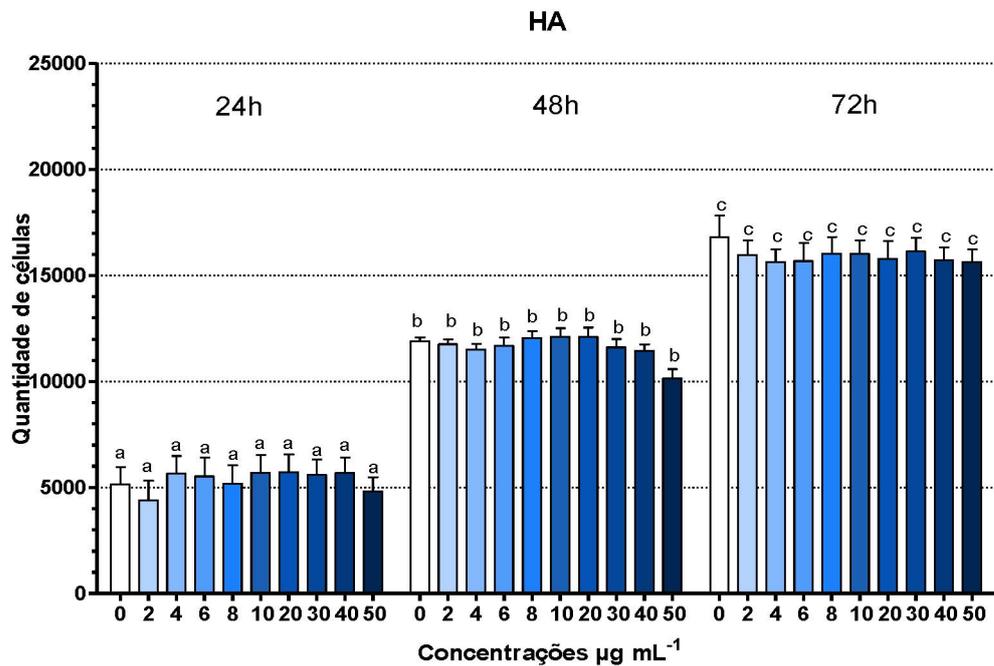


FIGURA 52. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO DERMA HYAL (HAC), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

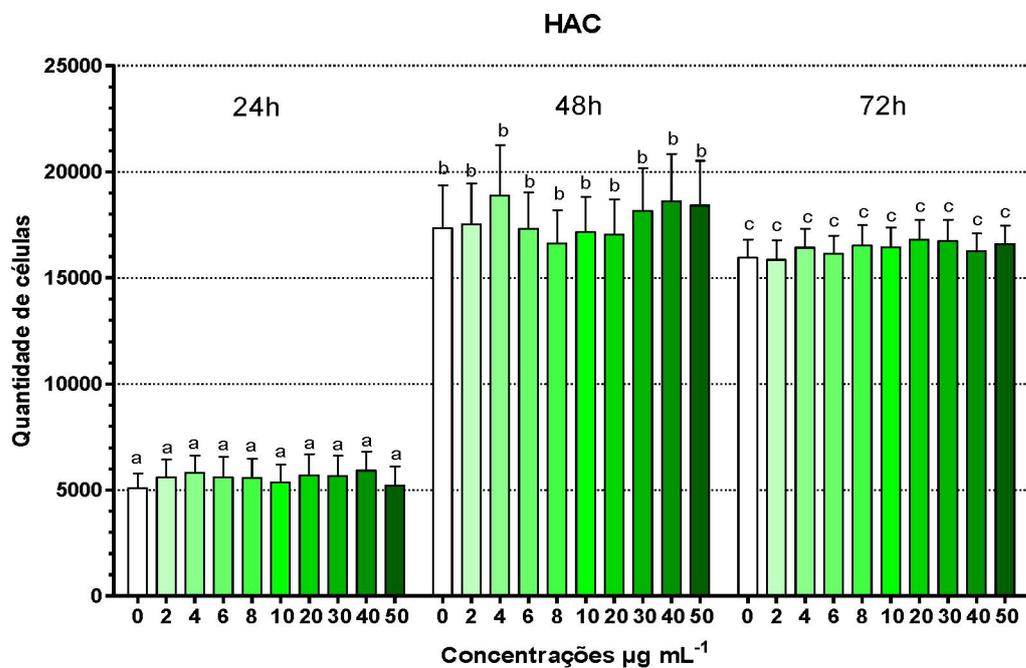


FIGURA 53. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

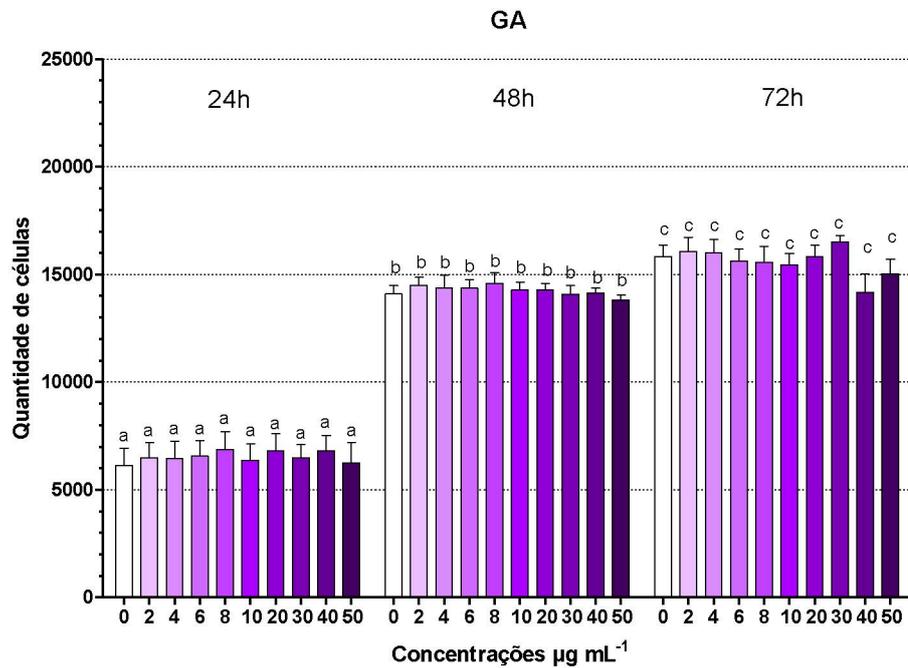


FIGURA 54. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A GALACTOMANANA DE GUAR (GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

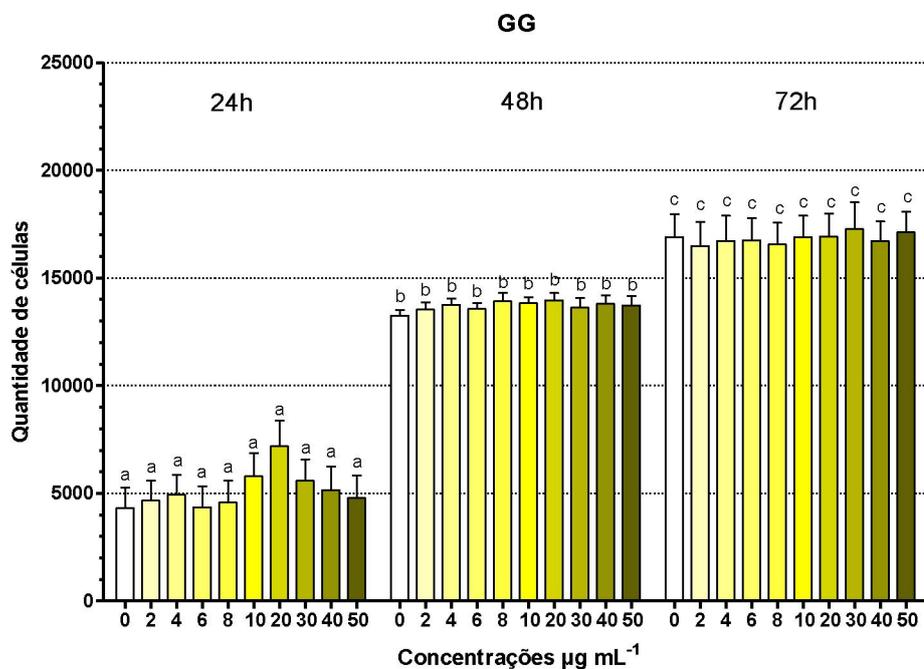


FIGURA 55. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

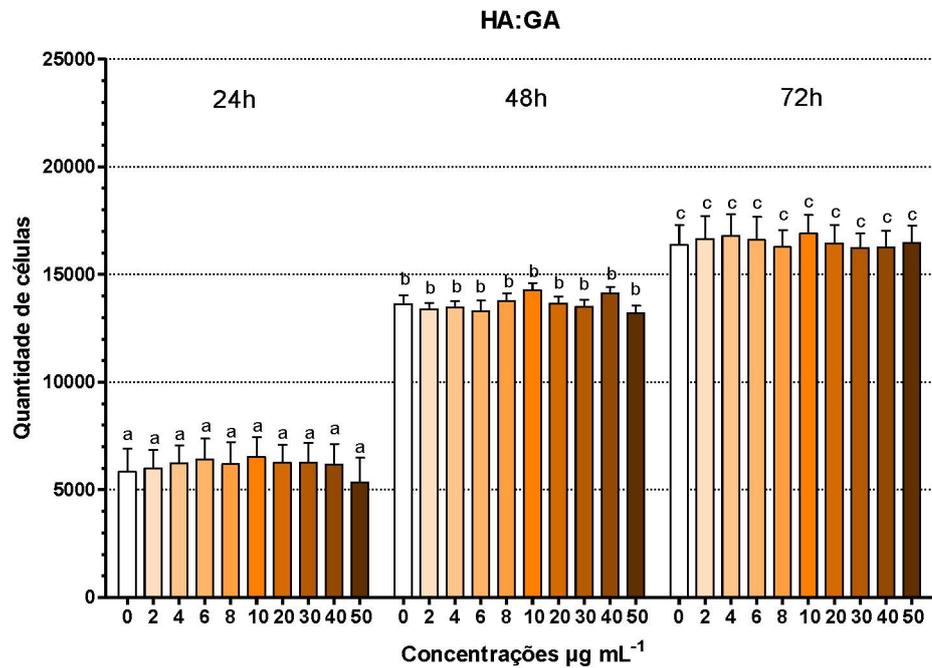


FIGURA 56. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

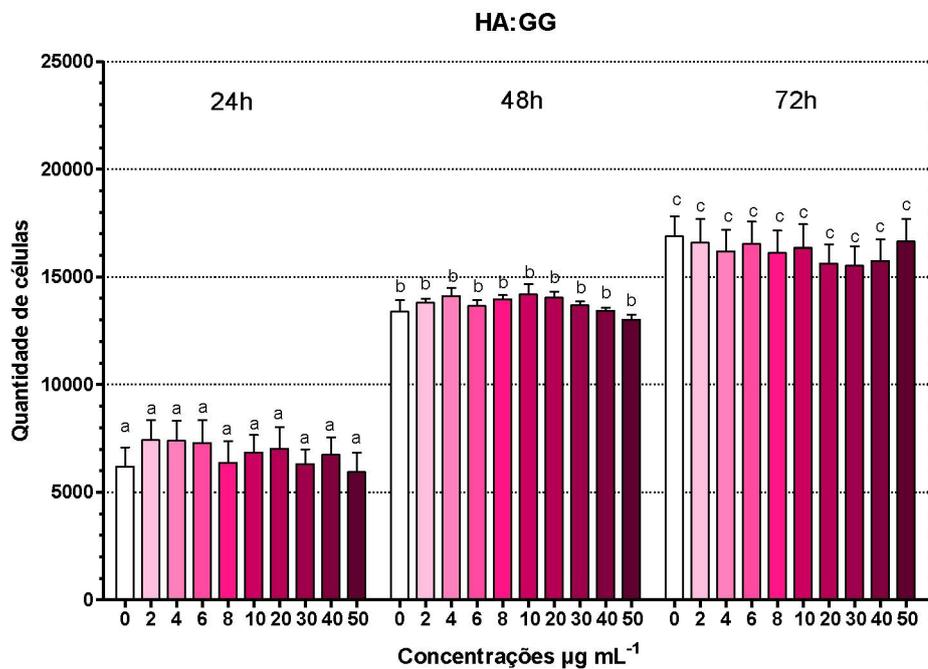


FIGURA 57. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GA+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.

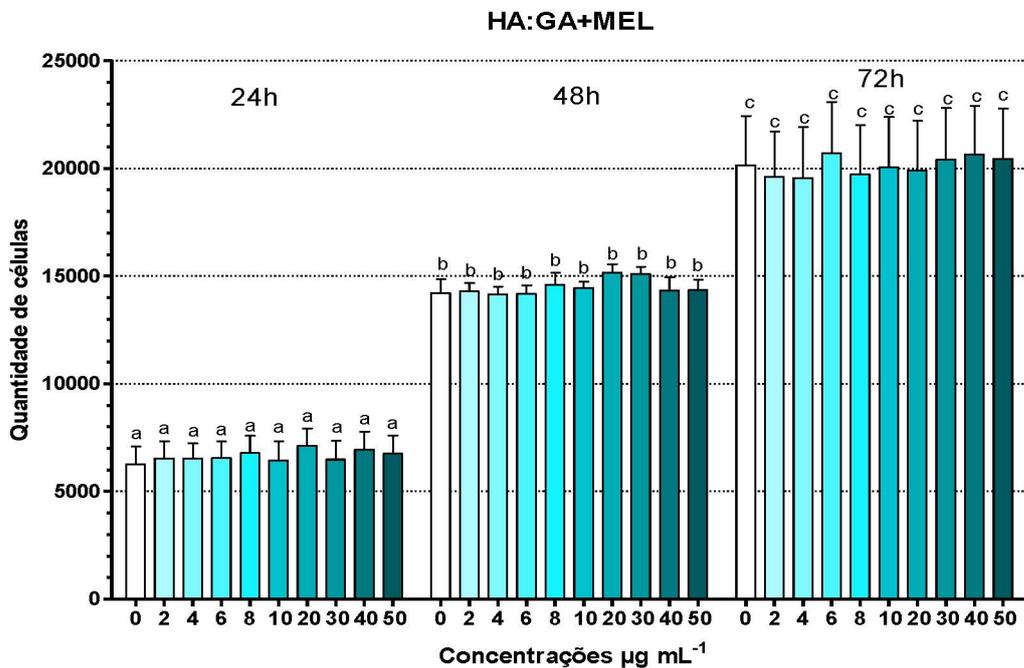
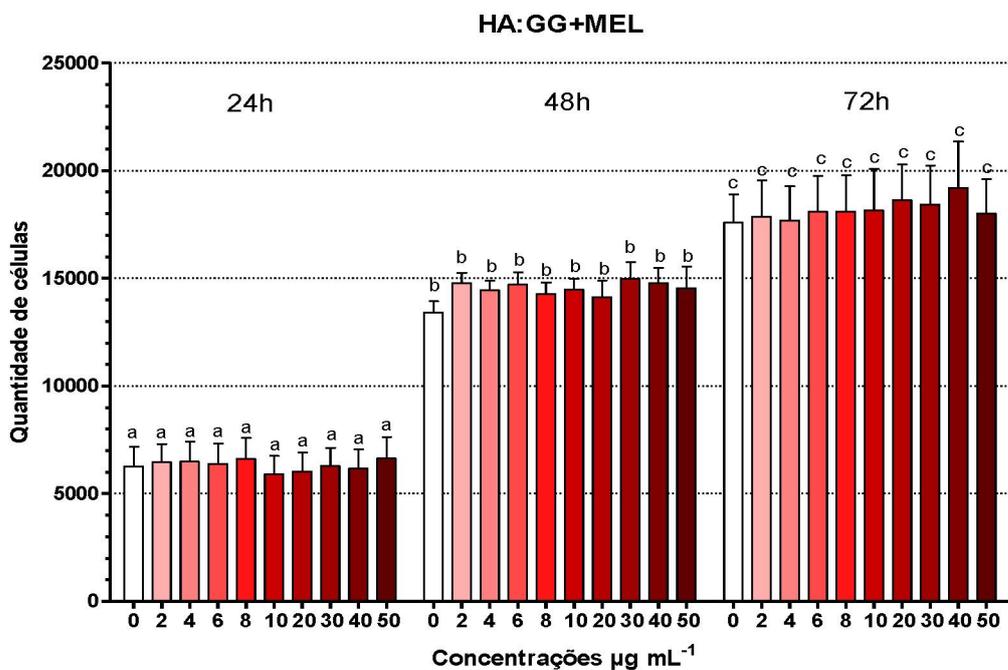


FIGURA 58. EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR COM ADIÇÃO DE MELATONINA (HA:GG+MEL), EM 24, 48 E 72 H. LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS.



Dessa forma, foi possível afirmar, pelas análises de proliferação celular pelo método de Cristal Violeta nessas concentrações e tempos de estudo, que as amostras têm potencial de aplicação com nenhuma ou muito baixa citotoxicidade, próximas ao produto comercial.

Quando relacionados os métodos de MTT e Cristal Violeta nas concentrações de até $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, pode-se afirmar que houve uma pequena diminuição da atividade mitocondrial das células com os materiais de estudo, quando comparados aos controles, porém não atingiram valores prejudiciais a atividade das células. A maior parte das células mantiveram metabolicamente ativas juntamente com a proliferação celular, o que foi comprovado pelas detecções das absorbâncias pelas colorações através dos métodos MTT e Cristal Violeta.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os polissacarídeos foram caracterizados por SEC como homogêneos, polidispersos em M_w , e as misturas com 50% (m/m) de HA e GM, apresentaram aumento do volume hidrodinâmico, quando comparadas aos valores das GM isoladas, corroborando com interação físico-química entre os biopolímeros.

Pelos espectros de RMN das misturas foi possível comprovar o processo da interação através de mudanças na relaxação das moléculas do HA pela presença da galactomanana. Foi observada alteração na mobilidade do grupamento metil presente no HA, o qual diminuiu pela presença das GMs, sendo mais um indicativo de interação.

Na sinergia do HA:GM as interações ocorreram entre o H-1 das unidades de ácido glucurônico do HA e o H-5 das unidades de manose das galactomananas.

As avaliações reológicas mostraram melhora no comportamento viscoso e viscoelástico nas misturas, em relação aos polissacarídeos isolados. A melhor interação viscosa ocorreu com a mistura HA:GA, a 25 g L⁻¹, com 50% (m/m) de substituição de HA.

As respostas reológicas das misturas, comparadas aos produtos comerciais, mostraram *in vitro* a vantagem da maior propensão do preenchimento se espalhar pelo tecido. E, no preenchimento de regiões com leves forças tensionais, o produto teria a facilidade de fluir pela agulha com menor sensação de dor pelo paciente, durante a aplicação por injeção.

As misturas apresentaram maior estabilidade coloidal quando comparadas aos polissacarídeos isolados, pelos valores do potencial zeta.

Pelas análises de MTT e do Cristal Violeta foi possível concluir que as amostras (HA:GM, 50%, m/m) não inibiram atividade celular e têm potencial de aplicações para as concentrações de até 50 µg mL⁻¹.

A adição de MEL não alterou significativamente as análises da atividade mitocondrial e proliferação celular dos sistemas, mostrando, portanto, ser um bioativo nas misturas de ácido hialurônico e galactomananas, e apresentaram potencial *in vitro* para o desenvolvimento de novos produtos bioativos.

Os polissacarídeos usados neste trabalho são de fontes naturais e renováveis e os sistemas desenvolvidos podem ter potencial no

desenvolvimento de novos produtos, também pela diminuição dos custos, quando o HA foi comparativamente avaliado às misturas, com a possível substituição de 50% (m/m) do HA por GM.

6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Existem etapas importantes para que esses sistemas possam ser produtos comercializados, e podem ser sugeridas as análises *in vitro* com outros tipos de células, como os fibroblastos; e o estudo da produção de colágeno nas células;

Efetuar testes *in vitro* de estabilidade das misturas na presença de hialuronidase.

Estudos *in vivo* de hidratação da pele, rejuvenescimento da derme utilizando animais.

Modificações por ligações covalentes entre os polissacarídeos e análises das propriedades físico-químicas do novo material.

REFERÊNCIAS

- ABDULJABBARA M.; BASENDWH, M. Complications of hyaluronic acid fillers and their managements. **Journal of Surgical Dermatology**, v. 20, p. 100-106, 2016.
- ALAM, M.; TUNG, R. Injection technique in neurotoxins and fillers: Indications, products, and outcomes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 79, p. 423-435, 2018.
- ALMALIK, A.; KARIMI, S.; OUASTI, S.; DONNO, R.; WANDREY, C.; DAY, P. J.; TIRELLI, N. Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, p. 5369-5380, 2013.
- ANTONPAAR. Disponível em: <<https://wiki.anton-paar.com/en/zeta-potential/>>. Acesso em: 02 de agosto de 2019.
- BARAK, S.; MUDGIL, D. Locust bean gum: Processing, properties and food applications—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 74-80, 2014.
- BARNES, A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. Netherlands: Elsevier, 1989, p. 199.
- BOCIEK, S. M.; DARKE, A. H.; WELTI, D.; REES D. A. The C-13-NMR spectra of hyaluronate and chondroitin sulfates – Further evidence on an alkali-induced conformation change. **European Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 447-456, 1980.
- BODO, M.; PEZZETTI, F.; BARONI, T.; CARINCI, F.; ARENA, N.; NICOLETTI, I.; BECCHETTI, E. Hyaluronic acid modulates growth, morphology and cytoskeleton in embryonic chick skin fibroblasts. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 37, p. 349-352, 1993.
- BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; MAIA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: Comparison with guar gum and locust bean gum. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p 184-192, 2010.
- BRESOLIN, T. M. B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Xanthan–galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 263-275, 1998.
- BRESOLIN, T. M. B.; SANDER, P. C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Viscometric studies on xanthan galactomannan systems and galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 131-138, 1997.

BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI, V. R.; ROCHA, D. C.; DIETRICH, S. M. C. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 38, p. 871-875, 1995.

BUDA, S.; NAWÓJ, M.; MLYNARSKI, J. Recent Advances in NMR Studies of Carbohydrates. **Annual Reports on NMR Spectroscopy**, v. 89, p. 185–223, 2016.

CAIRNS, P.; MILES, M. J.; MORRIS, V. J.; BROWNSEY, G. J. X-Ray fibre-diffraction studies of synergistic, binary polysaccharide gels. **Carbohydrate Research**, v. 160, p. 411-423, 1987.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 522–528, 2011.

CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 662-671, 2011.

CHEN, L. H.; XUE, J. F.; ZHENG, Z. Y.; SHUHAI, M.; THU, H. E.; HUSSAIN, Z. Hyaluronic acid, an efficient biomacromolecule for treatment of inflammatory skin and joint diseases: A review of recent developments and critical appraisal of preclinical and clinical investigations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 572-584, 2018.

CHENG, Y.; BROWN, K. M.; PRUD'HOMME, R. K. Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 29-35, 2002.

CHENG, H. N.; NEISS, T. G. Solution NMR Spectroscopy of Food Polysaccharides. **Polymer Reviews**, v. 52, p. 81–114, 2012.

Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) no 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. OJ L 83, 22.3.2012, p. 1.

COWMAN, M. K.; MENDICHI, R. Methods for determination of hyaluronan molecular weight. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. Chemistry and biology of hyaluronan. Elsevier, 2004.

COWMAN, M. K. Experimental approaches to hyaluronan structure. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 791-809, 2005.

COX, W. P.; MERZ, E. H. Correlation of dynamic and steady flow viscosities. **Journal of Polymer Science**, v. 28, p. 619-622, 1958.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and Interactions of Seed Galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p. 241-312, 1975.

de OLIVEIRA, J. D.; CARVALHO, L. S.; GOMES, A. M. V.; QUEIROZ, L. R.; MAGALHÃES, B. S.; PARACHIN, N. S. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p. 119, 2016.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25-39, 2003.

DODERO, A.; WILLIAMS, R.; GAGLIARDI, S.; VICINIA S.; ALLOISIO, M.; CASTELLANO, M. A micro-rheological and rheological study of biopolymers solutions: Hyaluronic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 349-355, 2019.

ELELLA, M. H. A.; MOHAMED, R. R.; SABAA, M. W. Synthesis of novel grafted hyaluronic acid with antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 189, p. 107-114, 2018.

FDA, Use of International Standard ISO 10993–1, 2016. **Biological Evaluation of Medical Devices - Part 1: Evaluation and Testing Within a Risk Management Process**.

FERRY, J. D., Viscoelastic properties of polymers. John Wiley & Sons: 1980.

GAD, S. C. Safety evaluation of medical devices. In: GAD, S. C. **Cytotoxicity Testing**. Marcel Dekker, New York, p. 75–84, 1997.

GALLO, N.; NASSER, H.; SALVATORE, L.; NATALI, M. L.; CAMPA, L.; MAHMOUD, M.; CAPOBIANCO, L.; SANNINO, A.; MADAGHIELE, M. Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges. **European Polymer Journal**, v. 117, p. 134-147, 2019.

GALVÁN, Z. R. N.; SOARES, L. DE S.; MEDEIROS, E. A. A.; SOARES, N. DE F. F.; RAMOS, A. M.; COIMBRA, J. S. DOS R.; DE OLIVEIRA, E. B. Rheological properties of aqueous dispersions of xanthan gum containing different chloride salts are impacted by both sizes and net electric charges of the cations. **Food Biophysics**, v. 13, p. 186-197, 2018.

GANTER, J. L. M. S.; CORRÊA, J. B. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; REICHER, F. Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella* (bracatinga). **Proceedings of VI Polymer Seminar Sempol Brasil França**, p. 169-179, 1988.

GAO, Z.; FANG, Y.; CAO, Y.; LIAO, H.; NISHINARI, N.; PHILLIPS, G. O. Hydrocolloid-food component interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 149-156, 2017.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, p. 236–247, 2011.

GIJI, S., ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of hyaluronic acid from marine organisms. **Marine Carbohydrates: Fundamentals and Applications**, p. 61–77, 2014.

GOLD, M. The science and art of hyaluronic acid dermal filler use in esthetic applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 8, p. 301–307, 2009.

GOWRARAJU, N. D.; JAGADEESAN, S.; AYYASAMY, K.; OLASUNKANMI, L. O.; EBENSO, E. E.; SUBRAMANIAN, C. Adsorption characteristics of Iota-carrageenan and Inulin biopolymers as potential corrosion inhibitors at mild steel/sulphuric acid interface. **Journal of Molecular Liquids**, v. 232, p. 9-19, 2017.

GOYCOOLEA, F. M.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, p. 181-192, 2001.

GRASDALEN, H.; PAINTER, T. NMR studies of the composition and sequence in legume-seed galactomannans. **Carbohydrate Research**, v.81, p.59–66, 1980.

HADDARAH, A.; BASSAL, A.; ISMAIL, A.; GAIANI, C.; IOANNOU, I.; CHARBONNEL, C.; HAMIEH, T.; GHOUL, M. The structural characteristics and rheological properties of Lebanese locust bean gum. **Journal of Food Engineering**, v. 120, p. 204-214, 2014.

HACIŞEVKI, A.; BABA, B. An Overview of Melatonin as an Antioxidant Molecule: A Biochemical Approach. In DRĂGOI, C. M.; NICOLAE, A. C. **Melatonin - Molecular Biology, Clinical and Pharmaceutical Approaches**. DOI: 10.5772/intechopen.74993. 2018.

HAGEL, J., NAQVI, D. Increasing muscular volume in a human using hyaluronic acid. US9907740B2, 6 Mar. 2018.

HAKERT, H.; ECKERT, T.; MÜLLER, T. Rheological and electron microscopic characterization of aqueous carboxymethyl cellulose gels Part I: Rheological aging of aqueous gels of carboxymethyl cellulose in the free acid form (HCMC). **Colloid and Polymer Science**, v. 267, p. 226–229, 1989.

HAMDANI, A. M.; WANI, I. A.; BHAT, N. A. Sources, structure, properties and health benefits of plant gums: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 46-61, 2019.

HEMSHEKHAR, M.; THUSHARA, R. M.; CHANDRANAYAKA, S.; SHERMAN, L. S.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Emerging roles of hyaluronic acid

bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 917-28, 2016.

HESARINEJAD, M. A.; KOOCHKEKI, A.; RAZAVI, S. M A. Dynamic rheological properties of *Lepidium perfoliatum* seed gum: Effect of concentration, temperature and heating/cooling rate. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 583-589, 2014.

HUANG, G.; HUANG, H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. **Drug Delivery**, v. 25, p. 766-772, 2018.

ISO10993-1, 2009. International Organization for Standardization ISO 10993–1: 2009. **Biological evaluation of medical devices - Part 1: evaluation and testing within a risk management process**

ISO10993-5, 2009. International Organization for Standardization ISO 10993-5: 2009. **Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in Vitro cytotoxicity.**

JOHNS, M. R.; GOH, L.T.; OEGGERLI, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 507–512, 1994.

JOHNSON JR, W.; HELDRETH, B.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D.; LIEBLER, D. C.; MARKS JR, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; ANDERSEN, F. A. Safety Assessment of Galactomannans as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v.34, p. 35S-65S, 2015.

JYOTISHKUMAR, P. **Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks**. John Wiley & Sons, 2013. cap. 2, p. 998.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

KABLIK, J.; MONHEIT, G. D.; YU, L.; CHANG, G.; GERSHKOVICH, J. Comparative Physical Properties of Hyaluronic Acid Dermal Fillers. **Dermatologic Surgery**, v. 35, p. 302-312, 2009.

KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 1723-1729, 2004.

KASAAI, M. R. Molecular Weight Distribution for Biopolymers: A Review. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 6, p. 39-44, 2018.

KAWADA, C.; YOSHIDA, T.; YOSHIDA, H.; MATSUOKA, R.; SAKAMOTO, W.; ODANAKA, W.; SATO, T.; YAMASAKI, T.; KANEMITSU, T.; MASUDA, Y.;

URUSHIBATA, O. Ingested hyaluronan moisturizes dry skin. **Nutrition Journal**, v. 13, p. 1-9, 2014.

KONTOGIORGOS, V. Galactomannans (Guar, Locust Bean, Fenugreek, Tara). **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 109-113, 2019.

KUMAR, S.; KAUR, P.; BERNELA, M.; RANI, R.; THAKUR, R. Ketoconazole encapsulated in chitosan-gellan gum nanocomplexes exhibits prolonged antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 988-994, 2016.

LAURENT, T. C. Biochemistry of Hyaluronan. **Acta Oto-Laryngologica**, p. 104, p. 7-24, 2009.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G.; IZYDORCZYK, M. S. Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 68 -75, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LI, J.-M.; NIE, S.-P. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 46-61, 2016.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review). **Biomedical Reports**, v. 3, p. 617-620, 2015.

LIU, L.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges and perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 99, 2011.

LIU, L.; ZHAO, Q.; LIU, T.; LONG, Z.; KONG, J.; ZHAO, M. Sodium caseinate/xanthan gum interactions in aqueous solution: Effect on protein adsorption at the oil–water interface. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 339-346, 2012.

LIU, X.; RODEHEAVER, D. P.; WHITE, J. C.; WRIGHT, A. M.; WALKER, L. M.; ZHANG, F.; SHANNON, S. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 97, p. 24–32, 2018.

LUAN, T.; WU, L.; ZHANG, H.; WANG, Y. A study on the nature of intermolecular links in the cryotropic weak gels of hyaluronan. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2076-2085, 2012.

LUCYSZYN, N.; QUOIRIN, M.; HOMMA, M. M.; SIERAKOWSKI, M. R. Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 173-176, 2007.

LUNDQVIST, L. Structural and Interaction Studies of Polysaccharides by NMR Spectroscopy. 2015. 75 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade de Ciências Agrícolas, Uppsala – Suécia, 2015.

MALEKI, A., KJØNIKSEN, A. L., NYSTRÖM, B. Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. **Macromolecular Symposia**, v. 274, p. 131–140, 2008.

MERO, A.; CAMPISI, M. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules, *Polymers*, v. 6, p. 346-369, 2014.

MHLW, 2012. Japanese Guidelines for Basic Concepts for Evaluating Biological Safety of Medical Devices Required for Application of Manufacturing/Marketing Approval (PFSB/ELD/OMDE Notification No. 0301-20. Japan, March 1, 2012.

MIERCZYNSKA, J.; CYBULSKA, J.; SOLOWIEJ, B.; ZDUNEK, A. Effect of Ca²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. **Carbohydrate Polymers**, 133 (2015), pp. 547-555.

MILOJEVIĆ, M.; GRADIŠNIK, L.; STERGAR, J.; KLEMEN, M. S.; STOŽER, A.; VESENJAK, M.; DUBROVSKID, P. D.; MAVER, T.; MOHAN, T.; KLEINSCHEK, K. S.; MAVER, U. Development of multifunctional 3D printed bioscaffolds from polysaccharides and NiCu nanoparticles and their application. **Applied Surface Science**, v. 488, p. 836-852, 2019.

MOLLIARD, S. G.; BÉTEMPS, J. B.; HADJAB, B.; TOPCHIAN, D.; MICHEELS, P.; SALOMON, D. Key rheological properties of hyaluronic acid fillers: from tissue integration to product degradation. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 5, p. 17, 2018.

MORRIS, E. R. Physical probes of polysaccharide conformation and interactions, *Food Chemistry*, v. 6, p. 15-39, 1980.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUSCHIN, T.; YOSHIDA, T. Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1893-1898, 2012.

NOBLE, P. W.; LIANG, J.; JIANG, D. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. **Physiological Reviews**, v. 91, p. 221–264, 2011.

NORDQVIST, C. What you need to know about carbs, Last updated Tue 17 October 2017. Disponível em: <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/161547.php>>. Acesso em: 16 de julho de 2019.

NUSSINOVITCH, A. **Hydrocolloid applications: Gum technology in the food and other industries**. Springer, New York, 1997.

PRABAHARAN, M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n 2, p. 117-124, 2011.

PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of *Caesalpinaceae*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 737-743, 1998.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**, 2ed. Woodhead Publishing Limited, 2009.

PILLONI, A.; BERNARD, G. W. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis in vitro. **Cell and Tissue Research**, v. 294, p. 323-333, 1998.

PIOTTO, M.; SAUDEK, V.; SKLENÁO, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 2, p. 661-665, 1992.

PIRES, A. M. B; SANTANA, M. H. A. Rheological aspects of microbial hyaluronic acid. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 122, p. 126-133, 2011.

POLLARD, M. A.; EDER, B.; FISCHER, P.; WINDHAB, E. J. Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of *Caesalpinioideae* and *Faboideae* subfamilies by multidetection aqueous SEC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 70-84, 2010.

RANGASWAMY, V.; JAIN, D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*, **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 493-496, 2008.

RAZAVI, S. M. A.; ALGHOONEH, A.; BEHROUZIAN, F.; CUI, S. W. Investigation of the interaction between sage seed gum and guar gum: Steady and dynamic shear rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 67-76, 2016.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Cell Viability Assays**. In: Source Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

ROCA-MARTINEZ, J.-X.; AYGLON, A. Implants for sculpting, augmenting or correcting facial features such as the chin. US2019/0224365A1. 25 Jul 2019.

ROMAGNOLI, M.; BELMONTESI, M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 123–159, 2008.

RUB, N. RHEOLOGY AND THERMODYNAMICS OF STARCH-BASED HYDROGEL-MIXTURES. 2016. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Johannes Gutenberg, Mainz - Alemanha, 2016.

SASSAKI, G. L.; GUERRINI, M.; SERRATO, R. V.; SANTANA-FILHO, A. P.; CARLOTTO, J.; SIMAS-TOSIN, F.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J. Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, p. 34-41, 2014.

SIGMA-ALDRICH, 2019. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em 25 de julho de 2019.

SHARMA, G.; SHARMA, S.; KUMAR, A.; AL-MUHTASEB, A. H.; NAUSHAD, M.; GHAFAR, A. A.; MOLA, G. T.; STADLER, F. J. Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 534-545, 2018.

SILVA, F.; TORRES, L.; SILVA, L.; FIGUEIREDO, R.; GARRUTI, D.; ARAÚJO, T.; DUARTE, A.; BRITO, D.; RICARDO, N. Cashew gum and maltodextrin particles for green tea (*Camellia sinensis* var *Assamica*) extract encapsulation. **Food Chemistry**, v. 261, p. 169-175, 2018.

SINGH, S.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Mannans: An overview of properties and application in food products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 79-95, 2018.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P. Modelling the rheological behavior of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 339-350, 2005.

SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F. A.; SIERAKOWSKI, M. R. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 641-647, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C.B. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, P. 542, 2006.

STEFFE, J. F. (1996). **Rheological methods in food process engineering** (2nd ed.). Michigan: Freeman Press.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, p. 114, 2012.

SUNDARAM H, VOIGTS B, BEER K, MELAND M. Comparison of the Rheological Properties of Viscosity and Elasticity in Two Categories of Soft

Tissue Fillers: Calcium Hydroxylapatite and Hyaluronic Acid. **Dermatologic Surgery Journal**, v. 36, p. 1859-65, 2010.

TAKEMASA, M.; NISHINARI, K. Solution Structure of Molecular Associations Investigated Using NMR for Polysaccharides, Xanthan/Galactomannan Mixtures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, p. 3027-3037, 2016.

TUMMALAPALLI, M.; BERTHET, M.; VERRIER, B.; DEOPURA, B. L.; ALAM, M. S.; GUPTA, B. Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, p. 234-245, 2016.

VALENGA, F.; LUBAMBO, A. F.; LUCYSZYN, N.; DE SOUZA, C. F.; ONO, L.; SIERAKOWSKI, M. R. Galactomannan-Alginate Synergism Applied in Albumin Encapsulation. **Macromolecular Symposia**, v. 299-300, p. 99-106, 2011.

VAN BRUNT, J. More to hyaluronic acid than meets the eye. **Nature Biotechnology**, v. 156, p. 1059–1065, 1986.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, p. 10-14, 2011.

VENDRUSCOLO, C. W.; ANDREAZZA, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 1-11, 2005.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. Química orgânica: Estrutura e função. 4.ed. Porto Alegre, Bookman, 2004.

WANG, C. T.; LIN, J.; CHANG, C. J.; LIN, Y. T.; HOU, S. M. Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 86, p. 538-545, 2004.

WANG, Y.; HAN, G.; GUO, B.; HUANG, J. Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis. **Pharmacological Reports**, v. 68, p. 1126–1132, 2016.

WEINHOLD, M. X.; SAUVAGEAU, J. C. M.; KEDDIG, N.; MATZKE, M.; TARTSCH, B.; GRUNWALD, I.; KUBEL, C.; JASTORFFG, B.; THOMING, J. Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. **Green Chemistry**, v. 11, p. 498–509, 2009.

WELLER, C. T. Carbohydrates Studied by NMR. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**, p. 172–180, 1999.

WILLIAMS, K. What is a dn/dc value and why is it important for GPC/SEC? Malvern Panalytical, 2018. Disponível em: <<https://www.materials->

talks.com/blog/2018/08/22/what-is-a-dndc-value-and-why-is-it-important-for-gpcsec/. Acesso em: 01 de agosto de 2019.

WINKWORTH-SMITH, C.; FOSTER, T. J. General Overview of Biopolymers: Structure, Properties, and Applications. In: THOMAS, S.; DURAND, D.; CHASSENIEUX, C.; JYOTISHKUMAR, P. Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks. Wiley-VCH, 2013.

WOEHL, M. A. Membranas biocurativas obtidas a partir de celulose bacteriana incorporadas de hidrocolóides e nanopartículas de prata. 2014. 147 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

WU, Y.; GUO, R.; CAO, N.; SUN, X.; SUI, Z.; GUO, Q. A systematical rheological study of polysaccharide from *Sophora alopecuroides* L. seeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 63-71, 2018.

YILMAZ, M. T.; KARAMAN, S.; DOGAN, M.; YETIM, H.; KAYACIER, A. Characterization of O/W model system meat emulsions using shear creep and creep recovery tests based on mechanical simulation models and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 327–336, 2012.

YIN F, LIN L, ZHAN S. Preparation and properties of cellulose nanocrystals, gelatin, hyaluronic acid composite hydrogel as wound dressing. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 30, p. 190-201, 2019.

YOUSEFI, M.; JAFARI, S. M. Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 468-483, 2019.

YURIS, A.; HINDMARSH, J.; HARDACRE, A. K.; GOH, K. K. T.; MATIA-MERINO, L. The interactions between wheat starch and Mesona chinensis polysaccharide: A study using solid-state NMR. *Food Chemistry*, v. 284, p. 67-72, 2019.

ZAMBONI, F.; VIEIRA, S.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M.; COLLINS, M. N. The potential of hyaluronic acid in immunoprotection and immunomodulation: Chemistry, processing and function. **Progress in Materials Science**, v. 97, p. 97-122, 2018.

APÊNDICE

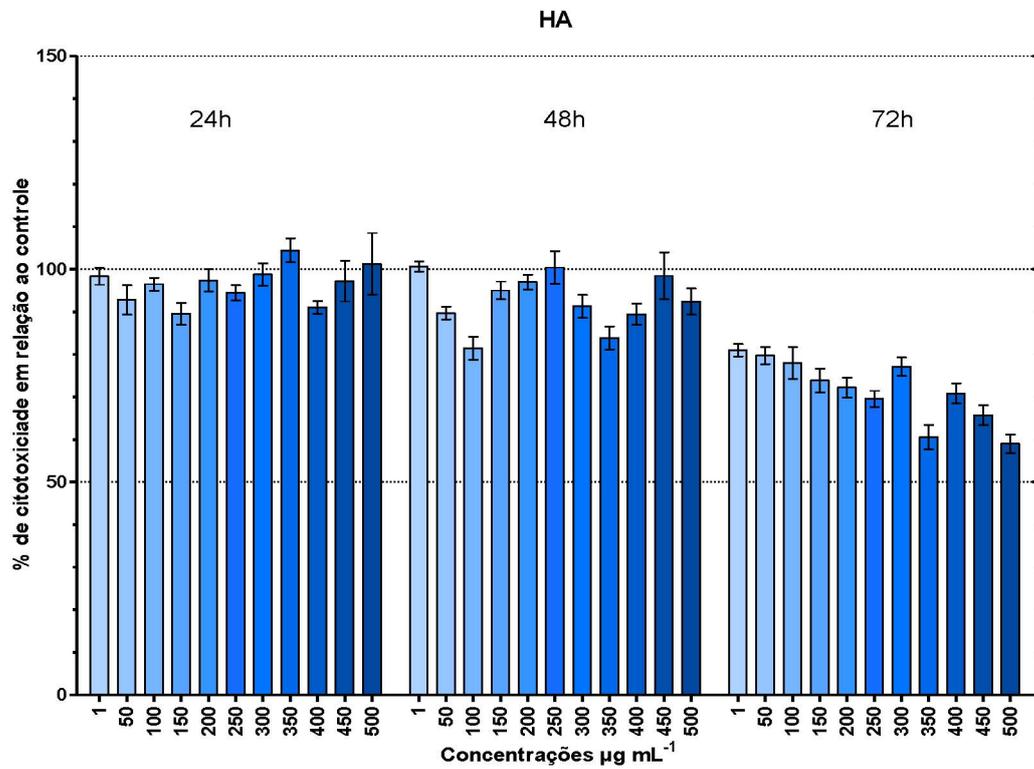
FIGURA S1. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA O ÁCIDO HIALURÔNICO (HA), EM 24, 48 E 72 H. CONCENTRAÇÕES 1 A 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

FIGURA S4. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE ALFARROBA (HA:GA), EM 24, 48 E 72 H. CONCENTRAÇÕES 1 A 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

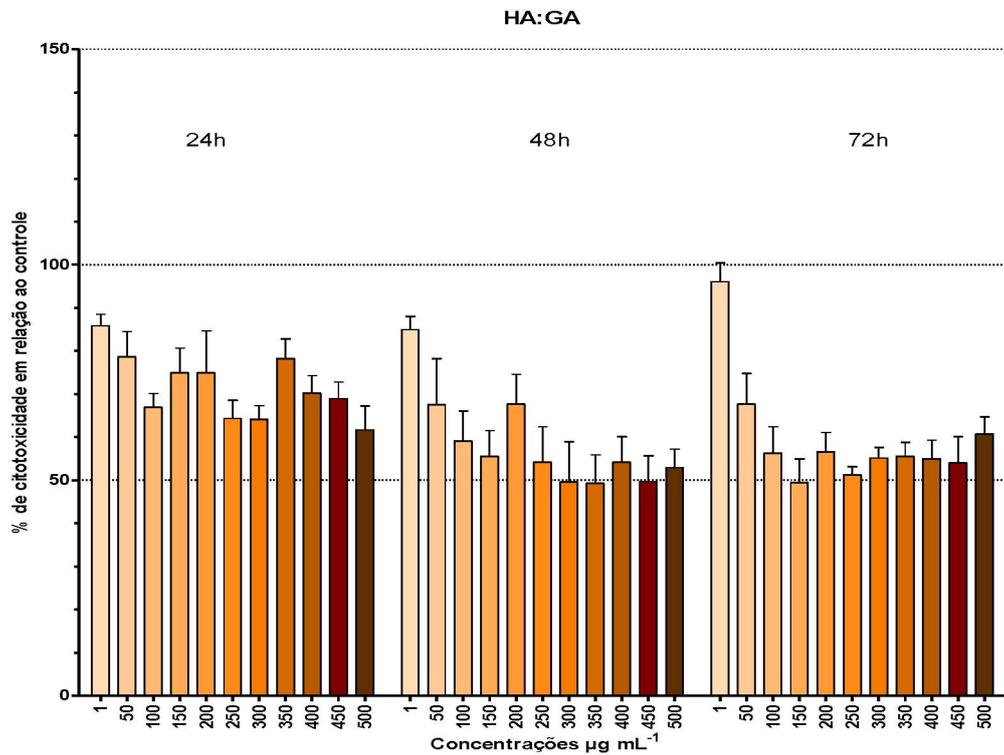


FIGURA S5. EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT, CÉLULAS VERO, PARA A MISTURA DE ÁCIDO HIALURÔNICO E GALACTOMANANA DE GUAR (HA:GG) EM 24, 48 E 72 H. CONCENTRAÇÕES 1 A 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

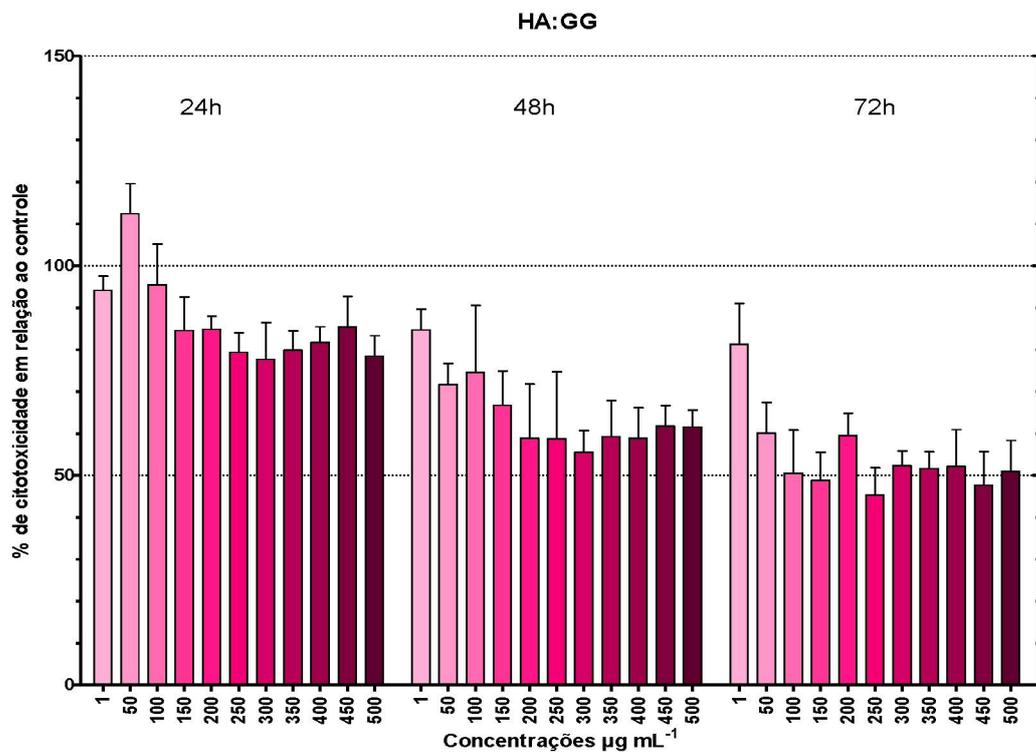


Tabela S1. Dados de porcentagem de citotoxicidade pelo método de MTT para as amostras de HA, HAC, GA, GG isoladas, HA:GA, HA:GG a 50:50 (m/m) e HA:GA+MEL, HA:GG+MEL, para as concentrações de 10 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

		HA		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Citotoxicidade \pm Erro Padrão	24 horas	48 horas	72 horas
10			100,3 \pm 9,6	88,7 \pm 3,9
20		99,1 \pm 7,9	83,8 \pm 4,1	78,7 \pm 3,4
30		95,3 \pm 8,7	86,4 \pm 2,2	82,9 \pm 5,0
40		91,8 \pm 6,1	88,1 \pm 2,9	75,6 \pm 3,4
50		99,6 \pm 7,7	96,3 \pm 5,8	84,4 \pm 3,2

		HAC		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Citotoxicidade \pm Erro Padrão	24 horas	48 horas	72 horas
10			100,2 \pm 9,8	101,2 \pm 2,5
20		89,7 \pm 6,4	96,3 \pm 3,2	97,9 \pm 4,3
30		88,64 \pm 3,8	97,9 \pm 3,9	109,7 \pm 2,5
40		86,9 \pm 3,7	101,7 \pm 3,8	107,7 \pm 2,9
50		93,5 \pm 3,8	114,3 \pm 4,1	105,7 \pm 4,0

		GA		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Citotoxicidade \pm Erro Padrão	24 horas	48 horas	72 horas
10			81,9 \pm 9,6	91,3 \pm 2,0
20		92,5 \pm 11,5	86,1 \pm 5,8	76,9 \pm 4,9
30		89,9 \pm 10,9	79,8 \pm 6,4	64,1 \pm 3,2
40		84,4 \pm 8,2	75,0 \pm 5,8	66,9 \pm 3,5
50		87,8 \pm 8,1	69,2 \pm 3,4	63,3 \pm 3,2

GG

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		24 horas	48 horas	72 horas
10	% Citotoxicidade \pm Erro Padrão	105,6 \pm 8,1	94,7 \pm 3,6	84,1 \pm 5,5
20		102,3 \pm 6,6	87,7 \pm 3,2	74,5 \pm 3,0
30		97,7 \pm 5,8	82,1 \pm 2,6	75,8 \pm 3,6
40		92,3 \pm 5,1	80,2 \pm 2,3	81,6 \pm 2,2
50		96,3 \pm 4,6	85,7 \pm 2,0	91,9 \pm 1,8
10		105,6 \pm 8,1	94,7 \pm 3,6	84,0 \pm 5,5

HA:GA

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		24 horas	48 horas	72 horas
10	% Citotoxicidade \pm Erro Padrão	103,4 \pm 12,7	99,5 \pm 2,4	85,8 \pm 2,5
20		92,1 \pm 5,6	81,9 \pm 2,2	82,3 \pm 2,5
30		94,2 \pm 8,7	76,3 \pm 4,8	71,2 \pm 2,4
40		92,6 \pm 7,8	76,0 \pm 3,1	68,6 \pm 3,2
50		65,6 \pm 5,3	81,0 \pm 3,1	65,6 \pm 2,9

HA:GG

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		24 horas	48 horas	72 horas
10	% Citotoxicidade \pm Erro Padrão	84,3 \pm 7,1	101,2 \pm 2,8	88,3 \pm 3,0
20		81,6 \pm 5,1	85,5 \pm 4,7	79,8 \pm 3,3
30		80,7 \pm 5,7	83,6 \pm 2,5	72,3 \pm 2,6
40		76,9 \pm 5,5	81,7 \pm 3,0	76,3 \pm 1,7
50		82,6 \pm 5,4	91,7 \pm 3,4	78,9 \pm 2,0

HA:GA+MEL

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		24 horas	48 horas	72 horas
10	% Citotoxicidade \pm Erro	91,7 \pm 4,3	78,5 \pm 3,5	82,3 \pm 3,0
20		92,2 \pm 3,1	69,9 \pm 2,7	77,1 \pm 3,2
30		88,5 \pm 3,1	63,2 \pm 3,0	64,6 \pm 2,9
40		85,5 \pm 2,3	61,8 \pm 2,5	57,9 \pm 2,2

50		83,8 ± 2,9	63,2 ± 2,9	59,5 ± 2,0
HA:GG+MEL				
Concentração (µg mL ⁻¹)		24 horas	48 horas	72 horas
10	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	82,0 ± 3,3	100,6 ± 5,2	93,6 ± 2,8
20		78,1 ± 3,2	87,2 ± 4,2	85,2 ± 3,7
30		81,9 ± 3,4	93,4 ± 3,3	86,1 ± 2,6
40		78,2 ± 2,2	90,3 ± 4,4	76,9 ± 3,0
50		81,8 ± 3,4	92,9 ± 5,7	85,6 ± 3,1

Tabela S2. Dados de porcentagem de citotoxicidade pelo método de MTT para as amostras de HA, HAC, GA, GG isoladas, HA:GA, HA:GG a 50:50 (m/m) e HA:GA+MEL, HA:GG+MEL, para as concentrações de 2 a 10 µg mL⁻¹.

HA				
Concentração (µg mL ⁻¹)		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	90,8 ± 4,3	86,4 ± 3,0	85,6 ± 4,2
4		99,5 ± 8,0	91,1 ± 3,3	88,6 ± 4,6
6		97,8 ± 6,3	96,3 ± 4,0	89,5 ± 4,9
8		89,9 ± 5,6	93,8 ± 4,4	85,7 ± 4,1
10		93,8 ± 5,7	90,6 ± 4,0	81,9 ± 4,4

HAC				
Concentração (µg mL ⁻¹)		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	98,9 ± 8,2	96,6 ± 5,0	101,1 ± 4,0
4		88,1 ± 7,6	93,8 ± 4,7	102,6 ± 4,5
6		84,7 ± 7,1	93,0 ± 5,4	99,5 ± 3,9
8		76,4 ± 4,5	88,6 ± 5,3	97,7 ± 5,0
10		78,7 ± 4,3	84,9 ± 4,6	90,9 ± 3,9

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		GA		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	95,8 ± 7,4	99,2 ± 3,7	88,2 ± 4,3
4		93,8 ± 8,7	102,6 ± 5,2	85,2 ± 5,2
6		99,8 ± 12,3	93,1 ± 4,2	83,0 ± 6,0
8		92,5 ± 9,3	99,9 ± 5,1	74,4 ± 3,6
10		99,8 ± 12,5	91,3 ± 5,3	76,2 ± 4,6

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		GG		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	97,3 ± 10,7	88,7 ± 4,7	91,1 ± 3,3
4		86,1 ± 9,4	80,7 ± 4,4	85,2 ± 2,4
6		82,1 ± 7,4	77,6 ± 4,1	81,1 ± 1,8
8		73,4 ± 7,5	73,0 ± 4,4	80,4 ± 3,5
10		74,9 ± 5,6	71,5 ± 3,9	78,8 ± 3,5
10		94,7 ± 5,3	88,9 ± 7,7	81,1 ± 6,1

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		HA:GA		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	92,1 ± 4,5	89,0 ± 2,2	87,5 ± 2,5
4		94,5 ± 6,5	85,7 ± 3,6	80,3 ± 2,6
6		93,3 ± 6,3	86,1 ± 4,9	77,1 ± 3,4
8		92,0 ± 5,0	85,6 ± 5,6	73,7 ± 3,1
10		94,7 ± 5,3	88,9 ± 7,7	81,1 ± 6,1

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		HA:GG		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	98,1 ± 7,4	100,1 ± 3,7	97,9 ± 4,0
4		93,3 ± 6,5	94,3 ± 4,3	88,8 ± 3,0
6		91,4 ± 7,6	89,3 ± 4,1	88,7 ± 4,2
8		88,5 ± 5,4	87,8 ± 4,6	83,4 ± 3,7
10		77,7 ± 3,1	74,9 ± 3,4	85,3 ± 4,0

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		HA:GA+MEL		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	98,2 ± 5,6	93,9 ± 4,1	90,4 ± 4,8
4		94,5 ± 6,6	88,1 ± 4,4	88,5 ± 5,5
6		90,8 ± 6,1	84,7 ± 3,7	77,1 ± 3,4
8		95,0 ± 7,0	87,8 ± 5,8	77,4 ± 2,7
10		85,9 ± 4,6	80,3 ± 4,4	78,5 ± 2,6

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		HA:GG+MEL		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Citotoxicidade ± Erro Padrão	103,4 ± 4,9	93,4 ± 3,4	97,9 ± 4,4
4		95,4 ± 4,8	91,1 ± 3,3	84,8 ± 1,4
6		89,8 ± 4,1	86,6 ± 3,9	91,7 ± 5,8
8		86,1 ± 4,9	77,7 ± 2,7	78,4 ± 2,6
10		79,6 ± 2,5	76,9 ± 2,9	77,9 ± 3,4

Tabela S3. Dados de proliferação celular pelo método CV para as amostras de HA, HAC, GA, GG isoladas, HA:GA, HA:GG a 50:50 (m/m) e HA:GA+MEL, HA:GG+MEL, para as concentrações de 2 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		HA		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Quantidade de células ± Erro Padrão	5144,98 ± 805,78	11895,83 ± 188,47	16809,52 ± 1013,36
4		4761,60 ± 887,58	11749,57 ± 236,52	15955,78 ± 690,36
6		5655,18 ± 828,34	11504,67 ± 267,61	15642,86 ± 588,69
8		5519,13 ± 892,75	11667,94 ± 404,55	15673,47 ± 840,11
10		5185,80 ± 851,46	12045,49 ± 317,37	16034,01 ± 776,24
20		5692,60 ± 828,80	12096,51 ± 413,86	16010,20 ± 635,08
30		5719,81 ± 832,82	12103,31 ± 431,59	15785,71 ± 828,87
40		5583,76 ± 720,28	11603,32 ± 393,95	16129,25 ± 639,27
50		5675,59 ± 71,11	11446,85 ± 298,27	15717,69 ± 612,66

HAC

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		HAC		
		24 horas	48 horas	72 horas
0	% Quantidade de células \pm Erro Padrão	5082,05 \pm 697,95	17345,80 \pm 2015,54	15948,55 \pm 851,68
4		5595,66 \pm 836,64	17519,27 \pm 195,39	15849,91 \pm 917,95
6		5792,94 \pm 818,51	18876,42 \pm 2375,53	16421,34 \pm 893,35
8		5599,06 \pm 942,70	17308,39 \pm 1711,56	16128,82 \pm 867,04
10		5565,05 \pm 899,33	16611,11 \pm 1567,51	16513,18 \pm 971,77
20		5357,57 \pm 844,59	17151,92 \pm 1664,92	16431,54 \pm 931,13
30		5680,69 \pm 998,76	17046,48 \pm 1649,49	16805,69 \pm 941,61
40		5670,49 \pm 936,81	18148,52 \pm 2007,66	16724,06 \pm 1022,38
50		5911,99 \pm 902,29	18600,91 \pm 224,76	16258,07 \pm 834,81

GA

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		GA		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Quantidade de células \pm Erro Padrão	6113,95 \pm 822,62	14090,56 \pm 394,72	15829,51 \pm 536,83
4		6494,89 \pm 691,32	14495,32 \pm 386,31	16077,80 \pm 656,19
6		6464,26 \pm 784,52	14376,27 \pm 585,11	16009,77 \pm 622,46
8		6559,52 \pm 726,56	14359,26 \pm 384,98	15628,82 \pm 543,93
10		6869,04 \pm 827,50	14587,16 \pm 492,54	15553,99 \pm 744,16
20		6375,85 \pm 761,53	14274,23 \pm 373,28	15438,35 \pm 529,72
30		6804,42 \pm 793,87	14287,84 \pm 275,87	15826,10 \pm 548,71
40		6494,89 \pm 624,13	14080,35 \pm 397,01	16513,18 \pm 297,89
50		6801,02 \pm 711,01	14144,98 \pm 223,25	14159,43 \pm 876,15

GG

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Quantidade de células \pm Erro Padrão	4316,75 \pm 942,62	13245,32 \pm 270,74	16911,98 \pm 1055,11
4		4656,89 \pm 946,82	13541,24 \pm 318,77	16497,02 \pm 1105,36
6		4925,59 \pm 923,21	13755,53 \pm 291,98	16718,11 \pm 1176,43
8		4347,36 \pm 986,39	13568,45 \pm 271,05	16762,32 \pm 1022,36
10		4582,05 \pm 1019,16	13925,59 \pm 393,61	16565,05 \pm 998,95
20		5796,34 \pm 1059,17	13820,15 \pm 277,48	16911,99 \pm 978,99
30		7187,49 \pm 1201,78	13966,41 \pm 34,91	16928,99 \pm 1071,04
40		5578,65 \pm 1004,04	13612,67 \pm 464,55	17275,93 \pm 1238,65
50		5964,84 \pm 1006,78	13803,14 \pm 384,09	16721,51 \pm 906,47

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		HA:GA		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Quantidade de células \pm Erro Padrão	5842,17 \pm 1058,79	13624,15 \pm 410,91	16386,90 \pm 908,32
4		5985,54 \pm 876,774	13386,05 \pm 292,37	16652,21 \pm 1046,57
6		6227,04 \pm 827,774	13481,29 \pm 289,51	16805,27 \pm 987,33
8		6410,71 \pm 963,731	13301,02 \pm 497,82	16597,78 \pm 1074,4
10		6186,22 \pm 1031,04	13770,41 \pm 366,01	16274,65 \pm 779,26
20		6519,55 \pm 921,87	14267,00 \pm 341,33	16903,91 \pm 860,73
30		6244,05 \pm 845,28	13647,96 \pm 331,13	16448,13 \pm 859,25
40		6250,85 \pm 927,62	13501,70 \pm 319,73	16230,44 \pm 691,28
50		6162,41 \pm 962,09	14124,15 \pm 291,13	16261,05 \pm 764,20

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		HA:GG		
		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Quantidade de células \pm Erro Padrão	6190,90 \pm 900,99	13386,48 \pm 545,47	16878,83 \pm 938,63
4		7425,59 \pm 923,79	13791,24 \pm 187,65	16593,11 \pm 1106,52
6		7398,38 \pm 934,79	14110,97 \pm 380,52	16184,95 \pm 1014,80
8		7299,74 \pm 1046,60	13648,38 \pm 274,09	16525,08 \pm 1035,87
10		6377,97 \pm 993,66	13964,71 \pm 189,78	16120,33 \pm 1028,64
20		6847,36 \pm 810,60	14182,40 \pm 485,26	16348,21 \pm 1028,64
30		7024,23 \pm 994,30	14042,94 \pm 264,079	15620,32 \pm 1093,36
40		6303,15 \pm 697,43	13682,39 \pm 184,92	15518,28 \pm 903,32
50		6738,52 \pm 808,52	13423,84 \pm 144,38	15746,17 \pm 992,58

HA:GA+MEL				
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Quantidade de células \pm Erro Padrão	6262,75 \pm 837,74	14210,03 \pm 642,06	20156,88 \pm 2283,17
4		6531,46 \pm 804,26	14288,26 \pm 392,55	19609,27 \pm 2099,89
6		6528,06 \pm 694,99	14155,61 \pm 358,56	19561,64 \pm 2353,73
8		6538,27 \pm 779,76	14176,02 \pm 399,08	20697,70 \pm 2393,27
10		6779,76 \pm 802,88	14584,18 \pm 566,38	19721,51 \pm 2288,11
20		6453,23 \pm 875,85	14448,13 \pm 301,38	20051,44 \pm 2337,16
30		7126,70 \pm 805,15	15155,61 \pm 405,39	19908,58 \pm 2300,04
40		6480,44 \pm 886,18	15104,59 \pm 336,66	20411,99 \pm 2391,89
50		6936,22 \pm 850,78	14325,68 \pm 624,24	20663,69 \pm 2243,43

HA:GG+MEL				
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		24 horas	48 horas	72 horas
2	% Quantidade de células \pm Erro Padrão	6260,63 \pm 919,31	13409,44 \pm 524,73	17586,73 \pm 1320,84
4		6464,71 \pm 834,67	14783,59 \pm 475,78	17875,85 \pm 1682,03
6		6478,31 \pm 948,39	14436,65 \pm 468,67	17692,18 \pm 1573,95
8		6369,47 \pm 956,17	14712,16 \pm 567,98	18113,94 \pm 1632,12
10		6607,57 \pm 998,62	14273,38 \pm 528,53	18100,34 \pm 1683,61
20		5896,68 \pm 857,97	14477,46 \pm 505,62	18151,36 \pm 1920,86
30		6019,13 \pm 886,23	14133,93 \pm 768,34	18627,55 \pm 1675,68
40		6281,04 \pm 844,23	14984,27 \pm 772,25	18437,08 \pm 1807,34
50		6165,39 \pm 895,55	14783,59 \pm 704,59	19195,58 \pm 2159,05