



REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – CETEC – UEMG

Dissertação de Mestrado



"Estudo do efeito da hidroxiuréia no mecanismo de gelatinização das suspensões de colágeno e de hemoglobina."

Autora: Ellen Denise Lopes Alves

Orientador: Prof. Antônio Valadão Cardoso



Junho de 2014



REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – CETEC – UEMG

Ellen Denise Lopes Alves

"Estudo do efeito da hidroxiuréia no mecanismo de gelatinização das suspensões de colágeno e de hemoglobina."

Proposta de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da REDEMAT, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Análise e seleção de materiais

Orientador: Prof. Antônio Valadão Cardoso

Belo Horizonte, Junho de 2014.

A474e

Alves, Ellen Denise Lopes.

Estudo do efeito da hidroxiuréia no mecanismo de gelatinização das suspensões de colágeno e de hemoglobina [manuscrito] / Ellen Denise Lopes Alves. – 2014. 122f.: il. color.; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Valadão Cardoso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Minas. Rede Temática em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Análise e seleção de materiais.

1. Colágeno - Teses. 2. Hemoglobina - Teses. 3. Polimerização. 4. Anemia falciforme I. Cardoso, Antônio Valadão. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.155.194

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

A474e Alves, Ellen Denise Lopes.

Estudo do efeito da hidroxirúria no mecanismo de gelatinização das suspensões de colágeno e de hemoglobina [manuscrito] / Ellen Denise Lopes Alves. – 2014.

122f.: il. color.; grafs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Valadão Cardoso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Minas. Rede Temática em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Análise e seleção de materiais.

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS
UFOP - CETEC - UEMG
Pós-Graduação em Engenharia de Materiais



DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que **Ellen Denise Lopes Alves**, apresentou, e obteve aprovação, na defesa de sua dissertação intitulada **“Estudo do efeito da Hidroxiuréia no Mecanismo de Gelatinização das Suspensões de Colágeno e Hemoglobina”**, no dia 30/06/2014, conforme ata em anexo, fazendo jus ao título de **Mestre em Engenharia de Materiais**.

Ouro Preto, 14 de agosto de 2014.


Ana Maria de Souza Alves e Silva
Secretária do Programa de Pós-
Graduação em Eng^o de Materiais-
REDEMAT/UFOP


Documento Válido Somente
Com Carimbo em Alto-Relevo

Agradecimentos

À Deus pela força e por guiar meus passos;

à minha mãe, minha estrela maior, pelo apoio incondicional e por nunca deixar de acreditar em mim;

minha família e amigos pelo incentivo;

ao Professor Antônio Valadão pela orientação, oportunidade e paciência dedicada;

aos colegas do CETEC pelos ensinamentos e ajuda ao decorrer de todos os anos da minha vida acadêmica;

aos colegas do CBEIH pela convivência e apoio;

aos meus mestres Moisés Perillo e Adriane Gruber (minha eterna professora) pelo apoio;

aos essenciais: Rodrigo (meu irmão, meu exemplo), Rangel, Igor, minhas “Marys”, Willian, Rafa (por sempre acreditar), Lalá e Naka;

à REDEMAT e CAPES pelo suporte financeiro.

Muito obrigada!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	2
2.1 OBJETIVO GERAL	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 O SANGUE	3
3.1.1 <i>Anemia falciforme</i>	5
3.1.2 <i>Polimerização da hemoglobina falciforme</i>	9
3.2 HIDROXIURÉIA	12
3.3 AGENTES GELIFICANTES	13
3.3.1 <i>Colágeno</i>	14
3.4 AGENTE RETICULADOR	19
3.4.1 <i>Glutaraldeído</i>	19
3.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	20
3.5.1 <i>Espectroscopia ultravioleta-visível</i>	20
3.5.1.1 O espectrofotômetro	22
3.5.2 <i>Microscopia ótica</i>	23
3.5.3 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	24
3.5.4 <i>Calorimetria exploratória diferencial – Método StepScan</i>	28
3.5.4.1 StepScan	30
3.6 REOLOGIA	31
3.6.1 <i>Lei de Newton da Viscosidade</i>	33
3.6.2 <i>Tipos de fluido</i>	34
3.6.3 <i>Limite de escoamento ou tensão de cedência</i>	36
3.6.4 <i>Utilização do sensor de cisalhamento Vane</i>	36
4. PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1 SELEÇÃO E PREPARO DOS GÉIS	40
4.1.1 <i>Gel de colágeno</i>	40

4.1.2	<i>Gel de hemoglobina</i>	42
4.2	ENSAIO DE ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO UV-VIS	43
4.3	ENSAIO DE MICROSCOPIA ÓTICA	44
4.4	ENSAIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	44
4.4.1	<i>Preparo das amostras</i>	44
4.5	ENSAIOS REOLÓGICOS	45
4.5.1	<i>Rêometro R/S</i>	45
4.5.2	<i>Viscosímetro do tipo cone placa</i>	47
4.6	ENSAIO DE PERDA DE MASSA	47
4.7	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	ENSAIO DE ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO UV-VIS- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SOBRENADANTE RETIRADO.DOS GÉIS.	49
5.2	MICROSCOPIA ÓTICA	51
5.2.1	<i>Gel de colágeno</i>	51
5.2.2	<i>Géis de hemoglobina bovina e suína</i>	52
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	58
5.3.1	<i>Géis com concentração de colágeno igual à 6,7.</i>	58
5.3.2	<i>Géis de colágeno 2,2%</i>	60
5.3.3	<i>Géis de hemoglobina bovina</i>	62
5.3.4	<i>Géis de hemoglobina suína</i>	64
5.4	REOLOGIA DOS GÉIS EM FUNÇÃO DO TEMPO	67
5.4.1	<i>Resultados a partir do reômetro</i>	67
5.4.1.1	Ensaio realizado após 24 horas	67
5.4.1.2	Ensaio realizado após 5 dias.....	69
5.4.2	<i>Resultados a partir do viscosímetro – Fase sol</i>	71
5.4.2.1	Ensaio realizado após 30 horas da preparação da amostra.....	71
5.4.2.2	Ensaio realizado após 40 horas da preparação da amostra.....	72
5.4.2.3	Ensaio realizado após 54 horas da preparação da amostra.....	73
5.4.3	<i>Ensaio com as amostras Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU)</i>	74
5.4.3.1	Ensaio realizado 24 horas depois preparação da amostra	74
5.4.3.2	Ensaio realizado após 30 horas da preparação dos géis	75

5.4.3.3	Ensaio realizado após 40 horas da preparação dos géis	76
5.4.3.4	Ensaio realizado após 54 horas da preparação do géis	76
5.4.4	<i>Perda de massa</i>	77
5.5	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL	79
5.5.1	<i>Géis de colágeno 6,7%</i>	79
5.5.2	<i>Géis de colágeno 2,2%</i>	80
5.5.2.1	Ensaio após 06 horas da preparação dos géis.....	80
5.5.2.2	Ensaio após 30 horas da preparação dos géis.....	80
5.5.2.3	Ensaio após 54 horas da preparação dos géis.....	81
5.5.2.4	Comparando os géis	82
5.5.3	<i>Gel 6,7% e gel 2,2%</i>	86
5.5.4	<i>Géis de hemoglobina bovina</i>	87
5.5.5	<i>Géis de hemoglobina suína</i>	88
5.5.6	<i>Diferença entre os géis de hemoglobina bovina e suína</i>	89
5.5.7	<i>Géis de colágeno e géis de hemoglobinas</i>	90
6.	CONCLUSÕES	92
7.	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	93
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
9.	PUBLICAÇÕES DO AUTOR	103

Lista de Figuras

Figura 3-1 – Desenho do vaso sanguíneo com os eritrócitos e a hemoglobina..	3
Figura 3-2 – Imagens do eritrócito normal feitas por microscopia de força atômica (AFM) exibindo em (a) sua topografia e (b) o detalhe da textura da superfície da membrana.....	4
Figura 3-3 - Estrutura molecular da hemoglobina – (a) Proteína sem seu grupo prostético, apoproteína. (b) Representação de uma globina com seu grupo proteico, heme.	5
Figura 3-4 - Imagem de MEV de eritrócitos do sangue de paciente com anemia falciforme. Presença de eritrócitos normais (a), falciformes (b) e em estágio de hemólise – em destruição por rompimento da membrana plasmática (c). .	6
Figura 3-5 - Polimerização das moléculas de desoxiHbS.....	8
Figura 3-6 - Eritrócitos falciformes nos vasos sanguíneos e suas consequências.....	9
Figura 3-7 - Alteração da membrana do eritrócito por polímeros de HbS.....	10
Figura 3-8 - Mecanismo de nucleação dupla da polimerização da desoxiHbS.....	11
Figura 3-9 - Classificação do géis de acordo com origem, meio, composição e tipo de ligações cruzadas.....	14
Figura 3-10 - Hierarquia do modelo de tendão com diversos níveis de organização e os respectivos meios de análise possíveis em determinada escala: DSC (calorimetria diferencial exploratória), MET (microscópio eletrônico de transmissão), MEV (microscópio eletrônico de varredura) e MO (microscópio ótico).....	15
Figura 3-11 – Desenho da hélice alfa – α - (A, B, e C) e a folha beta – β - (D, E, e F). Em (A) e (D) estão representados todos os átomos da estrutura do polipeptídio, onde as cadeias laterais de aminoácidos são indicadas por R. Em (B) e (E) estão representado os átomos em estrutura única, enquanto que (C) e (F) exibem os símbolos de estenografia que são usados para representar a hélice α e a fita β de proteínas.....	16
Figura 3-12 - Representação esquemática do arranjo molecular do tropocolágeno em estruturas fibrilares e fibras.....	18
Figura 3-13 - Cadeia molecular de glutaraldeído.....	19
Figura 3-14 -Reticulações intermoleculares do glutaraldeído nos tetrâmeros da hemoglobina e consequente polimerização.	20
Figura 3-15 – Absorção da luz pelas cores..	21
Figura 3-16 - Principais componentes do espectrofotômetro.....	22

Figura 3-17 - Partes de um microscópio ótico. Adaptado de MURPHY ^[48] .	23
Figura 3-18 – Esquema da obtenção e percepção da imagem pelo microscópio ótico. Adaptado de MURPHY ^[48] .	24
Figura 3-19 - Diagrama da coluna de MEV mostrando seus componentes em detalhe. Adaptado de Bozzola ^[51] .	25
Figura 3-20- O MEV e a interação dos elétrons com a amostra. Adaptado de KAECH ^[52] .	26
Figura 3-21 - Interação de elétrons com a amostra e a profundidade atingida por cada tipo de feixe. Adaptado de HAFNER ^[53] .	27
Figura 3-22 - Desenho esquemático do DSC por compensação de potência exibindo os fornos e os sensores. Adaptado de MENCZEL AND PRIME ^[55] .	28
Figura 3-23 - Curva típica de DSC exibindo picos e degraus característicos de transições de fase. Transição vítrea, representado por T _g , é caracterizada por um degrau. O pico endotérmico, T _m , apresenta a temperatura de fusão. O pico exotérmico, T _c , caracteriza a temperatura de cristalização. Adaptado de RAMOS ^[56] .	29
Figura 3-24 – Curvas de DSC normal e TMDSC da Isotropização de cristais líquidos nemáticos. Adaptado de WUNDERLICH & BOLLER <i>et al.</i> ^[59] .	30
Figura 3-25 - Gráfico da curva típica do método StepScan. Adaptado por LAPPALAINEN ^[60] .	31
Figura 3-26 - Movimento das partículas o fluxo de cisalhamento ou fluxo extensional. Adaptado de BARNES ^[63] .	32
Figura 3-27 - Modelo apresentando camadas hipotéticas para ilustrar o fluxo de cisalhamento. Adaptado de BARNES ^[63] .	33
Figura 3-28 - Representação esquemática do escoamento de Couette entre duas placas paralelas. Adaptado de SANTOS ^[65] .	34
Figura 3-29 - Gráfico representa os tipos de fluidos de acordo com seu comportamento ^[65] .	35
Figura 3-30 - Representação gráfica da definição do limite de escoamento nos materiais. Adaptado de Barnes ^[67] .	36
Figura 3-31 – Sensor de cisalhamento Vane. ^[68] .	37
Figura 4-1 - Esquema de preparo dos géis a partir das fibras de colágeno tipo I .	41
Figura 4-2 - Quadro esquemático da preparação de géis de hemoglobinas bovina e suína.	43
Figura 4-3 - Microscópio ótico.....	44
Figura 4-4 - Microscópio eletrônico de varredura usado para os ensaios.....	45

Figura 4-5 - Reômetro rotacional de cilindros concêntricos.....	46
Figura 4-6 - Desenho do Sensor de cisalhamento Vane com quatro lâminas e sua disposição no copo de amostra (a) e as fotos do Sensor de cisalhamento Vane e copo utilizados (b, c).....	46
Figura 4-7 - Viscosímetro cone placa da Brookfield modelo DVII.....	47
Figura 4-8- Montagem do sistema de análise térmica com (a) aparelho DSC e intracooler e (b) cadinho de alumínio usado nos ensaios.....	48
Figura 5-1 - Curva analítica das amostras de géis de colágeno construída de acordo com a resposta do espectrofotômetro.....	50
Figura 5-2 – Imagens obtidas por microscopia ótica com aumento de 10x de gel de colágeno (a e b) e gel de colágeno da parte sobrenadante (c e d) com corante Comassie Blue G. .	51
Figura 5-3- Imagens obtidas por microscopia ótica de gel de hemoglobina bovina (HVn1) em solução de glutaraldeído 1% com um aumento de 10x em quatro pontos distintos.....	52
Figura 5-4 - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina bovina (HVn2) em solução de glutaraldeído 1% e 20mg/ml de HU, com um aumento de 10x em quatro pontos distintos.....	53
Figura 5-5. - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina bovina (HVn3) em solução de glutaraldeído 1% e 40mg/ml de HU, com aumento de 10x em quatro pontos distintos.....	54
Figura 5-6 - Comparação dos géis de hemoglobina bovina sem HU - HVn1(a), com concentração de HU de 20mg/mL – HVn2(b) e com concentração de HU de 40mg/mL – HVn3(c), ilustrando as alterações em resposta à adição de HU.....	55
Figura 5-7 - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina suína (HSn1) em solução de glutaraldeído 1% com um aumento de 10x em quatro pontos distintos.....	55
Figura 5-8 - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina suína (HSn2) em solução de glutaraldeído 1% e com 20mg/ml de HU, com aumento de 10x em quatro pontos distintos.....	56
Figura 5-9 - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina suína (HSn3) em solução de glutaraldeído 1% e 40mg/ml de HU, aumento de 10x em quatro pontos distintos.	57
Figura 5-10 - Comparação dos géis de hemoglobina suína sem HU (a) com HU (b) e com concentração de HU duplicada (c) ilustrando efeito da adição de HU em sua estrutura.	57

Figura 5-11 - Imagem obtida pelo MEV do gel de colágeno 6,7% mostrando a microestrutura dos géis onde A na há adição de HU (C1), B há adição de HU em uma concentração de 20mg/mL (C2) e C uma concentração de 40mg/mL	59
Figura 5-12 - Imagem obtida pelo MEV do gel de colágeno 2,2% onde a letra A apresenta o gel Cs1 (sem HU), a letra B apresenta o gel Cs4 (concentração de HU igual à 20mg/mL) e a letra C apresenta o gel Cs5 (com concentração de HU igual á 40mg/mL).....	61
Figura 5-13 - Imagem obtida pelo MEV do gel de hemoglobina bovina onde a letra A apresenta o gel HVn1 (sem HU), a letra B apresenta o gel HVn2 (com concentração de HU igual à 20mg/mL) e a letra C apresenta o gel HVn3 (com concentração de HU igual á 40mg/mL).....	63
Figura 5-14 - Imagem obtida pelo MEV do gel de hemoglobina suína onde a letra A apresenta o gel HSn1 (sem HU), a letra B apresenta o gel HSn2(com concentração de HU igual à 20mg/mL) e a letra C apresenta o gel HSn3 (com concentração de HU igual á 40mg/mL).....	65
Figura 5-15 – Estruturas de gel ^[78] (a) e de sólido poroso ^[79] (b).....	66
Figura 5-16 - Gráfico de tensão <i>versus</i> deformação dos géis Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).....	68
Figura 5-17 - Gráfico de tensão <i>versus</i> tempo dos géis Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).....	68
Figura 5-18 - Gráfico de tensão <i>versus</i> deformação dos géis Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).....	69
Figura 5-19 - Gráfico de tensão <i>versus</i> deformação dos géis sem HU avaliados em dias distintos.	70
Figura 5-20 – Gráfico de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).....	71
Figura 5-21 - Gráfico de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).....	72
Figura 5-22 - Gráfico de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).....	73
Figura 5-23 - Gráfico de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).....	74

Figura 5-24 - Gráfico da viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20 mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) 24 horas após a preparação.	75
Figura 5-25 - Gráfico da viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20 mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) 30 horas após a preparação.	75
Figura 5-26 - Gráfico da viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20 mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) 40 horas após a preparação.	76
Figura 5-27 - Gráfico de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) 54 horas após a preparação.	77
Figura 5-28 – Gráfico da perda de massa pelas amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49mg/mL de HU) e Cs3 (0,98mg/mL) durante os ensaios.	78
Figura 5-29 - Calor específico <i>versus</i> temperatura pelo método StepScan em géis de colágeno 6,7% C1 (sem HU), C2 (20mg/mL) e C3 (40mg/mL).	79
Figura 5-30 - Gráfico do calor específico <i>versus</i> temperatura dos géis Cs1 (sem HU) e Cs4 (20mg/mL de HU) após 06 horas da preparação dos géis.	80
Figura 5-31 - Gráfico do calor específico <i>versus</i> temperatura dos géis Cs1 (sem HU) e Cs4 (20mg/mL de HU) após 30 horas da preparação dos géis.	81
Figura 5-32 - Gráfico do calor específico <i>versus</i> temperatura dos géis Cs1 (sem HU) e Cs4 (20mg/mL de HU) após 54 horas da preparação dos géis.	82
Figura 5-33 - Gráfico calor específico <i>versus</i> temperatura do gel Cs1 (sem HU) de acordo com os tempos de vida.	83
Figura 5-34 - Gráfico calor específico <i>versus</i> temperatura do gel Cs4 (20mg/mL de HU) de acordo com os tempos de vida.	84
Figura 5-35 - Gráfico calor específico <i>versus</i> temperatura dos géis Cs1 (sem HU), Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU).	85
Figura 5-36 - Calor específico <i>versus</i> temperatura pelo método StepScan DSC em géis de colágeno 2,2% sem HU (Cs1), com 20mg/mL HU (Cs4) e com 40mg/mL de HU (Cs5).	86
Figura 5-37 - Calor específico <i>versus</i> temperatura pelo método StepScan DSC indicando as diferenças entre o gel de colágeno 6,7% (C1) e o gel 2,2% (Cs1).	87
Figura 5-38 - Calor específico <i>versus</i> temperatura através do método StepScan DSC de géis de hemoglobina bovina obtidos em solução de glutaraldeído 1% sem HU (HVn1), com	

concentração de HU de 20mg/mL(HVn2) e com concentração de HU de 40mg/mL(HVn3).....	88
Figura 5-39 - Calor específico <i>versus</i> temperatura através do método StepScan DSC de géis de hemoglobina suína obtidos em solução de glutaraldeído 1% sem HU (HSn1), com concentração de HU de 20mg/mL (HSn2) e com concentração de HU de 40mg/mL (HSn3).	89
Figura 5-40 - Calor específico <i>versus</i> temperatura pelo método StepScan DSC demonstrando as diferenças entre os géis de hemoglobinas bovina e suína.....	90
Figura 5-41 - Calor específico <i>versus</i> temperatura através do método StepScan DSC de géis de colágeno 6,7% (C1) e 2,2% (Cs1), géis de hemoglobina bovina (HVn1) e suína (HSn1) em solução de glutaraldeído 1%.....	91
Figura 9-1 - Pôster apresentado no XII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais – SBPMat ^[56]	103
Figura 9-2 - Carta convite para apresentação no VII Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme.	104

Lista de tabelas

Tabela 3-1 – Ordem cronológica das descobertas patológicas e clínicas ligadas à anemia falciforme. Adaptado de RESS <i>et al.</i> ^[14]	7
Tabela 3-2 - Quantidade de aminoácidos presentes no colágeno (Adaptado de Park & Lakes ⁴³)	17
Tabela 3-3. Frequência, comprimento de onda e energia de radiação de parte do espectro eletromagnético usado para o espectrofotômetro ultravioleta/visível.....	21
Tabela 3-4 - Comparação das vantagens e limitações do uso do Sensor de cisalhamento Vane ^[64]	38
Tabela 4-1 - Identificação dos géis	42
Tabela 4-2 - Identificação dos géis com apresentação dos seus respectivos códigos e suas descrições.	42
Tabela 5-1 – Valores de absorvância no comprimento de onda 545nm para os padrões em concentrações distintas	49

Lista de siglas e abreviações

μ_{app} – viscosidade aparente

σ – tensão de cisalhamento

γ – deformação

$\dot{\gamma}$ – taxa de cisalhamento

η - Viscosidade

AAS – Ácido Acetilsalicílico

AF – Anemia Falciforme

AFM – Microscopia de força atômica

DesoxiHbA – hemoglobina normal desoxigenada

DesoxiHbS – hemoglobina falciforme desoxigenada

DSC - Calorimetria diferencial exploratória

\vec{F}_c – força de cisalhamento

GTA - Glutaraldeído

HbA – Hemoglobina normal

HbS – Hemoglobina falciforme

HbF – Hemoglobina fetal

HBOCs - hemoglobin-based oxygen carriers

HU – Hidroxiuréia

ME– Microscópio eletrônico

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

MO – Microscópio ótico

OxiHbA– hemoglobina normal oxigenada

OxiHbS – hemoglobina falciforme oxigenada

PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal

SI – Sistema Internacional de Unidades

t_a – tempo de atraso

Tg – Transição vítrea

TMDSC – Calorimetria exploratória diferencial com temperatura modulada

Resumo

A hidroxiuréia, antineoplásico potente usado no tratamento de vários tipos de câncer e na síndrome da imunodeficiência adquirida, é um inibidor eficiente na síntese de DNA de células humanas e bacterianas, e também é considerada a principal droga ministrada em pacientes com anemia falciforme.

A anemia falciforme é consequência da polimerização da hemoglobina mutante - no seu estado desoxigenado - gerando fibras nanométricas que provocam a gelificação da suspensão de hemoglobina, causando um fenômeno chamado afoçamento dos eritrócitos do sangue. A hidroxiuréia age na anemia falciforme causando uma diminuição da expressão das moléculas de adesão, aumento da concentração da produção de óxido nítrico e de hemoglobina fetal.

A hipótese de estudo deste trabalho baseia-se no fato da hidroxiuréia apresentar um efeito anti-gelificante, dissolve o gel de hemoglobina falciforme, e diminui, portanto, o risco de vaso-oclusão. Para investigar a ação de anti-coagulação da hidroxiuréia foi utilizado o colágeno bovino e hemoglobinas liofilizadas comerciais reticuladas em glutaraldeído em suspensão.

As técnicas utilizadas para neste trabalho foram microscopia ótica e eletrônica de varredura, análises térmicas por DSC, reológicas e fotométricas. As imagens obtidas pela microscopia apresentam diferenças estruturais entre os géis à medida que a hidroxiuréia é adicionada, resultados estes que corroboram com os ensaios reométricos e de viscosidade. O método de temperatura modulada do DSC chamado StepScan forneceu características térmicas do comportamento das amostras baseado na mudança de capacidade térmica dos géis sob a adição de hidroxiuréia.

Através dos resultados experimentais pôde-se inferir que a adição de hidroxiuréia influencia no processo de gelificação dos géis estudados, portanto, hipoteticamente, possa ter efeito na polimerização de hemoglobina falciforme nos casos de pacientes com anemia falciforme.

Palavras-chave: Colágeno; hemoglobina; polimerização; anemia falciforme; StepScan; hidroxiuréia.

Abstract

The hydroxyurea, antineoplastic used in the treatment of variety of cancer and in the acquired immune deficiency syndrome. It is efficient inhibitor blocking DNA synthesis in both human and bacterial cells. The hydroxyurea is considered the main drug for sickle cell anemia that is a haemoglobinopathy.

The sickle cell anemia is caused for the polymerization of the mutant hemoglobin – in its deoxygenated state – generates nanometric fibers which causes the gelification of the hemoglobin-serum suspension, a phenomenon called sickling of the red blood cell. The hydroxyurea acts in sickle cell anemia causing a decrease in the expression of adhesion molecules, increasing the concentration of nitric oxide and fetal hemoglobin.

The research hypothesis of this study is based in the hypothesis that HU has an anti-gelling effect, dissolving the sickle hemoglobin gel, and decreasing the vascular occlusion risk. To investigate the anti-gelling action of HU we used bovine collagen type I and lyophilized commercial hemoglobins crosslinked with glutaraldehyde as suspension.

The techniques used in this study were optical and scanning electron microscopy, thermal analysis by DSC and rheological. The microscopy show structural differences between gels when hydroxyurea is added, these results corroborated with rheometer and viscosimeter assays. The method of temperature-modulated DSC called StepScan gave characteristics of the behavior of the samples based on the change in heat capacity of the gels on the addition of hydroxyurea.

Through the experimental results it can be inferred that the addition of hydroxyurea influence the gelation of the gels studied therefore hypothesized process can has effect in the polymerization of sickle hemoglobin in cases of sickle cell anemia patients.

Keywords: Collagen; hemoglobin; polymerization; sickle cell anemia; StepScan; hydroxyurea.

1. Introdução

A hidroxiuréia (HU) é a principal droga ministrada no tratamento da anemia falciforme, cuja ação se dá diretamente na divisão celular. A anemia falciforme é uma doença do sangue na qual os eritrócitos se encontram em forma de “foice”^[1] devido uma mutação genética da hemoglobina (HbS)^[2]. Essa mutação, ocasionada pela mudança de um único aminoácido, causa a polimerização intracelular da HbS quando em seu estado desoxigenado, e conseqüentemente a falcização dos eritrócitos. A perda da maleabilidade, característica da suspensão de hemoglobina normal (HbA), causada pela falcização, compromete o fluxo sanguíneo e fornecimento de oxigênio, acarretando em episódios de dor e danos em alguns órgãos^[3]. Dados do Ministério da Saúde pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), o teste do pezinho, apontam que 3500 crianças nascem com a doença por ano e cerca de 200 mil apresentam o traço falciforme, ou seja, possuem apenas um gene da doença e não desenvolvem seus sintomas característicos^[4]. Estudos anteriores reportaram o efeito da HU como o aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF), e por sua vez, a melhoria dos sintomas^[5]. Além dessa finalidade existe a possibilidade da HU ter efeito direto no polímero formado pela HbS.

A hipótese de que a HU dispersaria o gel que caracteriza a anemia falciforme defendida nesse trabalho foi avaliada em géis de colágeno e hemoglobinas bovinas e suínas comerciais liofilizadas.

O colágeno é uma proteína fibrosa presente na pele, ossos, cartilagens e tecidos conjuntivos. É considerado como biomaterial de ampla utilidade no ramo industrial e na medicina por apresentar inúmeras vantagens, dentre elas, disponibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e maleabilidade. O colágeno tipo I, utilizado nesse trabalho, forma géis de mesma natureza que os géis de HbS desoxigenada.

As hemoglobinas bovina e suína liofilizadas utilizadas não formam géis por interações intermoleculares como os géis de colágeno. Para gelificarem foi necessário o uso de um agente reticulador e para tal finalidade foi utilizado o glutaraldeído.

Técnicas de microscopia ótica e eletrônica foram utilizadas para observar o suposto efeito da HU na microestrutura dos géis; ensaios reométricos para investigar o comportamento mecânico com o tempo, análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) para avaliar as propriedades térmicas e espectroscopia para determinar a composições.

O estudo de diferentes técnicas de análise para variados tipos de géis pode gerar metodologias para futuros testes em géis de HbS e consequentemente o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar os processos de polimerização de géis físicos de colágeno e géis químicos de hemoglobina bovina e suína com adição de hidroxauréia para determinar o possível efeito anti-gelificante da droga.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as propriedades mecânicas dos géis;
- Investigar a influência do tempo no comportamento dos géis;
- Caracterizar aspectos microestruturais dos géis.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 O sangue

O sangue é um tecido conjuntivo viscoso que circula pelo sistema vascular em animais com sistemas circulatórios fechados. É composto basicamente por gases, minerais, hidrocarbonatos, lipídeos, proteínas, vitaminas, hormônios e por alguns tipos de células, essencialmente, os eritrócitos (99%), glóbulos brancos e as plaquetas (1%), todos suspensos em uma fase líquida denominada plasma (~57% do volume). O sangue pode ser separado em três frações: as células, o plasma e o soro (plasma sem fibrinogênio, liberado após a contração do coágulo no processo de coagulação do sangue)^[6]. A porcentagem de eritrócitos é medida pelo hematócrito que determina em grande parte a viscosidade do sangue. O pH sanguíneo equivale aproximadamente 7,4.

É considerado um fluido não newtoniano por exibir um comportamento pseudoplástico. A viscosidade sanguínea decresce em alta tensão de cisalhamento devido à deformação dos eritrócitos, enquanto aumenta em baixa tensão de cisalhamento quando os eritrócitos se agregam uns aos outros formando uma estrutura de moedas empilhadas, chamada rouleaux, que formam estruturas tridimensionais aprisionando solvente e causando o aumento da viscosidade^[7]. Para o sangue em condições normais à 37°C, a viscosidade em alta taxa de cisalhamento (100-200⁻¹) é 4 ~ 5cP^[8]. A Figura 3-1 mostra o desenho do eritrócito no sangue e a hemoglobina.

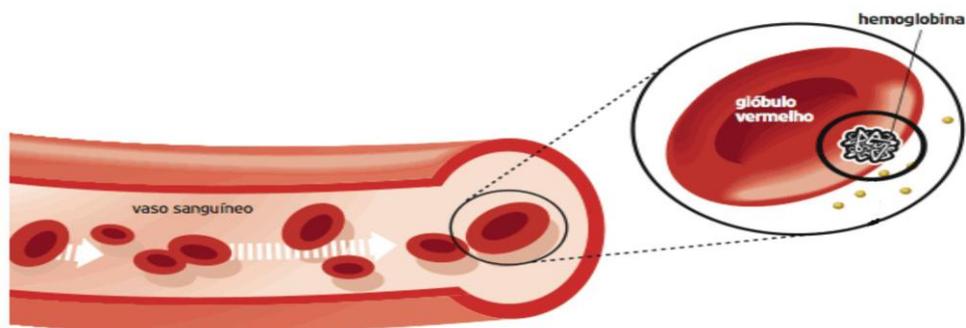


Figura 3-1 – Desenho do vaso sanguíneo com os eritrócitos e a hemoglobina. Adaptado de PIMENTA^[9].

Os eritrócitos normais apresentam forma de um disco bicôncavo anucleado como mostrado na Figura 3-2, com diâmetro médio de $8\mu\text{m}$, espessura de $1\mu\text{m}$ de centro e $2\mu\text{m}$ no entorno (ponto de maior espessura) e há cerca de 5 milhões de unidades por mm^3 . Contém uma elevada concentração de hemoglobina, proteína responsável pela pigmentação do sangue e pelo transporte de gases respiratórios.

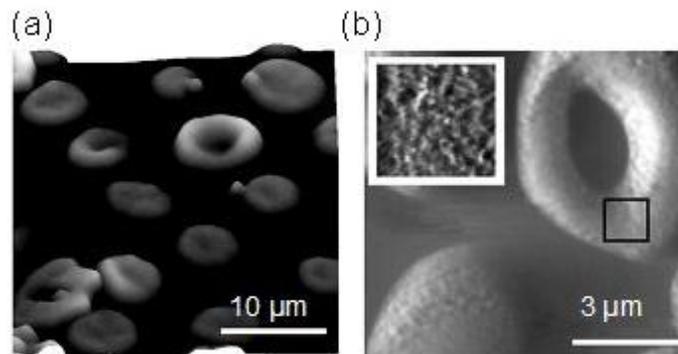


Figura 3-2 – Imagens do eritrócito normal feitas por microscopia de força atômica (AFM) exibindo em (a) sua topografia e (b) o detalhe da textura da superfície da membrana. MOSCHANDREOU^[8].

A hemoglobina humana de adultos normais é formada por um tetrâmero de polipeptídios de globina e grupos heme como mostrado na Figura 3.2. Os grupos heme são sítios ativados para ligações com oxigênio e a globina é responsável pelo peso molecular. A globina consiste em dois pares de cadeias polipeptídicas, um par de alfa e outro que será chamado de beta. Na cadeia alfa há 141 aminoácidos e a cadeia beta possui 146 aminoácidos na estrutura primária da hemoglobina normal. A maioria das cadeias tem forma helicoidal e as restantes menos organizadas conectam-se às hélices^[10]. A Figura 3.3 apresenta a estrutura molecular da hemoglobina.

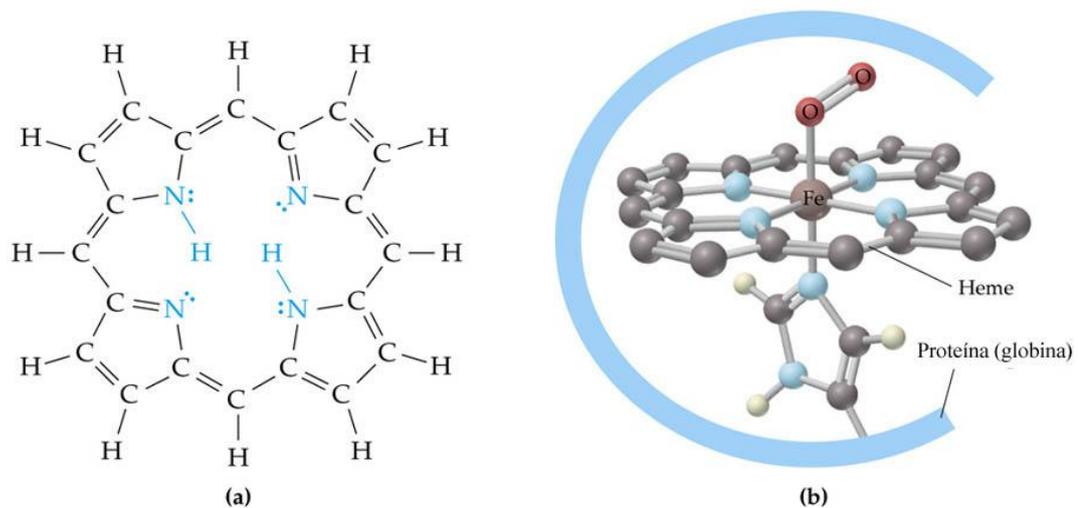


Figura 3-3 - Estrutura molecular da hemoglobina – (a) Proteína sem seu grupo prostético, apoproteína. (b) Representação de uma globina com seu grupo proteico, heme. Adaptado de GUYTON e HALL^[11].

No interior do eritrócito, a formação tetramérica da molécula de hemoglobina é responsável pelo transporte de oxigênio em sua forma conhecida como oxihemoglobina. Para liberar esse oxigênio, a molécula sofre uma modificação geométrica com rotação de 15 graus, passando para o estado de desoxihemoglobina (desoxiHbA)^[12].

Algumas fisiopatologias ligadas ao sangue causam a deformabilidade dos eritrócitos e comprometem a circulação, dentre elas, a anemia falciforme (AF) que é uma das doenças genéticas mais investigadas no Brasil e no mundo^[4] e será alvo do presente estudo.

3.1.1 Anemia falciforme

A anemia falciforme é uma doença do sangue de herança autossômica recessiva de origem nos países africanos tendo, portanto, maior incidência em negros. Foi descrita como uma doença molecular pela primeira vez por Pauling^[13]. Essa hemoglobinopatia acarreta a má formação do eritrócito que assume a forma de “foice”^[11], por isso o nome falciforme. A Figura 3.4 mostra uma imagem feita por microscópio eletrônico de varredura (MEV) do sangue de um paciente com anemia falciforme.

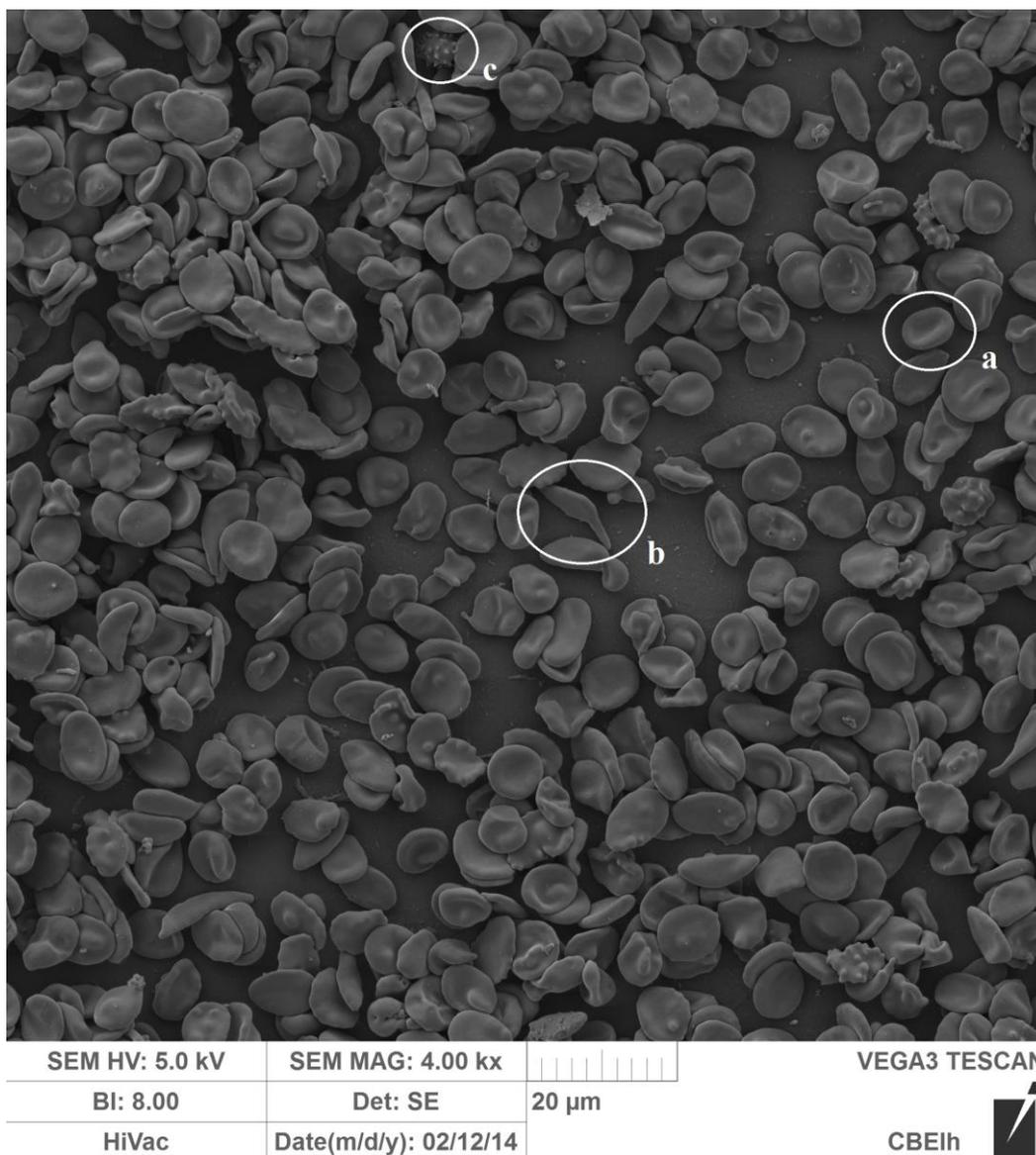


Figura 3-4 - Imagem de MEV de eritrócitos do sangue de paciente com anemia falciforme. Presença de eritrócitos normais (a), falciformes (b) e em estágio de hemólise – em destruição por rompimento da membrana plasmática (c). Imagem obtida pelo laboratório do bioreologia do CETEC.

A Tabela 3-1 apresenta a ordem cronológica das descobertas associadas à anemia falciforme.

Tabela 3-1 – Ordem cronológica das descobertas patológicas e clínicas ligadas à anemia falciforme. Adaptado de RESS *et al.*^[14].

<u>Descoberta</u>	• <u>Importância</u>
<u>1910</u> - Eritrócitos falciformes encontrados em um estudante de odontologia natural do Caribe, em Granada ^[1] .	Primeira descrição da doença ligada a eritrócitos anormais.
<u>1924</u> - hemólise em anemia falciforme ^[15] .	Explicação para anemia, icterícia e colelitíase.
<u>1924</u> - vaso-oclusão como causa de algumas características patológicas ^[16] .	Explicação para dano tecidual isquêmico.
<u>1948</u> - mobilidade eletroforética anormal da hemoglobina falciforme ^[2] .	Identificação fisiopatologia para se ter uma base molecular.
<u>1948</u> – Os bebês que adquiriram a doença não apresentaram os sintomas característicos ^[17] .	Grandes efeitos benéficos em função de altas concentrações de hemoglobina fetal foram identificados.
<u>1951</u> - Características de polimerização de HbS desoxigenada ^[18] .	Primeiro mecanismo molecular identificado.
<u>1980</u> - Uso da penicilina em crianças com anemia falciforme ^[19, 20] .	Redução da mortalidade, o papel de triagem neonatal.
<u>1984</u> - Transplante de medula óssea em crianças com anemia falciforme e leucemia ^[21] .	Identificação de cura potencial.
<u>1995</u> - Eficácia de hidroxicarbamida. (HU) ^[5] .	Efeito da HU somente sobre a doença.
<u>1998</u> - incidência de acidente vascular cerebral (AVC) reduzido em crianças com Doppler transcraniano anormais que estavam fazendo transfusão de sangue ^[22] .	Prevenção primária e ocorrência de queda de AVC.

A mutação na hemoglobina ocorre por uma substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico na sexta posição da cadeia beta polipeptídica na molécula de hemoglobina. A hemoglobina falciforme (HbS) quando em sua forma desoxigenada (desoxiHbS) perde sua

estrutura quaternária e adquire uma estrutura primária, torna-se pouco solúvel e se agrega em longos polímeros (polimerização), formando fibras e resultando na alteração da forma do eritrócito (Figura 3.5).

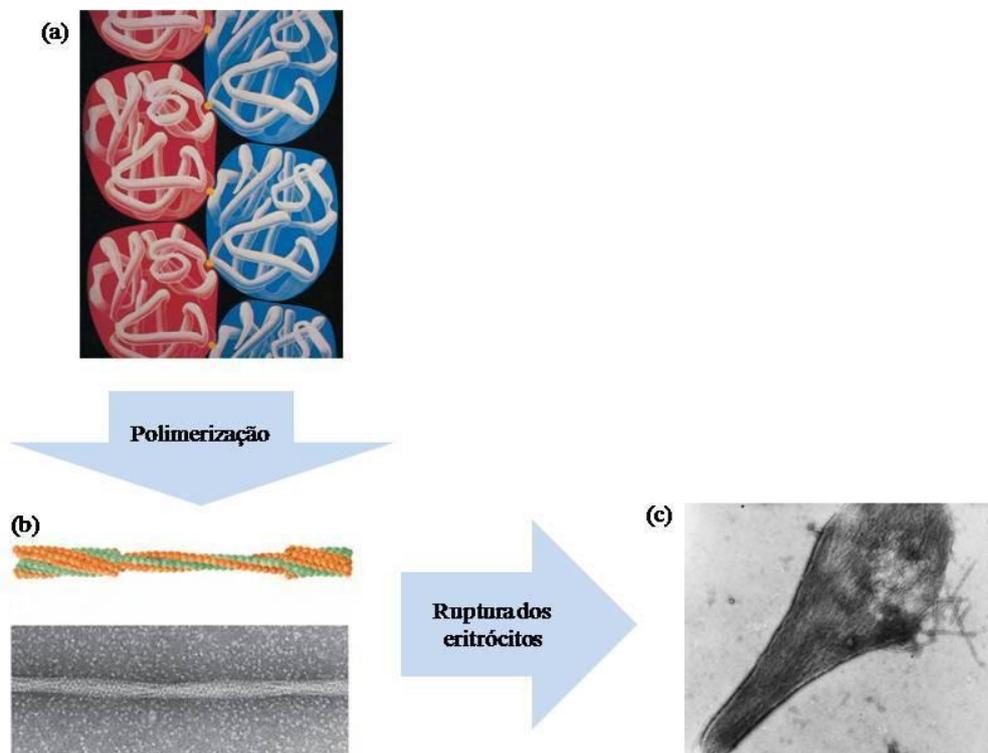


Figura 3-5 - Polimerização das moléculas de desoxiHbS. (a) A disposição das moléculas de desoxiHbS na fibra. Os pontos amarelos representam ligações entre os aminoácidos da posição 6 das cadeias beta. Em (b) micrografia da fibra com desenho interpretativo. Cada esfera representa uma molécula de desoxiHbS. Em (c) a micrografia de fibras de desoxiHbS saindo de um eritrócito rompido. Adaptado de VOET & VOET^[23].

Os eritrócitos se tornam rígidos em forma de foice, o que ocasiona a oclusão vascular e lesão nos tecidos, explicação dos episódios de dor sentidos pelos pacientes anêmicos^[23]. A Figura 3-6 apresenta os danos causados pela HbS. Ao causar danos na membrana do eritrócito, ocorre à hemólise e esgotamento de óxido nítrico que reage com a hemoglobina livre na circulação resultando na vasodilatação. Há redução do fluxo sanguíneo causando o choque entre os eritrócitos enrijecidos com o endotélio, ocasionando dano e redução do diâmetro interno dos vasos. A polimerização da HbS é detalhada em seguida.

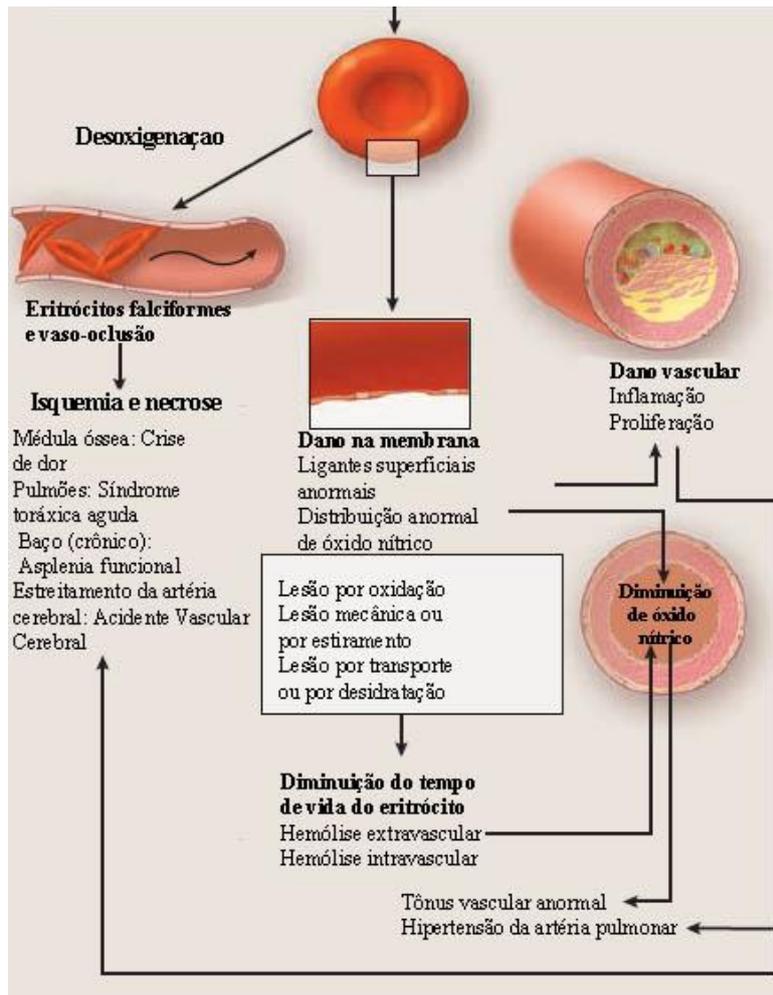


Figura 3-6 - Eritrócitos falciformes nos vasos sanguíneos e suas consequências. Eritrócitos em circulação têm um alto teor de hemoglobina falciforme e polimerizam-se quando desoxigenados, o que pode causar entupimento e vaso-oclusão. Adaptado de PLATT^[24].

3.1.2 Polimerização da hemoglobina falciforme

Quando a solubilidade do eritrócito é reduzida em condições de baixa oxigenação, as moléculas HbS se agregam em fibras formando géis. A solubilidade das hemoglobinas normais oxigenadas (oxiHbA) e das hemoglobinas normais desoxigenadas (desoxiHbA) ou das hemoglobinas falciformes oxigenadas (oxiHbS) é na faixa de 70g/dL, enquanto que a de desoxiHbS é de somente 17g/dL^[25]. A polimerização intracelular de HbS resulta em grande perda da flexibilidade da membrana. Dentre os fatores que influenciam na polimerização podemos citar a pressão parcial de oxigênio, pH, concentração de HbS, presença de outras hemoglobinas, temperatura e pressão osmótica celular^[23]. Frenette & Atweh^[26] reportaram em

seus estudos a hipótese de que as fibras se alongam pelo eritrócito causando a deformação e rompimento da membrana conforme apresenta a Figura 3.7.

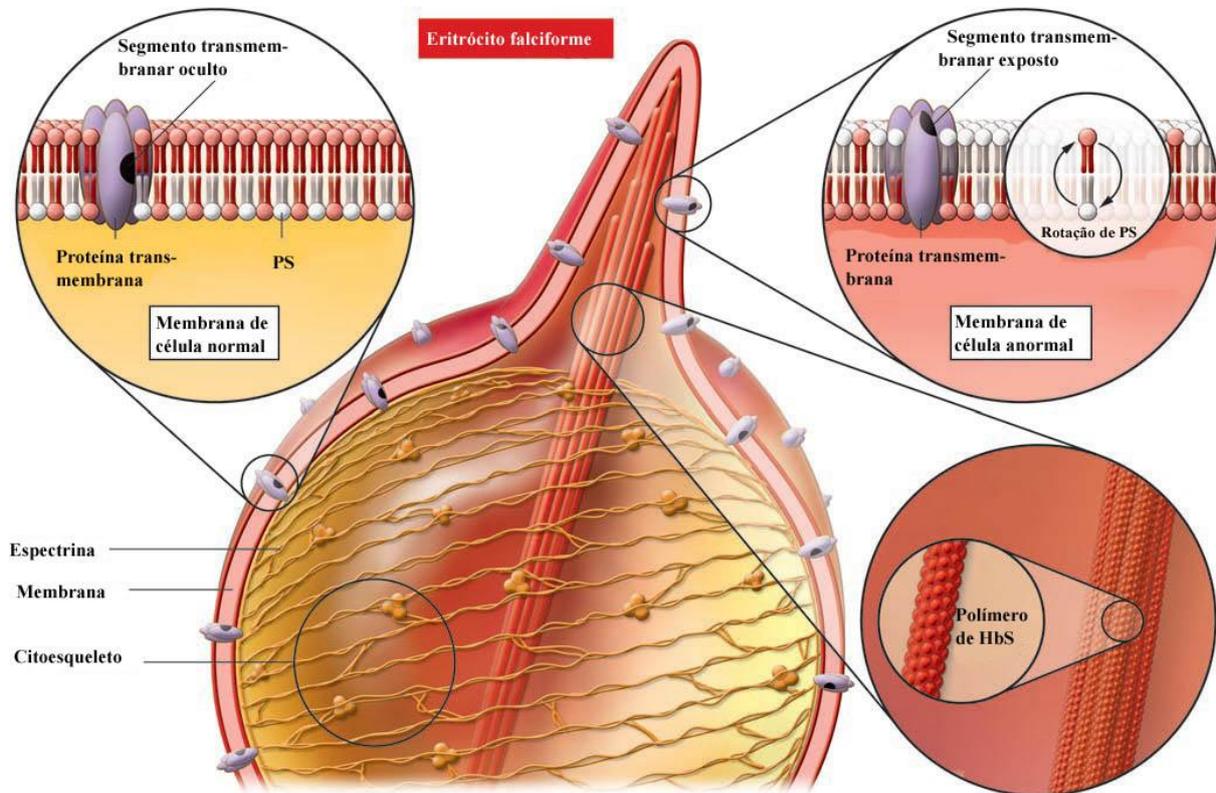


Figura 3-7 - Alteração da membrana do eritrócito por polímeros de HbS. Adaptado de FRENETTE & ATWEH^[26].

Estudos anteriores discutem a doença falciforme como resultado da polimerização da HbS em longas fibras que formam um gel, fazendo com que os eritrócitos percam a deformabilidade, dificultando sua passagem pela microvasculatura^[27-29], o que desautoriza a hipótese anterior.

Em 1990, EATON e HOFRICHTER^[30] mostraram a presença do fenômeno de nucleação e crescimento das fibras e FERRONE *et al.*^[31] explicaram o modelo da dupla nucleação: inicialmente ocorre homoganeamente em solução, depois a nucleação ocorre heterogeneamente na superfície das fibras pré-existentes.

Em termos termodinâmicos, a polimerização é considerada uma transição de primeira ordem, apresentando variação de entalpia. A Figura 3.8 mostra o mecanismo da dupla nucleação que consiste na formação de um aglomerado líquido denso metaestável (nucleação

homogênea) e a nucleação do núcleo polimérico com seu aglomerado (nucleação heterogênea)^[32].

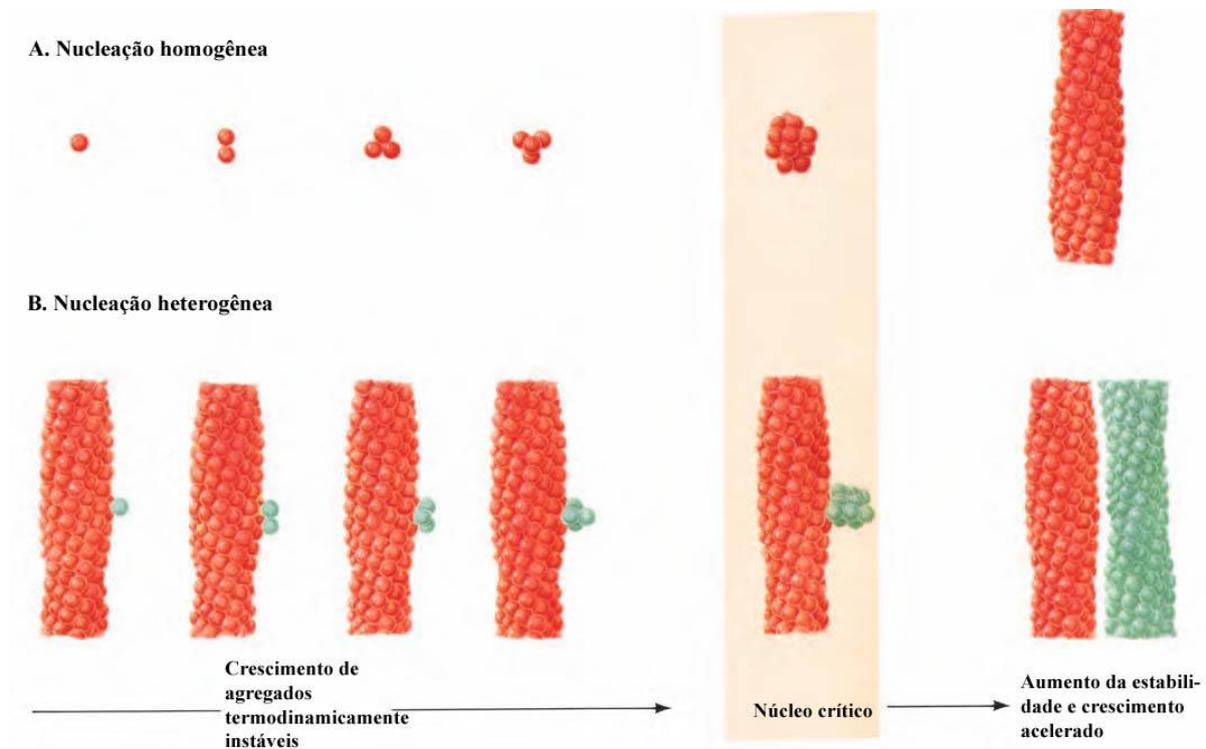


Figura 3-8 - Mecanismo de nucleação dupla da polimerização da desoxiHbS. (A) Inicialmente a agregação é lenta, pois o processo é termodinamicamente instável e alguns intermediários se decompõem durante o crescimento. Os agregados chegam a certo tamanho, o núcleo crítico, onde o crescimento é termodinamicamente favorável, levando a formação da fibra. (B) Cada fibra pode nuclear o crescimento de outras fibras levando a formação do polímero. Adaptado de FERRONE *et al.*^[31].

A nucleação de HbS, tanto dentro dos eritrócitos, quanto *in vitro*, segue um determinado curso de tempo (tempo de atraso - t_a). Dependendo das condições, a gelificação pode durar de milissegundos a dias. Durante esse tempo, as fibras de HbS podem ser detectadas. As estratégias para o tratamento da anemia falciforme mais sugeridas visam aumentar o t_a . Pode-se citar dentre elas: o rompimento das interações intermoleculares entre as moléculas de HbS, o uso de agentes que aumentam a afinidade da HbS com o O_2 e a diminuição da concentração de HbS^[33].

3.2 Hidroxiuréia

Adultos com anemia falciforme têm dois tipos de eritrócitos: células S que contêm HbS e células F que contêm aproximadamente 20% de (HbF) e o restante de HbS. Em alguns adultos, a fração de HbS nas células S é de aproximadamente 30%. A hidroxiuréia (HU) é a principal droga ministrada no tratamento da anemia falciforme e seu uso tem sido atribuído ao aumento do nível de HbF nas células F para aproximadamente 50%, conduzindo a uma redução na incidência de crises vaso-oclusivas^[23]. Possui propriedades antineoplásicas por ser um potente inibidor da síntese de DNA de muitos organismos.

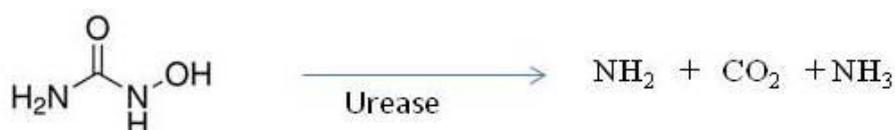
A HU pertence à uma classe de compostos chamados ácidos hidroxâmicos, que podem se ligar à metais. É um composto simples com fórmula $H_2NCONHON$, peso molecular 76Da e é solúvel em água. Foi sintetizada pela primeira vez por DRESLER e STEIN em 1869 mas apenas em 1928 foi mostrada sua atividade biológica por ROSENTHAL *et al.*^[24, 34, 35].

A síntese da hidroxiuréia forma um pó branco inodoro e higroscópico. Seu ponto de fusão é em torno de 133 a 136°C. A reação de síntese é representada abaixo mostra a reação da hidroxilamina com um cianeto produzindo hidroxiuréia e um derivado de cloro:



Eq. (3-1)

No primeiro método desenvolvido de síntese da hidroxiuréia eram utilizados: hidroxilamina, ácido clorídrico e cianeto de potássio. Atualmente, uma resina de troca iônica e um reagente de fácil manuseio e menos tóxico são usados em vez de cianeto de potássio para evitar a formação de cloreto de potássio. Seus produtos de decomposição são principalmente amônia, dióxido de carbono e ácido isociânico^[36]. A equação abaixo mostra a decomposição da hidroxiuréia:



Eq. (3-2)

A HU é uma droga de fácil administração e seu uso para anemia falciforme teve início na década de 90 do século passado em adultos e posteriormente em crianças com poucos efeitos colaterais. A HU é rapidamente excretada pela urina como ureia e através dos pulmões como dióxido de carbono. É tóxica para as células quando ministrada em altas concentrações ou prolongada exposição às concentrações menores. A atividade biológica da HU é uma função da sua concentração, duração da exposição e sensibilidade do organismo^[36].

Além da aplicação como medicamento para a anemia falciforme e vários tipos de câncer, autores tem reportado o uso de seus derivados, exceto seus sais, como importantes redutores na fissão de urânio e plutônio nas operações de reprocessamento de combustível nuclear^[37].

Para observar se a HU possui algum efeito sobre a polimerização de HbS, essa droga foi utilizada diretamente em outros tipos de géis que serão citados a seguir.

3.3 Agentes gelificantes

Um gel pode ser considerado um sólido viscoelástico no qual os solventes estão presos em uma rede tridimensional. Os géis podem ser classificados como naturais e artificiais ou sintéticos. Géis sintéticos podem ser divididos em macromoleculares (polímeros) e supramoleculares. Os géis macromoleculares podem se formados por ligações químicas cruzadas (termicamente irreversível) ou interações físicas (reversível). Podem ser classificados também quanto ao solvente em organogel – solventes orgânicos - e hidrogel – água como solvente^[38].

Os géis são também classificados pelo tempo de permanência de suas ligações cruzadas. Géis químicos, como as resinas, apresentam ligações covalentes na sua reticulação (ligações permanentes), fazendo com que a temperatura não quebre as moléculas do gel. Já os géis físicos, como a gelatina, são redes conectadas por interações físicas, que são reversíveis e podem ser quebradas pelo aumento da temperatura, sendo também chamados de géis termorreversíveis^[38]. A Figura 3.9 representa a classificação dos géis quanto à origem e o meio.

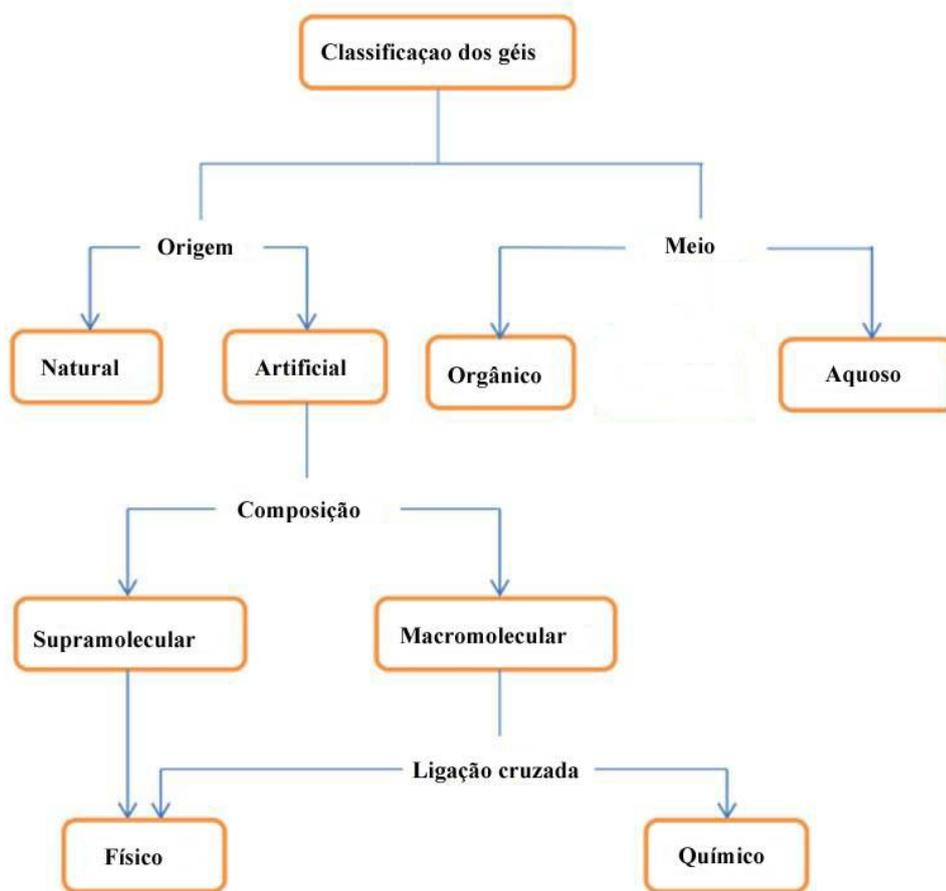


Figura 3-9 - Classificação do géis de acordo com origem, meio, composição e tipo de ligações cruzadas. Adaptado de MAITY^[38].

3.3.1 Colágeno

O colágeno é uma proteína proveniente de uma família de 27 proteínas que são codificadas por cerca de 40 genes diferentes, sendo o colágeno do tipo I o mais comum. É a proteína estrutural mais abundante dos vertebrados, presente em ossos, cartilagens, tendões, ligamentos, pele, e nas fibras estruturais de vários órgãos. Por ser um material biológico, é mais complexo do que um material sintético, pois forma matrizes complexas, estruturas hierárquicas e muitas vezes são multifuncionais^[39].

A Figura 3.10 mostra como o colágeno se organiza hierarquicamente e evidencia a escala e os meios de análise para observar a estrutura em questão:

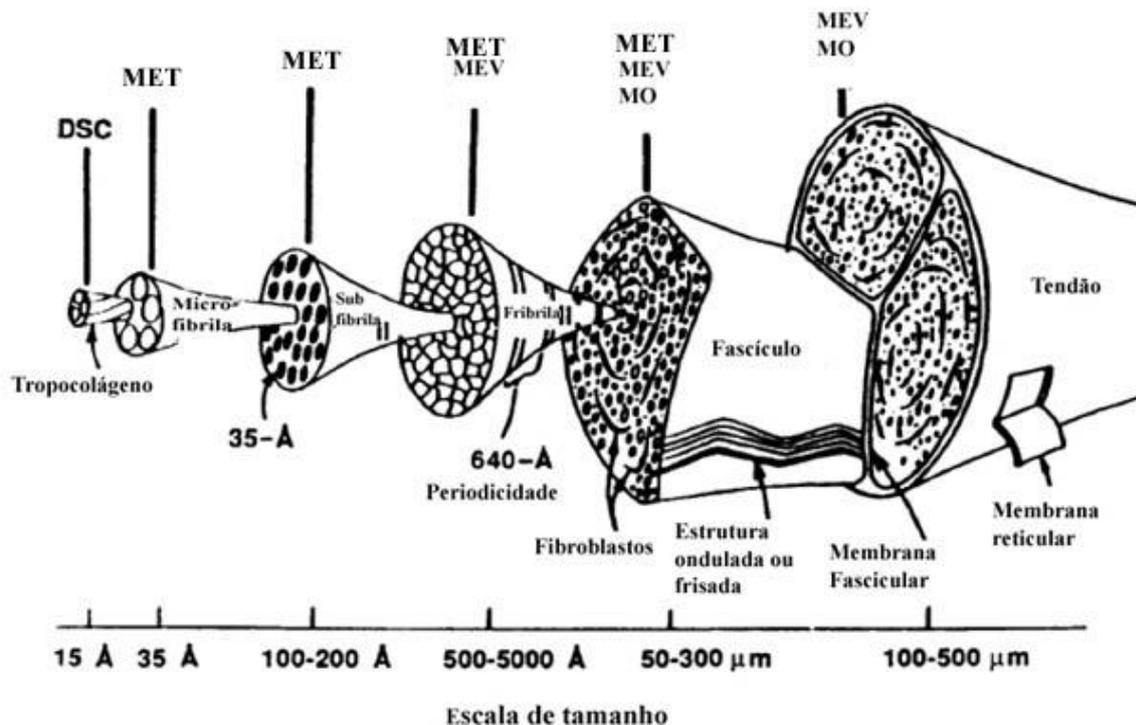


Figura 3-10 - Hierarquia do modelo de tendão com diversos níveis de organização e os respectivos meios de análise possíveis em determinada escala: DSC (calorimetria diferencial exploratória), MET (microscópio eletrônico de transmissão), MEV (microscópio eletrônico de varredura) e MO (microscópio ótico). – Adaptado de BAER *et al.*^[40].

Ao considerar uma proteína como polímero de maior complexidade, os “monômeros” dão lugar aos aminoácidos, que são compostos que contêm uma amina (-NH₂) e um grupo carboxila (-COOH). Os aminoácidos formam cadeias lineares semelhantes às cadeias de um polímero, que são chamados de polipeptídeos adquirindo configurações especiais devido à formação de ligações (hidrogênio, van der Waals e covalentes) entre os aminoácidos nas cadeias^[41]. As duas configurações mais comuns são a hélice alfa e a folha beta, como apresentadas na Figura 3.11. Na hélice alfa o grupo N-H de cada ligação peptídica se liga ao grupo C=O de uma ligação peptídica vizinha localizada a quatro ligações peptídicas de distância, na mesma cadeia ligadas a um hidrogênio. Na folha beta, cadeias peptídicas adjacentes estão em direções opostas (antiparalelo). As cadeias polipeptídicas individuais (cordões) de uma folha β são mantidas juntas por ligações de hidrogênio entre as ligações peptídicas nas diferentes vertentes, e as cadeias laterais de aminoácidos de cada cadeia são projetadas alternadamente acima e abaixo do plano da folha^[42].

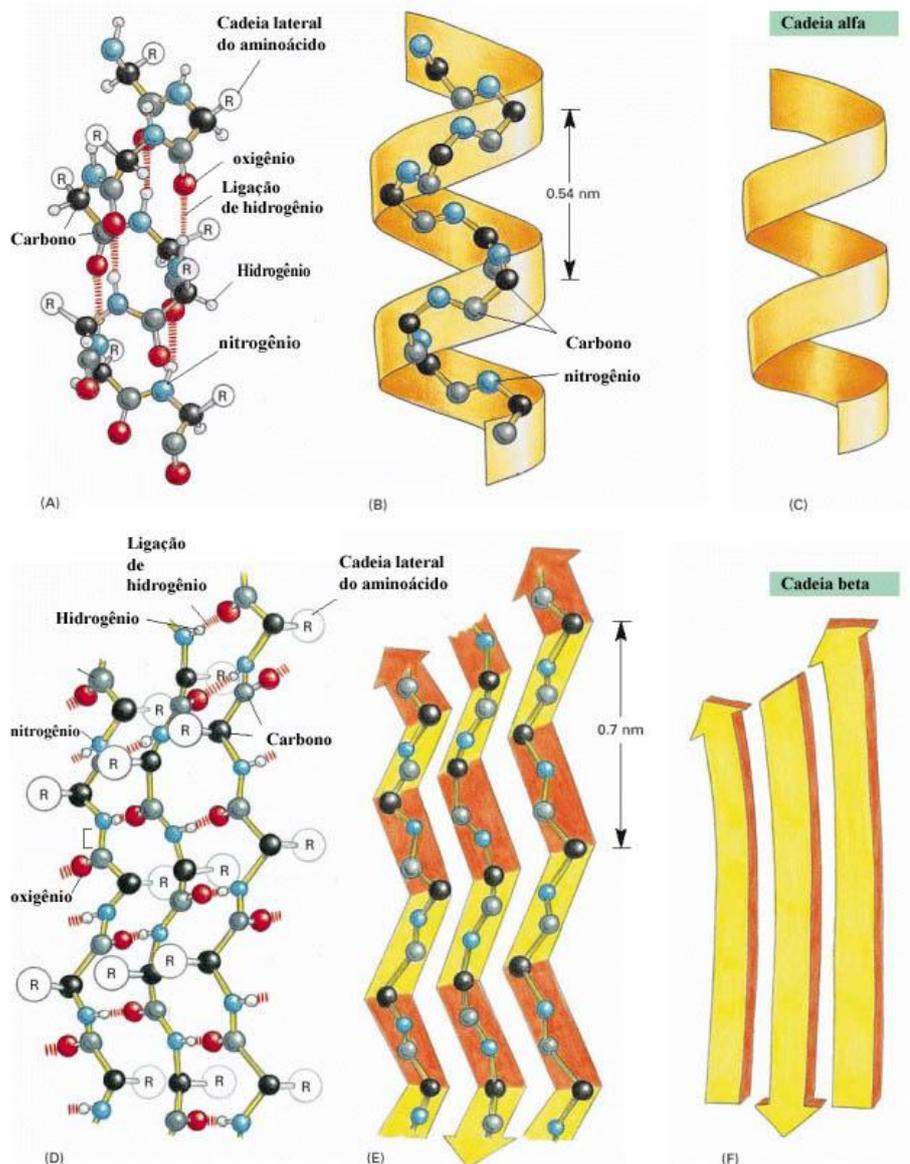


Figura 3-11 – Desenho da hélice alfa – α - (A, B, e C) e a folha beta – β - (D, E, e F). Em (A) e (D) estão representados todos os átomos da estrutura do polipeptídeo, onde as cadeias laterais de aminoácidos são indicadas por R. Em (B) e (E) estão representados os átomos em estrutura única, enquanto que (C) e (F) exibem os símbolos de estenografia que são usados para representar a hélice α e a fita β de proteínas. Adaptado de ALBERTS *et al.*^[42].

O colágeno do tipo I apresenta a seguinte sequência geral de aminoácidos: –X-Gly-Pro-Hypro-Gly-X (onde X pode ser qualquer outro aminoácido) organizada em uma α -hélice tripla. Apresenta maior proporção de prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hypro), como apresentado na Tabela 3-2. Três cadeias peptídicas orientadas para esquerda formam uma super hélice orientada para a direita com periodicidade de 2,86nm. Essa super hélice tripla é a

base do tropocolágeno, precursor do colágeno^[43]. As três cadeias são fortemente unidas por ligações de hidrogênio dos resíduos de glicina entre os grupos hidroxila (OH) da hidroxiprolina. Ainda há reticulações de lisina entre as hélices.

Tabela 3-2 - Quantidade de aminoácidos presentes no colágeno (Adaptado de Park & Lakes⁴³)

Aminoácido e componente	Conteúdo (mol/100mol de aminoácidos)
Glicina	31,4–33,8
Prolina	11,7-13,8
Hidroxiprolina	9,4-10,2
Aminoácidos polares ácidos (Ácido aspártico, Glutamina e Asparagina)	11,5-12,5
Aminoácidos polares básicos (lisina, Arginina, histina).	8,5-8,9
Outros aminoácidos	Resíduos

Os primeiros fatores que estabilizam as moléculas de colágeno são as interações entre as α -hélices. Esses fatores são as ligações de hidrogênio entre os grupos C=O e NH, as ligações iônicas entre os grupos de aminoácidos polares e as reticulações inter cadeia entre as hélices.

As fibrilas de colágeno medem de 20 a 40nm de diâmetro e formam feixes de fibras com 0,2 a 1,2 μ m de comprimento. A Figura 3-12 mostra o arranjo molecular do colágeno.

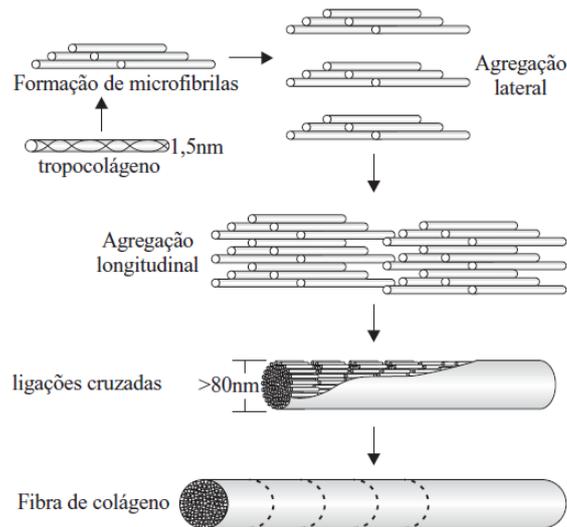


Figura 3-12 - Representação esquemática do arranjo molecular do tropocolágeno em estruturas fibrilares e fibras –CHAUDRY, ROCHA *et al* ^[44].

A região onde os aminoácidos são altamente apolares é hidrofóbica o que faz com que a adição de moléculas de água na intra ou interestruturada cadeia altere a estabilidade do colágeno. Se a quantidade de água é menor, a estabilidade estrutural diminui. Se for desidratado completamente (liofilizado), então a solubilidade em água também decresce (chamado *vitro aging* de colágeno).

O colágeno é sintetizado no retículo endoplasmático (ER) como pró-colágeno que envolve um amplo número de modificações co-translacionais e pós-translacionais. Esse tipo de colágeno se organiza dentro de agregados bem empacotados, altamente orientados, apresentando um padrão de bandas características com uma periodicidade cerca de 70nm.

O processo de aquecimento e solubilização do colágeno de tendão bovino resulta na decomposição das fibrilas e fibras de colágeno em pequenos agregados de monômeros de colágeno dispersos na solução ácida. As fibrilas mostram um padrão característico em conjunto formando géis^[44].

Ao se testar os géis para compará-los com a polimerização das HbS, supõe-se que poderiam ser testados também géis de hemoglobina. A hemoglobina liofilizada comercial foi usada e não gelifica mesmo com o ataque do ácido acético, como nos géis de colágeno. Para desenvolver o gel de hemoglobina comercial foi empregado o uso de um agente reticulador, o glutaraldeído, que será descrito em seguida.

3.4 Agente reticulador

3.4.1 Glutaraldeído

O glutaraldeído (GTA) é um dialdeído, de fórmula $C_5H_8O_2$, muito utilizado como agente reticulador em diversos biomateriais, como exemplo, é utilizado na polimerização da hemoglobina para a produção da primeira geração dos HBOCs (*hemoglobin-based oxygen carriers*) usados como sangue artificial. Sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 3-13.

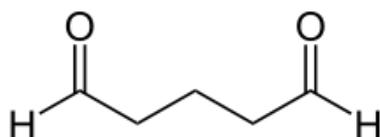


Figura 3-13 - Cadeia molecular de glutaraldeído

O GTA apresenta função de aldeído ativo em ambas as extremidades da molécula e tem alta afinidade com as lisinas da superfície da hemoglobina para a produção de sangue artificial. A reação entre o GTA e as lisinas forma polímeros tetrâmeros de hemoglobina de vários pesos moleculares e estruturas, ao mesmo tempo, forma reticulações intramoleculares dentro dos tetrâmeros, como demonstrado na Figura 3.14^[45].

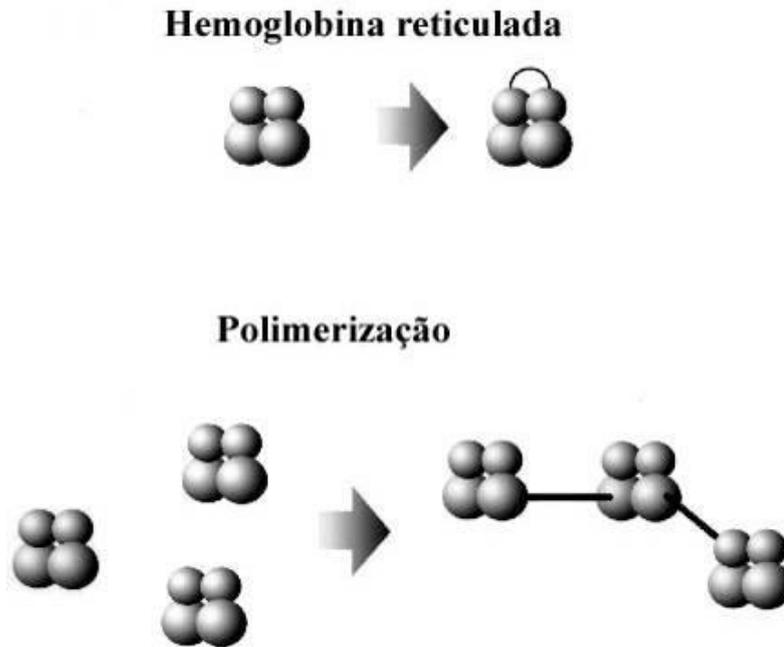


Figura 3-14 -Reticulações intermoleculares do glutaraldeído nos tetrâmeros da hemoglobina e consequente polimerização. Adaptado de STOWELL *et al.*^[45].

Essa reação resulta em uma disposição heterogênea de tetrâmeros de hemoglobina estabilizados e polimerizados com uma variedade de cadeias protéicas modificadas^[46].

3.5 Técnicas de caracterização

3.5.1 Espectroscopia ultravioleta-visível

Quando se fala de absorção de luz visível é comum se familiarizarem pelo fato dessa absorção fazer com que os objetos sejam coloridos. Todas estas cores são causadas pela absorção de luz na região visível do espectro eletromagnético, cujo comprimento de onda varia aproximadamente de 400 a 800 nm, sob excitação de um elétron do estado fundamental em uma órbita mais elevada. A Figura 3-15 apresenta a relação entre as cores e a respectiva absorbância.[47]

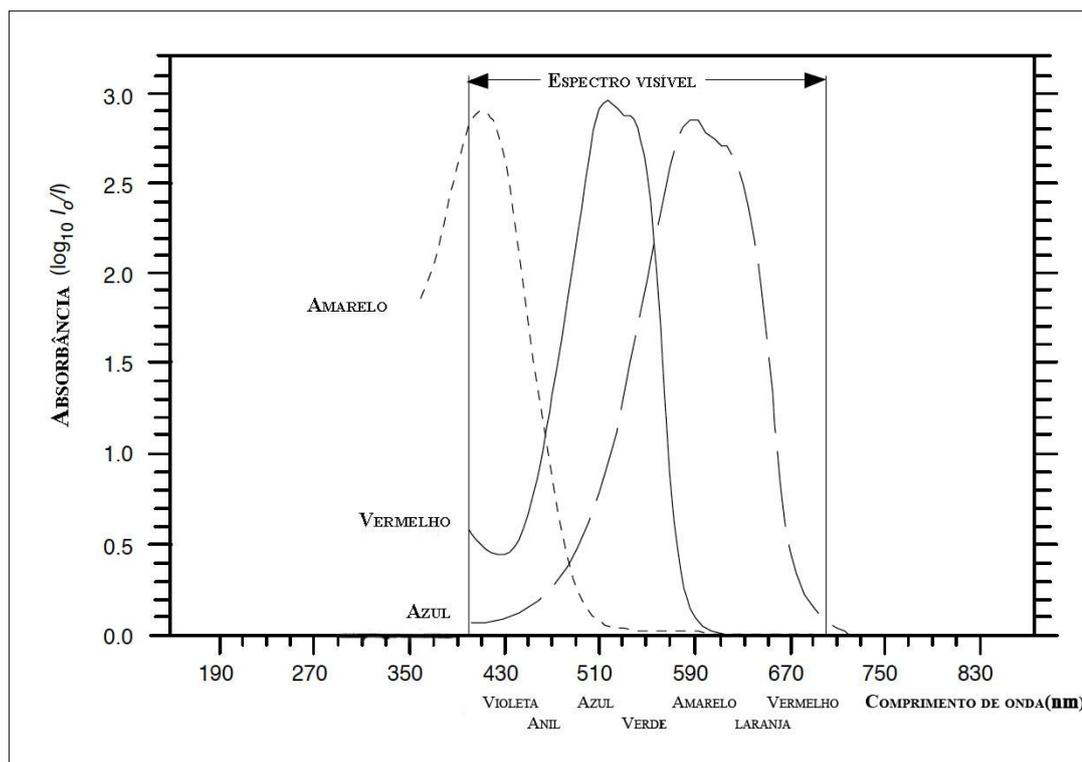


Figura 3-15 – Absorção da luz pelas cores. Adaptado de FAUST^[47].

A luz visível, que é parte do espectro eletromagnético total, encontra-se no intervalo de comprimento de onda de 400 a 700 nm. Quando a luz é absorvida por um material, seus elétrons de valência saltam do seu estado fundamental para estados mais elevados de energia. A energia da luz visível depende de sua frequência, que é aproximadamente equivalente a 170 kJ mol⁻¹ (mol de fótons) para a luz vermelha e 300 kJ mol⁻¹ para a luz azul. A Tabela ... apresenta a maioria das transições de elétrons no espectro eletromagnético no intervalo do comprimento de onda entre 190 e 900 nm.

Tabela 3-3. Frequência, comprimento de onda e energia de radiação de parte do espectro eletromagnético usado para o espectrofotômetro ultravioleta/visível.

Frequência (ν) (Hz)	Comprimento de onda (λ)		Energia (kJ.mol ⁻¹)
	(m)	(nm)	
3,33 x 10 ¹⁴	9,0 x 10 ⁻⁷	900	137,5 (infravermelho)
4,29 x 10 ¹⁴	7,0 x 10 ⁻⁷	700	171,2 (luz vermelha)
7,50 x 10 ¹⁴	4,0 x 10 ⁻⁷	400	299,3 (luz azul)
1,58 x 10 ¹⁵	1,9 x 10 ⁻⁷	190	630,5 (ultravioleta)

3.5.1.1 O espectrofotômetro

Para leitura no espectrofotômetro a amostra se apresenta em solução onde o solvente, preferivelmente, não deve absorver na faixa ultravioleta/visível. No entanto, raramente não absorve. Em espectrômetros convencionais a radiação eletromagnética passa através da amostra que é colocada em uma pequena célula de seção quadrada (cubeta). A radiação em todo o conjunto do ultravioleta/visível é digitalizado por um período de cerca de 30 s, e uma radiação de mesma frequência e intensidade é transmitida simultaneamente através de uma cubeta de referência contendo apenas o solvente. Em seguida, a radiação transmitida é detectada pelo espectrofotômetro e registrada como absorbância comparando a diferença entre a intensidade da radiação que passa através da cubeta da amostra e de referência. A Figura 3-16 ilustra os principais componentes de um espectrofotômetro.

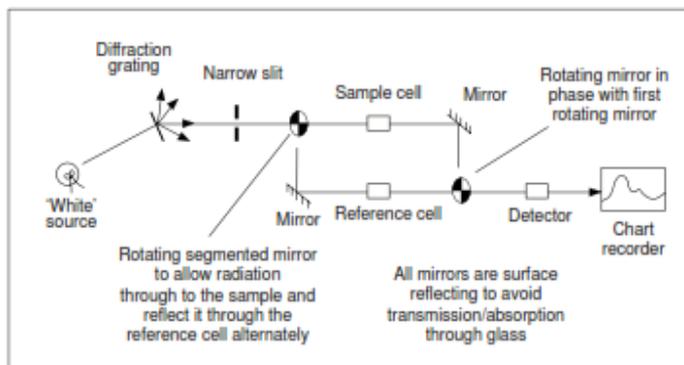


Figura 3-16 - Principais componentes do espectrofotômetro. Adaptado de FAUST^[47].

A leitura através do espectrofotômetro segue a Lei de Beer, onde a absorção é proporcional ao número de moléculas absorventes, ou seja, com a concentração de moléculas que absorvem e a Lei de Lambert onde a fração da radiação absorvida é independente da intensidade da radiação. Combinando estas duas leis, podemos derivar a Lei de Beer-Lambert:

$$I_0 = I \log_{10} \epsilon c$$

onde: I_0 = A intensidade da radiação incidente;

I = intensidade da transmissão;

ϵ = uma constante para cada material absorvente, conhecido como coeficiente molar de absorção;

ι = o comprimento do percurso da solução absorvente;

c = a concentração das espécies de absorção;

O valor de $\log_{10}(I_0/I)$, é conhecida como a absorbância da solução, e pode ser lida diretamente a partir do espectro, geralmente como "unidades de absorção"^[47].

3.5.2 Microscopia ótica

Um microscópio ótico utiliza luz visível para produzir uma imagem ampliada de um objeto (ou modelo) que é projetada na retina do olho ou em um dispositivo de imagem. Duas lentes, a lente objetiva e a ocular, trabalham juntas para produzir o aumento final da imagem.

Dois componentes do microscópio são de fundamental importância na formação da imagem: a lente objetiva, que recolhe a luz difratada pela amostra e forma uma imagem real ampliada no plano da imagem intermédia quase real das oculares, e a lente condensadora, a qual foca a luz do iluminador para uma pequena área da amostra. A Figura 3-17 apresenta partes de um microscópio ótico.

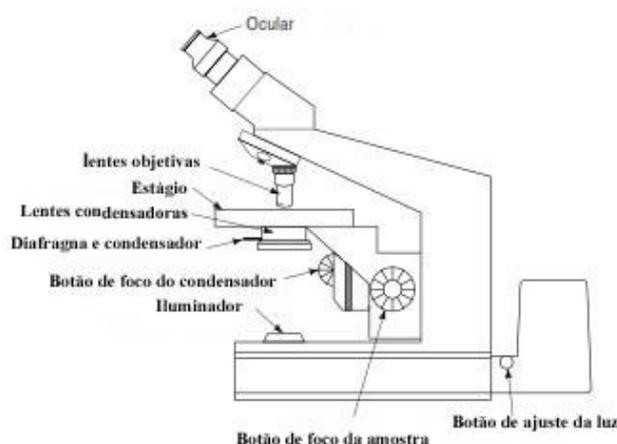


Figura 3-17 - Partes de um microscópio ótico. Adaptado de MURPHY^[48].

A lente ocular é constituída por duas lentes que ampliam a imagem formada pelas objetivas e ajusta possíveis deficiências óticas. O estágio ou mesa serve como apoio para o material a ser observado, possui uma passagem de vidro por onde os raios de luz atravessam e

também é dotada de parafusos dentados permitindo o deslocamento do material pela mesma. O condensador e diafragma são responsáveis pela uniformidade da iluminação e redução ou ampliação da região a ser iluminada. No botão de foco da amostra é passível de rotação e permite a movimentação vertical e horizontal da mesa.

A Figura 3-18 mostra como uma imagem torna-se ampliada e é percebida pelo olho.

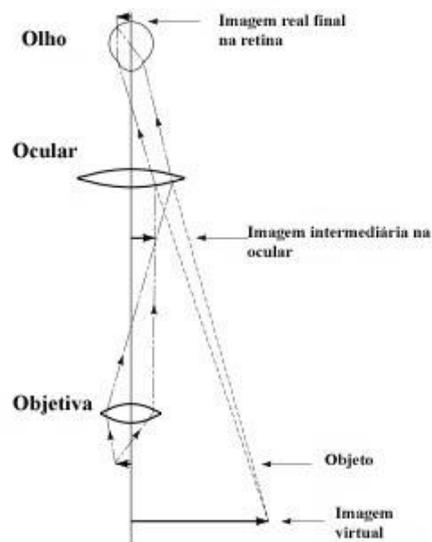


Figura 3-18 – Esquema da obtenção e percepção da imagem pelo microscópio óptico.

Adaptado de MURPHY^[48].

A figura também mostra a localização de importantes planos focais em relação à lente objetiva, à ocular e ao olho. A amostra na mesa do microscópio é examinada pela lente objetiva, que produz uma imagem real ampliada do objeto no plano da ocular. Ao olhar no microscópio, a ocular agindo em conjunto com a córnea do olho projeta uma segunda imagem verdadeira na retina, onde é percebida e interpretada pelo cérebro como uma imagem virtual ampliada de cerca de 25 cm à frente do olho.

3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a observação e caracterização da superfície de materiais orgânicos e inorgânicos em escala nanométrica (nm) e micrométrica (μm). No MEV, a amostra é irradiada com um feixe fino de elétrons para produzir a imagem. Não é totalmente claro quem propôs primeiro o princípio do MEV. A primeira descrição

publicada apareceu em 1935, em um artigo pelo físico alemão Max Knoll^[49], embora outra de um físico alemão, Manfred von Ardenne, realizou alguns experimentos com o que poderia ser chamado de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) em 1937. Até 1942, três americanos, Zworykin, Hillier e Snijder, descreveram pela primeira vez um verdadeiro MEV com um poder de resolução de 50nm^[50]. Os MEVs modernos podem ter o poder de resolução melhor que 1 nm quando junto à outras microscopias^[51].

A Figura 3-19 mostra um esquema ilustrando os componentes do MEV:

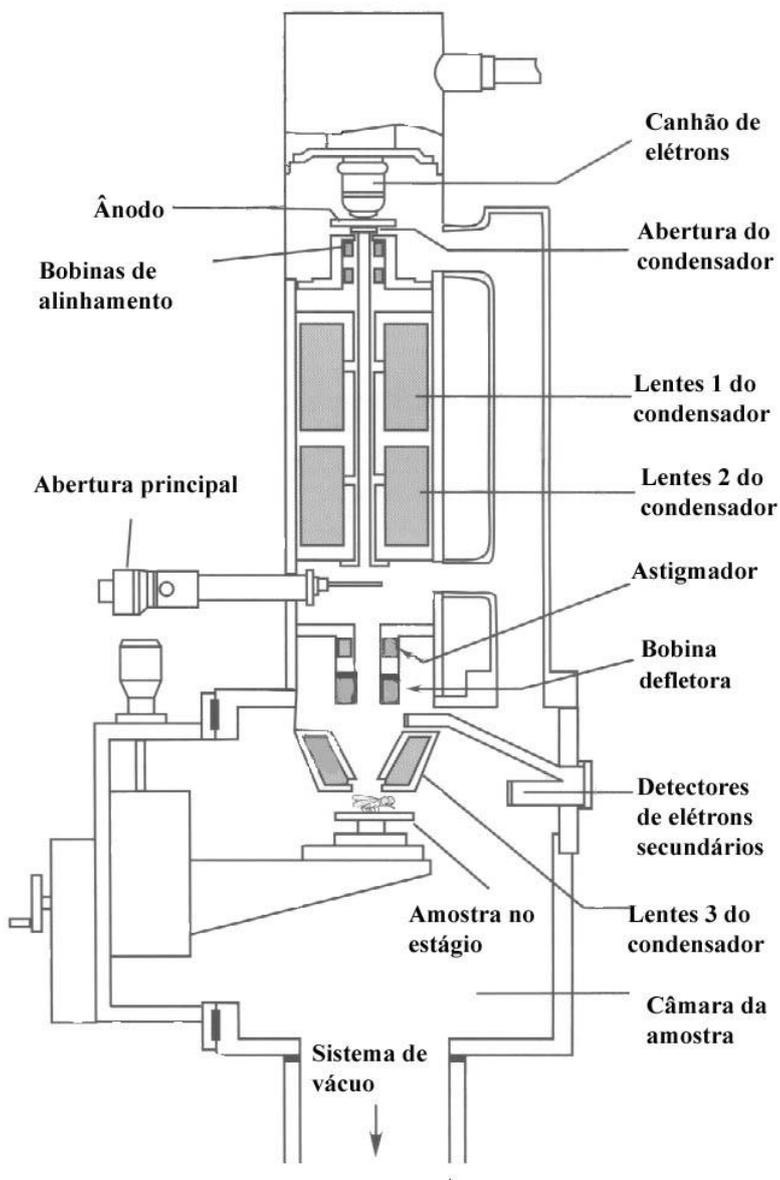


Figura 3-19 - Diagrama da coluna de MEV mostrando seus componentes em detalhe. Adaptado de Bozzola^[51].

O MEV pode ser subdividido em sistemas de componentes que possuem várias funções. O canhão de elétrons é responsável na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando em uma aceleração em direção ao eletrodo positivo. Dentre os sistemas do MEV, o sistema de lentes é responsável pela produção de um pequeno ponto, em foco, de elétrons que são então varridos sobre a superfície da amostra por meio de um sistema de deflexão^[51]. A Figura 3-20 apresenta como se dá a interação do feixe de elétrons com a amostra.



Figura 3-20- O MEV e a interação dos elétrons com a amostra. Adaptado de KAECH^[52].

A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra analisada. O estágio serve para posicionar a amostra

em relação ao feixe elétrons. Um detector de elétron secundário é usado para coletar os elétrons e gerar um sinal posteriormente processado pelo computador. O sistema de vácuo é necessário para remover moléculas que podem impedir a passagem de elétrons de maior energia ao longo da coluna, bem como permitir elétrons secundários de baixa energia irem para o detector.

Os sistemas de lentes eletromagnéticas, bobina defletora, e o astigmador são responsáveis pelo controle e refinamento do feixe de elétrons depois de deixarem o canhão de elétrons e antes de atingirem a amostra. Dependendo da velocidade dos elétrons e a densidade da amostra, o feixe pode entrar em uma profundidade variável^[51].

O feixe de elétrons que atinge um ponto da superfície da amostra interage com um volume total da amostra. A Figura 3-21 mostra como a interação do feixe com a amostra como um desenho de uma pêra.

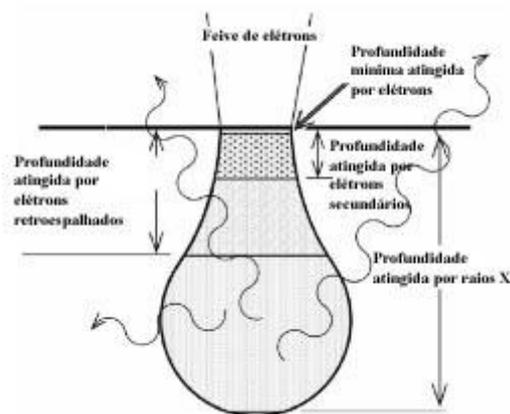


Figura 3-21 - Interação de elétrons com a amostra e a profundidade atingida por cada tipo de feixe. Adaptado de HAFNER[53].

Os elétrons secundários são lançados em todo o volume, mas podem somente atingir uma pequena profundidade na amostra devido a sua baixa energia (cerca 50eV). Elétrons retroespalhados atingem uma profundidade maior, pois sua energia é a mesma de elétrons primários. Os raios-X interagem com o volume total da amostra.

O tamanho do volume de interação é dependente da tensão de aceleração dos elétrons primários e o número atômico dos átomos próximos à superfície. Átomos pesados desaceleraram o feixe mais do que átomos de elementos leves e, portanto, reduzem o volume de interação^[52].

3.5.4 Calorimetria exploratória diferencial – Método StepScan

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica que indica como propriedades do material, geralmente a capacidade térmica, sofrem alterações com a temperatura. É usada em muitos tipos de indústrias farmacêuticas e alimentícias, de polímeros a nanomateriais. O aparelho de DSC fornece informações de comportamentos amorfos e cristalinos, polimorfos e transições eutéticas, cura e grau de cura, e muitas outras propriedades usadas para *design*, manufatura e controle de qualidade^[54].

Neste trabalho foi utilizado o aparelho com compensação de potência apresentado na Figura 3-22, que envia um sinal elétrico para o amplificador que aquece as células em uma taxa de aquecimento constante linear. Matematicamente é expresso por:

$$T_{av} = \frac{T_s + T_r}{2}$$

Eq. (3-2)

Onde T_{av} é a temperatura avaliada, T_s a temperatura da amostra e T_r a temperatura de referência.

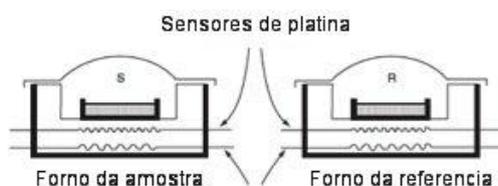


Figura 3-22 - Desenho esquemático do DSC por compensação de potência exibindo os fornos e os sensores. Adaptado de MENCZEL AND PRIME^[55].

O conceito de funcionamento deste instrumento baseia-se em manter iguais as temperaturas de referência (R) e da amostra (S). Isto é conseguido através da colocação dos sensores de temperatura (termopares de ródio-platina) de um circuito em série.

O controle do sistema é dado por dois circuitos, onde o primeiro controla a temperatura média, de forma que a amostra e a referência possam ser aquecidas ou resfriadas a uma certa velocidade, e o segundo faz com que a potência tenda a restaurar o equilíbrio de

temperatura entre a amostra em relação à referência, caso haja diferença. Sendo assim é medida a diferença de calor transmitida entre a referência e a amostra. Quando uma amostra de massa conhecida é aquecida ou resfriada, as mudanças na sua capacidade térmica (C_p) são determinadas como mudanças no fluxo de calor^[55]. A Figura 3.23 mostra os picos característicos obtidos pelo DSC.

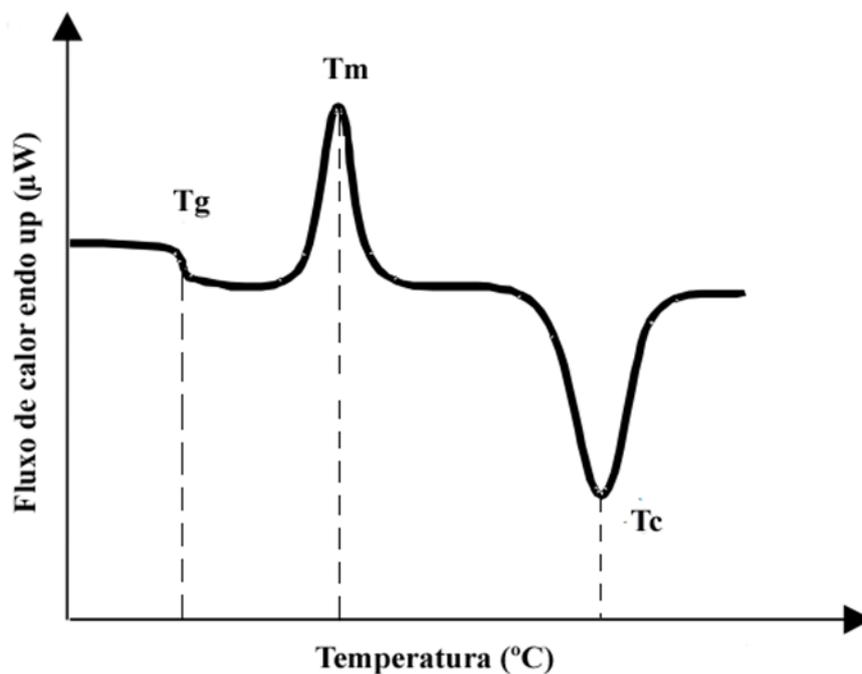


Figura 3-23 - Curva típica de DSC exibindo picos e degraus característicos de transições de fase. Transição vítrea, representado por Tg, é caracterizada por um degrau. O pico endotérmico, Tm, apresenta a temperatura de fusão. O pico exotérmico, Tc, caracteriza a temperatura de cristalização. Adaptado de RAMOS^[56].

A análise por DSC possui uma técnica de temperatura modulada (TMDSC), onde há a possibilidade de “investigação semi-isotermal de mudança da capacidade de calor durante procedimentos de recozimento ou reações químicas”, havendo uma combinação de aquecimento linear e periódico, possibilitando a vantagem de boa resolução de temperatura na diminuição da velocidade de varredura e maior sinal de saída devido às rápidas oscilações^[57].

O sinal de fluxo de calor é composto por várias etapas, mas o DSC tradicional mede apenas a soma das etapas e apresenta o gráfico dessa soma. Com TMDSC, múltiplos sinais são gerados de uma única experiência de modo que cada um dos componentes do sinal de

fluxo de calor total possa ser mostrado e analisado independentemente^[58]. A Figura 3.24 apresenta curvas típicas de DSC e TMDSC.

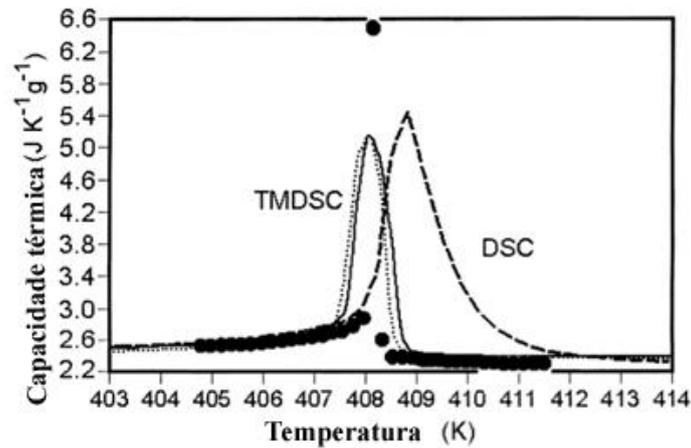


Figura 3-24 – Curvas de DSC normal e TMDSC da Isotropização de cristais líquidos nemáticos. Adaptado de WUNDERLICH & BOLLER *et al.*^[59].

3.5.4.1 StepScan

StepScan é um aplicativo para uso com DSC de compensação de energia patentado pela Perkin Elmer. É também considerada uma técnica de temperatura modulada. Aplica-se uma série de intervalos curtos de aquecimento ou resfriamento e passos isotérmicos para cobrir a faixa de temperatura de interesse.

Com o StepScan, dois sinais são obtidos simultaneamente. O sinal de capacidade térmica (C_p) que representa os aspectos reversíveis do material como a transição vítrea, enquanto que o sinal de dados cinéticos chamado de Iso K, reflete transições de natureza irreversível (processos lentos) durante o aquecimento, tais como relaxamento ou cristalização. A equação que descreve a resposta de fluxo de calor é dada por:

$$dQ/dt = C_p (dT/dt) + f(t,T) \quad \text{Eq. (3-3)}$$

Onde dQ/dt é o fluxo do calor, C_p é a capacidade térmica (calor específico \times massa), dT/dt é a taxa de aquecimento e, $f(t,T)$ é a resposta cinética.

Além de ser altamente quantitativo e mais simples de interpretar, a vantagem do StepScan para o DSC normal e TMDSC é de que não necessita de deconvoluções matemáticas (transformada de Fourier) e identifica mais claramente os eventos de T_g ^[54].

A Figura 3.25 mostra um gráfico típico utilizando o método StepScan, onde a amostra exibe uma transição vítrea com relaxamento entálpico. O sinal de capacidade termodinâmica (C_p termodinâmico), fornece a T_g . O relaxamento entálpico, então, é indicado pelo conjunto de dados de linha de base IsoK^[60].

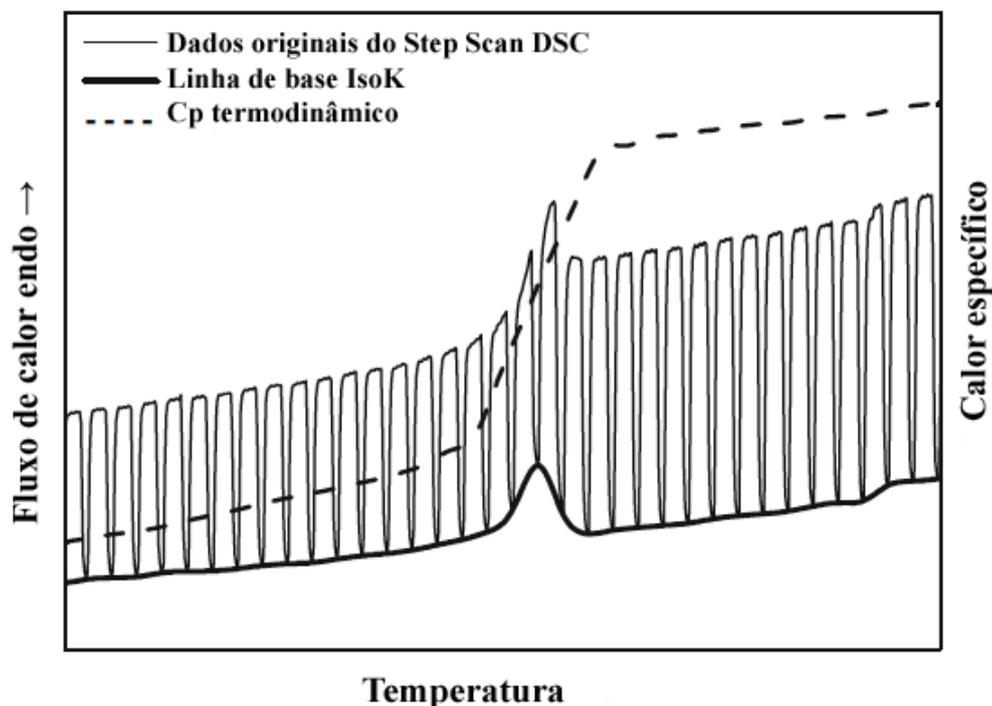


Figura 3-25 - Gráfico da curva típica do método StepScan. Adaptado por LAPPALAINEN^[60].

3.6 Reologia

A Reologia foi definida como uma propriedade que estuda o fluxo e deformação de materiais, conceito aceito quando a Sociedade Americana de Reologia foi fundada em 1929^[61]. Segundo conceito mais amplo, Reologia é um ramo independente de ciências naturais, estando sua definição mais próxima com a mecânica dos meios contínuos que se baseiam na deformação e fluxo da matéria^[62]. Existem dois tipos básicos de fluxo com o movimento relativo das partículas do líquido, eles são chamados de fluxos de cisalhamento e

fluxos extensionais. Em fluxo de cisalhamento, partículas adjacentes ao líquido fluem umas sobre as outras, enquanto que no fluxo extensional, partículas adjacentes fluem em direção ou distantes umas das outras, como mostra a Figura 3.26.

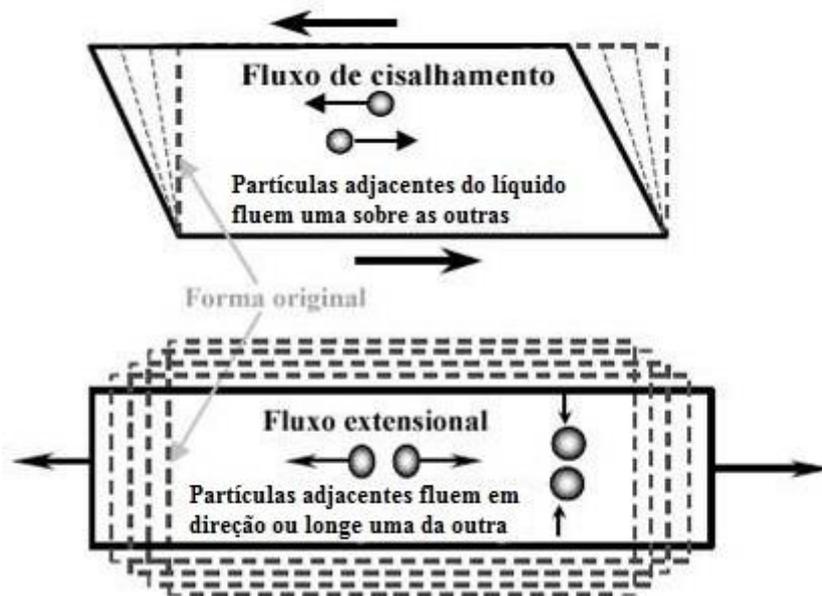


Figura 3-26 - Movimento das partículas do fluxo de cisalhamento ou fluxo extensional. Adaptado de BARNES^[63].

A Figura 3.27 mostra o fluxo de cisalhamento em analogia com o movimento de camadas hipotéticas deslizando umas sobre as outras. No caso mais simples, a velocidade de cada camada aumenta linearmente comparada à sua vizinha abaixo, de modo que as camadas situadas duas vezes de distância de qualquer borda estacionária se movimentam com o dobro da velocidade.

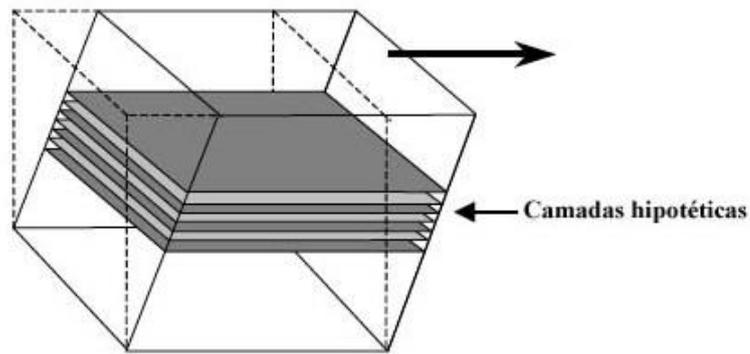


Figura 3-27 - Modelo apresentando camadas hipotéticas para ilustrar o fluxo de cisalhamento. Adaptado de BARNES^[63].

O gradiente da velocidade na direção perpendicular ao fluxo é chamada de taxa de cisalhamento (gradiente de velocidade ou velocidade de deformação), e a força por unidade de área, criada ou produzida pelo fluxo, é chamada de tensão de cisalhamento. A taxa de cisalhamento é V/h , e é descrita pelo símbolo $\dot{\gamma}$, enquanto a tensão de cisalhamento é dada por F/A e representada pelo símbolo σ , unidade Newton por metro quadrado, $N.m^{-2}$. No Sistema Internacional de Unidades (SI), tensão, como a pressão, é dada em unidades pascal (Pa). A taxa de cisalhamento tem as unidades de velocidade divididas pela distância, tendo sua unidade em segundo recíproco, ou s^{-1} ^[63].

A caracterização reológica se baseia na resposta de taxa, tensão ou deformação aplicadas. Os materiais podem ser reologicamente classificados como elástico, viscoso e viscoelástico. Os elásticos, também chamados de sólidos ideais, armazenam energia durante a deformação e quando a carga é removida, retornam à forma original usando essa energia. Já os viscosos, também chamados de líquidos ideais, não armazenam energia, e sim dissipam na forma de calor. Materiais viscoelásticos exibem uma combinação de efeitos elásticos e viscosos simultaneamente^[64].

3.6.1 Lei de Newton da Viscosidade

Considere um fluido entre duas placas paralelas planas, de área A , separada por uma distância h . Uma força \vec{F} é aplicada na placa superior, fazendo com que a placa entre em movimento, a uma velocidade u constante em relação à placa inferior, que é mantida fixa. A viscosidade é determinada a partir de um experimento em que camadas de fluido deslizam

umas sobre as outras ao longo de uma determinada direção. Esse ensaio é chamado de escoamento de Couette e é representado conforme a Figura 3.28.

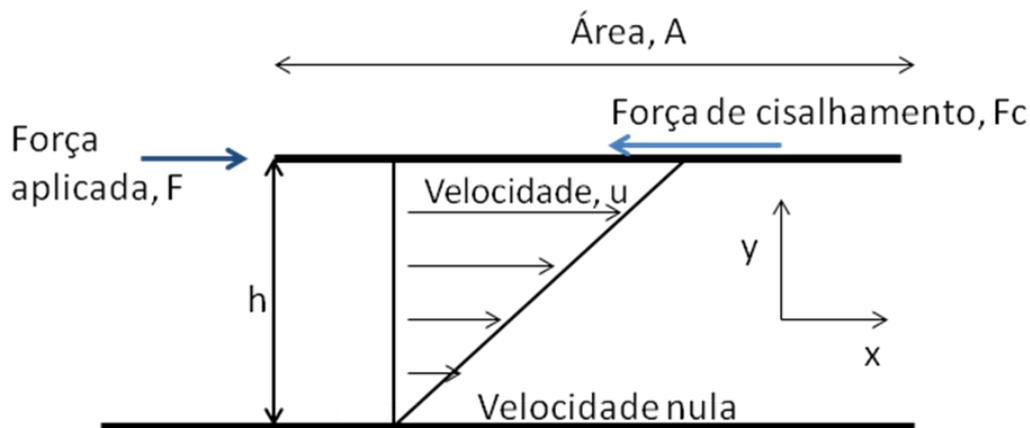


Figura 3-28 - Representação esquemática do escoamento de Couette entre duas placas paralelas. Adaptado de SANTOS^[65].

A força \vec{F} dá origem a uma força com a mesma intensidade, mas de sentido contrário, chamada força de cisalhamento ou força de corte (\vec{F}_c), que se desenvolve devido às forças de coesão do fluido sobre as paredes da placa e entre as camadas de um fluido, assumindo que o escoamento ocorre laminarmente. A força de cisalhamento dá origem a um gradiente de velocidade, du/dy , entre as placas que, no caso do escoamento ser laminar, em regime estacionário só depende da ordenada do ponto a ser analisado, y ^[65].

3.6.2 Tipos de fluido

Classifica-se de acordo com seu comportamento quanto à relação entre a tensão de cisalhamento e taxa de deformação^[64].

Um fluido newtoniano é aquele cuja a viscosidade é constante e embora varie com temperatura e pressão, não varia com a taxa de deformação e com o tempo. Abrange todos os gases e líquidos não poliméricos e homogêneos.

Já os fluidos não newtonianos, a relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento não é constante. Os fluidos não newtonianos ainda podem ser classificados em viscoelásticos, dependentes e independentes do tempo. Dentre eles o fluido de Herschel-Bulkey, também chamado de Bingham generalizado, necessita de uma tensão inicial para

começar a escoar. A relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação não é linear. Esta relação depende de um expoente adimensional n , característico para cada fluido. O fluido de Bingham apresenta uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, a partir do momento em que se atinge uma tensão de cisalhamento inicial. Os fluidos pseudoplásticos, em repouso, apresentam suas moléculas em um estado desordenado, e quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. Quanto maior esta força, maior será a ordenação e, conseqüentemente, menor será a viscosidade aparente. Os fluidos dilatantes apresentam um aumento de viscosidade aparente com a tensão de cisalhamento. No caso de suspensões, à medida que se aumenta a tensão de cisalhamento, o líquido intersticial que lubrifica a fricção entre as partículas é incapaz de preencher os espaços devido a um aumento de volume que freqüentemente acompanha o fenômeno. Ocorre, então, o contato direto entre as partículas sólidas e, conseqüentemente, um aumento da viscosidade aparente^[66].

O gráfico da Figura 3.29 apresenta as relações entre a taxa de deformação de diferentes fluidos com a tensão de cisalhamento.

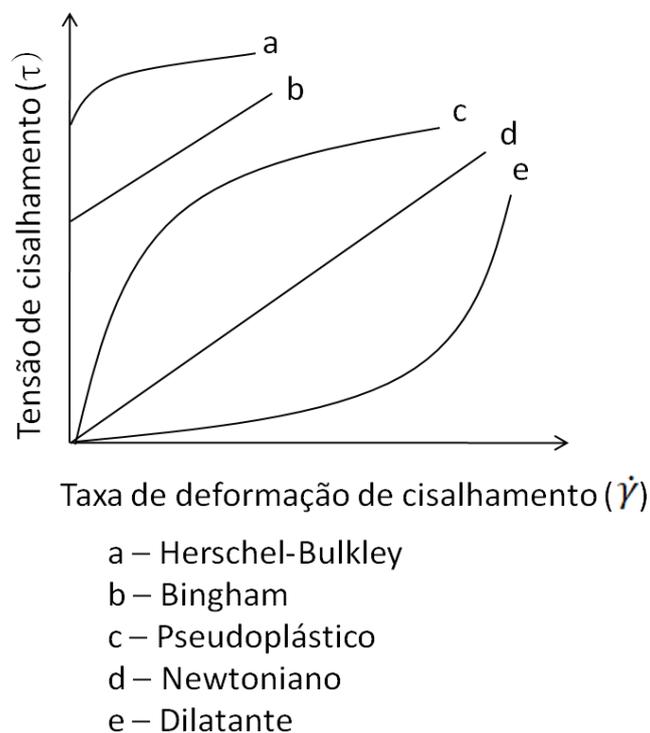


Figura 3-29 - Gráfico representa os tipos de fluidos de acordo com seu comportamento^[65].

3.6.3 Limite de escoamento ou tensão de cedência

É definido como a mínima tensão demandada para iniciar o fluxo do fluido em questão. Segundo Barnes^[67], o escoamento do material ocorre em uma faixa de valores de tensão e não em uma única tensão, como a Figura 3.30 indica.

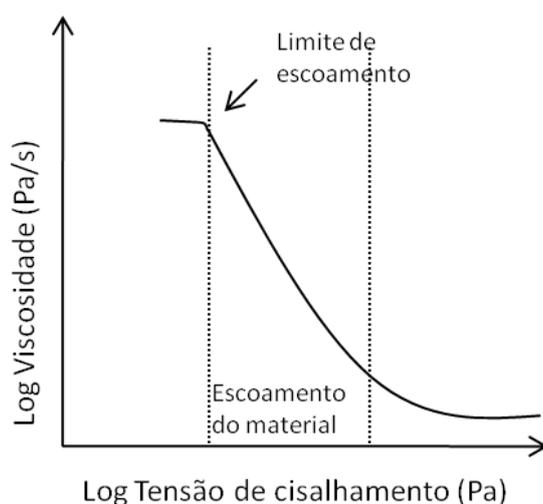


Figura 3-30 - Representação gráfica da definição do limite de escoamento nos materiais. Adaptado de Barnes^[67].

3.6.4 Utilização do sensor de cisalhamento Vane

O uso da geometria rotacional do sensor de cisalhamento Vane para medir propriedades de fluidos não newtonianos vem aumentando pela facilidade de preparação, fácil limpeza e eliminação de alguns efeitos de parede. Apresenta boas medidas especialmente quando combinados com reômetros de tensão de cisalhamento controlada.

A Figura 3-31 apresenta o sensor de cisalhamento Vane com sua geometria.

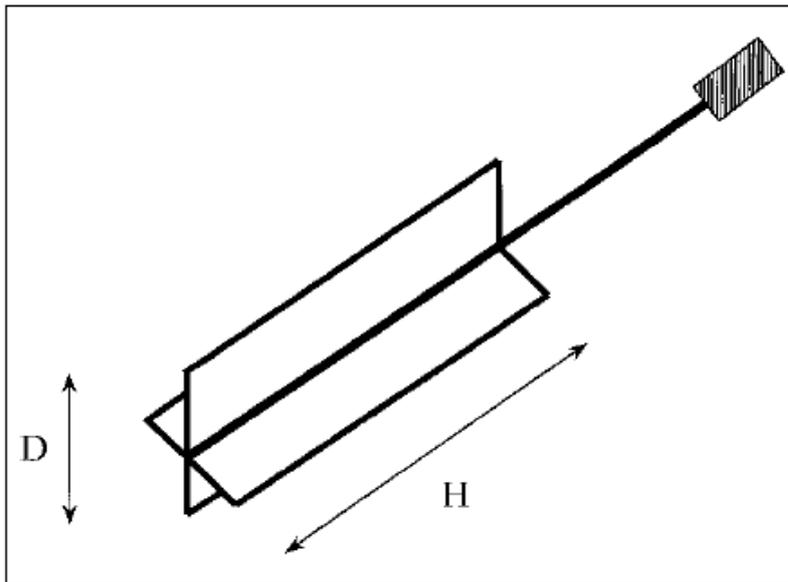


Figura 3-31 – Sensor de cisalhamento Vane. ^[68].

Com o método do sensor de cisalhamento Vane, uma simples fórmula é usada para calcular o limite de escoamento levando em consideração que este age uniformemente tanto dos lados quando nas extremidades do cilindro de fluido formado quando o sensor de cisalhamento Vane é posto em funcionamento. O torque total dos lados do cilindro equivale a $2\pi\sigma_0la^2$ e $4\pi\sigma_0a^3/3$ as extremidades^[69]. O limite de escoamento é dado pela Equação 3-4.

$$\sigma_0 = \frac{M}{2\pi a^3} \left(\frac{1}{a} + \frac{1,20}{1,51} \right) -1 \quad \text{Eq. (3-4)}$$

O uso do sensor de cisalhamento Vane apresenta vantagens e limitações que são listadas na Tabela 3-4^[64].

Tabela 3-4 - Comparação das vantagens e limitações do uso do Sensor de cisalhamento Vane^[64].

	Vantagens	Limitações
1	Eliminação dos efeitos de parede. Superfície de escoamento ou cisalhamento está presente no material eliminando o deslizamento pelas paredes.	Em velocidades rotacionais mais elevadas há possibilidade de surgimento de fluxo secundário entre a área de deslizamento e o sensor de cisalhamento Vane.
2	Mínimo distúrbio na amostra. As lâminas finas do sensor de cisalhamento Vane causam danos mínimos podendo ser testados géis fracos, materiais tixotrópicos ou materiais espumosos.	Fluidos com viscosidades baixas com efeito de inércia tornam-se mais salientes causando vórtices e a dissipação da energia desses pode indicar maior viscosidade.
3	Maior lacuna proporciona menos problemas frequentes de materiais particulados e reduz muito o aquecimento viscoso entre a base do rotor (sensor de cisalhamento Vane) e o copo.	Material com um valor mínimo de limite de escoamento (cerca de 10 Pa) é adequado. O valor mínimo depende do número de lâminas do sensor de cisalhamento Vane.
4	Rápida determinação do limite de escoamento.	Quando há saliência da amostra na borda, o sensor de cisalhamento Vane não pode ser usado devido às restrições de sua geometria.
5	Taxas de cisalhamento maiores que a geometria do cone placa e Couette podem ser obtidas devido ao deslizamento mínimo e à maior área de superfície.	O sensor de cisalhamento Vane não é extremamente confiável na avaliação de fluidos não newtonianos contendo alta quantidade de sólidos, mesmo em taxas de cisalhamento muito baixas. Maiores áreas de superfície requerem maior quantidade de amostra, o que não é o caso de amostras de maior custo.

6	Possível executar em medições de limite de escoamento <i>in situ</i> .	
7	Preparação de amostra simples.	
8	Fixação simples e facilmente fixado em reômetros já existentes.	
9	Preparação simples e fácil limpeza.	

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Seleção e preparo dos géis

4.1.1 Gel de colágeno

Para a escolha das amostras para ensaio, foram testados, respectivamente: gelatina comercial em pó sem sabor, colágeno tipo I de tendão bovino Sigma Aldrich, colágeno tipo I em pó e fibras de tendão bovino gentilmente cedidos pela empresa Novaprom®. Ao utilizarmos a gelatina comercial em pó sem sabor, a formação de algumas impurezas foram observadas no teste de gelificação, as quais poderiam intervir no resultado dos demais ensaios, motivo pelo qual foi descartada. As amostras da Sigma Aldrich e colágeno tipo I em pó da Novaprom® não gelificaram, por isso foram descartadas também. O colágeno em fibras na Novaprom® apresentou comportamento gelificante, portanto foi selecionado para os ensaios.

O gel foi preparado em três etapas: primeiramente, foi solubilizado em uma solução de ácido acético 0,02M pH 2,0 de modo que a concentração final foi de $6,7 \pm 0,5\%$. A concentração de 6,7 foi escolhida pois é utilizada para medir a força de gel, força necessária para penetrar 4mm da superfície do gel de gelatina^[70]. Logo a solução foi aquecida a 60°C por 60 minutos em banho termostático (TC-500, Brookfield). Em seguida foi centrifugada (Mikro 220R, Hettich Zentrifugen) por 15 minutos em rotação de 2500 rpm (660g) a 40°C (Amostra C1). O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 0,05M. Para o ensaio com adição de HU (HU 98%, M/S Sigma Aldrich), utilizou-se a dosagem de HU considerando a dose máxima que pode ser ministrada em pacientes com anemia falciforme - 35mg/Kg de peso corporal. Para cálculo da quantidade de HU que seria adicionada, foi considerado um adulto de 70Kg com quantidade de sangue igual à 5 litros. A Figura 4.1 apresenta um desenho esquemático do preparo dos géis.

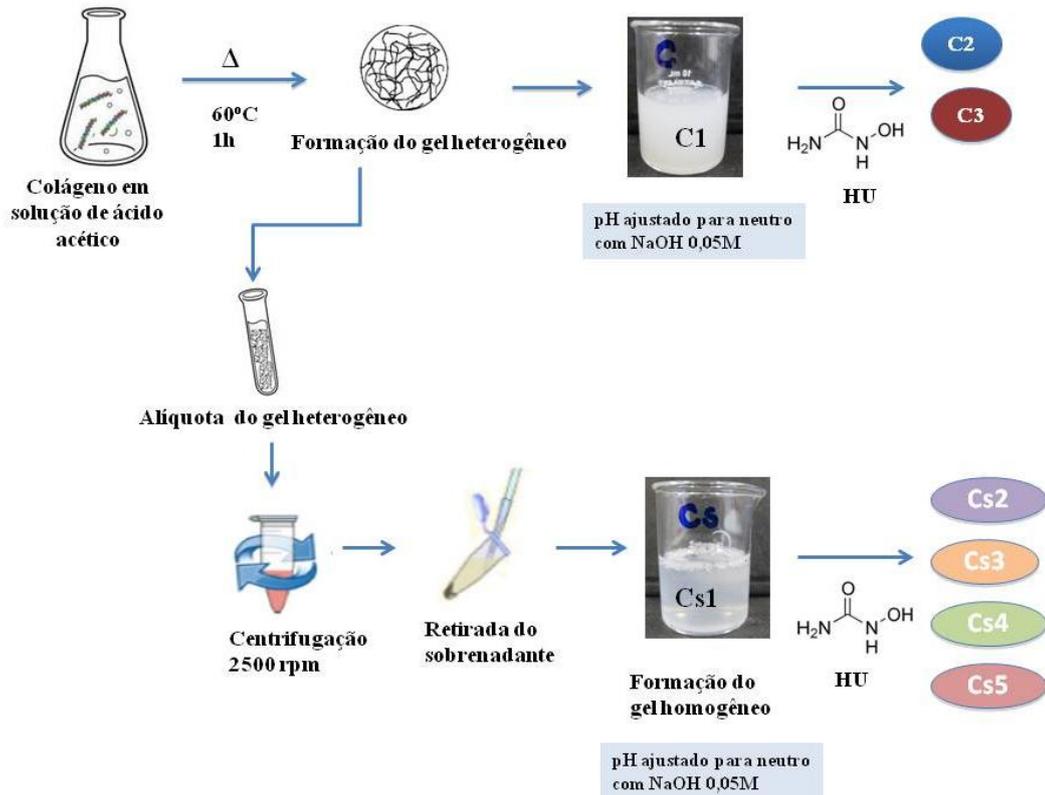


Figura 4-1 - Esquema de preparo dos géis a partir das fibras de colágeno tipo I.

Foram produzidos dois tipos de géis: um gel opaco heterogêneo com partículas em suspensão com concentração de $6,7 \pm 0,5\%$ m/v e outro transparente homogêneo de concentração à definir. As amostras foram nomeadas de acordo com a Tabela 4-1.

Tabela 4-1 - Identificação dos géis

Código da amostra	Concentração de HU (mg/mL)	Concentração de HU em relação à dose máxima permitida	Descrição do gel quanto sua uniformidade	Ensaio realizados
C1	0	0	Heterogêneo	DSC e MEV
C2	20	40x	Heterogêneo	DSC e MEV
C3	40	80x	Heterogêneo	DSC e MEV
Cs1	0	0	Homogêneo	DSC e MEV
Cs2	0,49	1x	Homogêneo	Reômetro e Viscosímetro
Cs3	0,98	2x	Homogêneo	Reômetro e Viscosímetro
Cs4	20	40x	Homogêneo	DSC e MEV
Cs5	40	80x	Homogêneo	DSC e MEV

4.1.2 Gel de hemoglobina

Hemoglobinas bovina e suína liofilizadas (Sigma Aldrich) foram reticuladas com solução de glutaraldeído 1% com concentração final de hemoglobina de 60mg/mL. Para o ensaio com adição de HU utilizou-se a dosagem de 20mg/mL e 40mg/mL. As amostras foram identificadas conforme a Tabela 4-2.

Tabela 4-2 - Identificação dos géis com apresentação dos seus respectivos códigos e suas descrições.

Amostra	Descrição	Concentração de hidroxiuréia (mg/mL)
HVn1	Gel de hemoglobina bovina	0
HVn2	Gel de hemoglobina bovina	20
HVn3	Gel de hemoglobina bovina	40
HSn1	Gel de hemoglobina suína	0
HSn2	Gel de hemoglobina suína	20
HSn3	Gel de hemoglobina suína	40

A Figura 4.2 mostra um esquema da preparação dos géis de hemoglobinas bovina e suína.

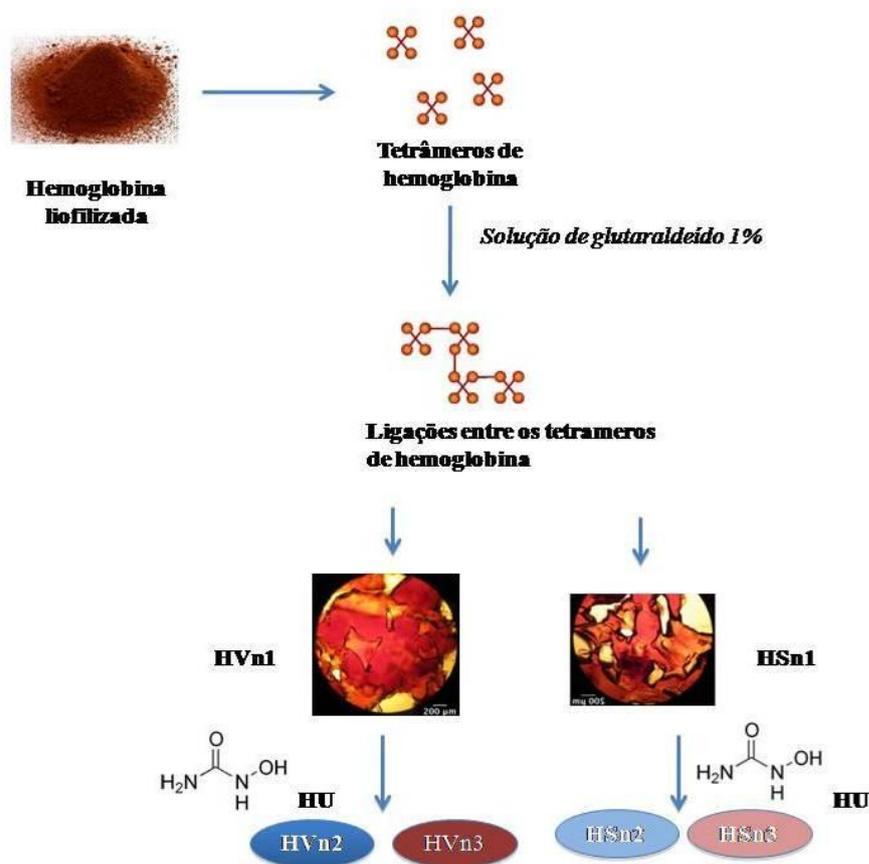


Figura 4-2 - Quadro esquemático da preparação de géis de hemoglobinas bovina e suína.

A estrutura de alguns géis de hemoglobina tornou-se muito rígida, permitindo apenas sua avaliação através dos ensaios de MEV e DSC.

4.2 Ensaio de espectroscopia na região UV-Vis

A quantidade de colágeno presente na solução pode ser estabelecida por determinação de proteínas totais pelo método de Biureto^[71-77] através da espectroscopia no ultravioleta visível (UV/VIS). Os íons de cobre (Cu^{2+}) em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas do colágeno formando uma cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545nm, proporcional à concentração do colágeno na amostra. O espectrofotômetro UV/VIS Lambda 20 operado pelo software UV WinLab da Perkin Elmer juntamente com o

monorreagente de proteínas totais (marca Bioclin) foram utilizados. Amostras dos géis de colágeno preparadas a partir da alíquota do sobrenadante retirada no preparo dos géis foram analisadas em triplicata e sua concentração determinada através da curva analítica. A concentração de colágeno presente na amostra foi determinada através da equação da curva.

4.3 Ensaio de microscopia ótica

Os géis foram colocados em lâminas próprias para microscópio ótico (DMLS, Leica Microsystems) e depois foram cobertos com lamínulas para evitar a formação de ar. Após esta etapa, os géis foram levados ao microscópio e observados pelas objetivas de 4x, 10x, 40x e 100x. A Figura 4.3 mostra uma fotografia do microscópio utilizado.



Figura 4-3 - Microscópio ótico.

4.4 Ensaio de microscopia eletrônica de varredura

4.4.1 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas seguindo o protocolo de Souza^[77]. Os géis foram colocados em lamínulas circulares previamente imersas em solução de Poly-L-Lisina para aumentar a adesão. Em seguida foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato 0,1M (fixador primário) por no mínimo 1 hora; o fixador foi removido e as amostras lavadas 3x por 10 minutos em tampão cacodilato 0,1M; em seguida as amostras foram imersas no fixador secundário, tetróxido de ósmio 1,0%, por 1 hora. Foram lavadas novamente 3x por 10 minutos em tampão cacodilato 0,1M, depois imersas em solução de ácido Tânico 1% em tampão cacodilato 0,1M por 20 minutos e lavadas novamente 3x por 10

minutos em tampão cacodilato 0,1M; foram imersas no fixador secundário novamente por 1 hora; e lavadas 3x por 10 minutos em água destilada. As amostras foram desidratadas em solução de álcool etílico utilizado, por sequência, nas seguintes concentrações: 35%, 50% e 95% por 10 minutos; em álcool etílico puro foram lavadas 3x por 10 minutos. A secagem foi realizada no ponto crítico de CO₂. As amostras foram montadas em suportes de alumínio (*stubs*) usando cola de carbono, posicionando a lamínula com os géis aderidos sobre a fita de carbono. A metalização foi realizada com ouro/3nm de espessura à 6nA. Os *stubs* foram colocados no disco de análise do MEV (Vega 3 SEM, Tescan) e as imagens foram obtidas. A Figura 4-4 apresenta o modelo de MEV utilizado em nossos ensaios.



Figura 4-4 - Microscópio eletrônico de varredura usado para os ensaios.

4.5 Ensaios reológicos

4.5.1 Rêometro R/S

O gel utilizado foi proveniente da alíquota retirada da parte sobrenadante Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU) (Ver Tabela 4-1). A rotação, tempo e temperatura utilizados para essa análise foram selecionados pelo software RHEO3000 com um banho termostaticado (TC 500, Brookfield) acoplado. O equipamento utilizado foi um reômetro rotacional de cilindros concêntricos da Brookfield, modelo R/S CC mostrado na Figura 4.5. O equipamento forneceu os dados de tensão de cisalhamento e taxa de deformação através do software RHEO3000.



Figura 4-5 - Reômetro rotacional de cilindros concêntricos.

Foi utilizado o sensor Sensor de cisalhamento Vane V-80-40. Uma alíquota de 200mL foi colocada no copo de amostra e a temperatura foi elevada a 40°C por 15 minutos com taxa de cisalhamento 0,7rpm. Logo em seguida foi levado à 19°C sem rotação por 10 minutos. Nessa mesma temperatura foi aplicada uma taxa de cisalhamento de 0,7rpm por 90 minutos.

A Figura 4-6 apresenta um esquema da utilização do Sensor de cisalhamento Vane, bem como o copo de amostra utilizado no trabalho em questão.

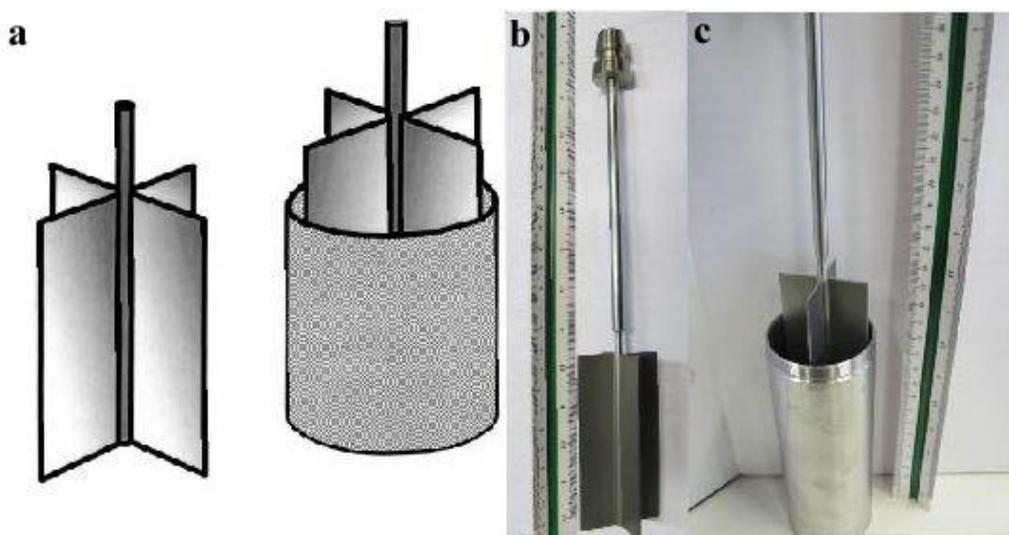


Figura 4-6 - Desenho do Sensor de cisalhamento Vane com quatro lâminas e sua disposição no copo de amostra (a) e as fotos do Sensor de cisalhamento Vane e copo utilizados (b, c).

4.5.2 Viscosímetro do tipo cone placa

Alíquotas de 500 μ L da parte sobrenadante dos géis de colágeno sem HU e com HU com todas as concentrações descritas na Tabela 4-1 foram utilizadas neste ensaio. As amostras foram medidas à temperatura de 37°C com viscosímetro Brookfield (Brookfield Engineering Inc., modelo DV-II), apresentado na Figura 4-7, usando taxas de cisalhamento de 5,25; 7,5; 56,25; 90; 112,5; 150; 375; 750; 1350; 1500 s⁻¹ com *spindle* CPE-40. Somente resultados com o torque maior que 10% foram considerados e em algumas taxas de cisalhamento o torque máximo superado não havendo a possibilidade de resposta.



Figura 4-7 - Viscosímetro cone placa da Brookfield modelo DVII

As amostras iniciais foram medidas após 3 minutos depois do contato do *spindle* para atingir o equilíbrio térmico. Todas as medidas foram tomadas em duplicata depois de 30 segundos e a média destas foram consideradas.

4.6 Ensaio de perda de massa

Uma alíquota de 30mL da parte sobrenadante das amostras de géis de colágeno sem HU (Cs1) e com HU (Cs2 e Cs3), em triplicada, foram pesadas antes e depois do tratamento dado

nos ensaios durante um período de 12 dias. O teste foi realizado para verificar a quantidade de solvente que volatiliza durante os ensaios.

4.7 Calorimetria exploratória diferencial

Amostras de géis foram pesadas ($\pm 15\text{mg}$) e seladas em cadinhos de alumínio. Um cadinho vazio foi usado como amostra de referência. O calorímetro de compensação de potencia Pyris 1 operado pelo software Pyris Perkin Elmer foi usado. Primeiramente foi levado à temperatura de -10°C por 60 segundos. Em seguida foi aplicado o método de StepScan: duração do segmento da isoterma de 60 segundos, o intervalo de temperatura foi de 3°C , taxa de aquecimento de $2^{\circ}\text{C} \times \text{min.}^{-1}$ e critério de equilíbrio ($\pm 0.05\mu\text{W}$). A temperatura final foi de 40°C mantida por 60 segundos. A linha de base necessária para os cálculos foi medida da mesma maneira porém com cadinhos vazios. Os dados de condutividade térmica da panela foram utilizados para a correção da diferença da amostra e referência. A Figura 4-8 apresenta o sistema de análise térmica.

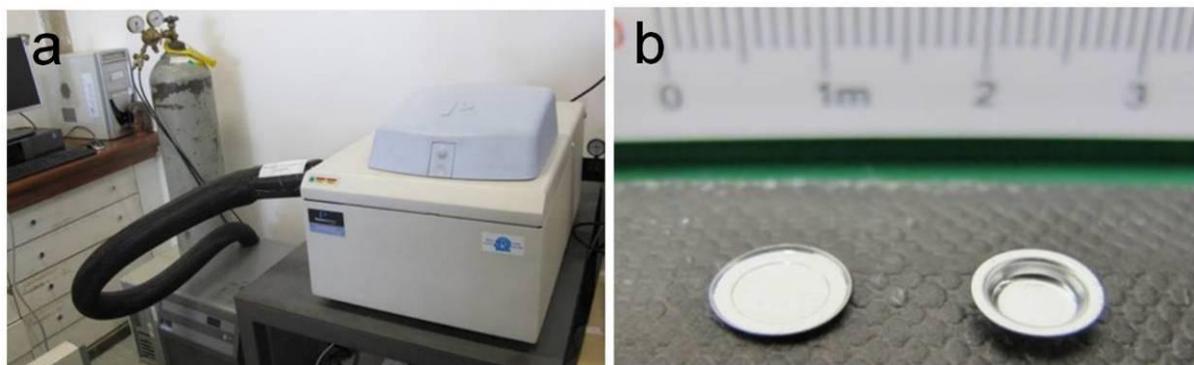


Figura 4-8- Montagem do sistema de análise térmica com (a) aparelho DSC e intracooler e (b) cadinho de alumínio usado nos ensaios.

5. Resultados e Discussão

5.1 Ensaio de espectroscopia na região UV-Vis- Determinação da concentração do sobrenadante retirado dos géis.

Para determinar a concentração de colágeno da parte sobrenadante retirada após centrifugação do gel, foi utilizado o método de Biureto para determinação de proteínas totais.

Os valores obtidos pelo espectrofotômetro para as absorvâncias dos padrões externos utilizados para a construção da curva de calibração e para a amostra em questão são apresentados na Tabela 5-1.

Tabela 5-1 – Valores de absorvância no comprimento de onda 545nm para os padrões em concentrações distintas

Solução-padrão	Concentração	Absorvância a 545nm(média)
Branco	0	0
Amostra	X	0,16037
1	2g/dL	0,1482
2	4g/dL	0,2854
3	8g/dL	0,6012
4	12g/dL	0,8631
5	16g/dL	1,1416

A partir dos dados da tabela, foi construída a curva analítica apresentada pela Figura 5-1.

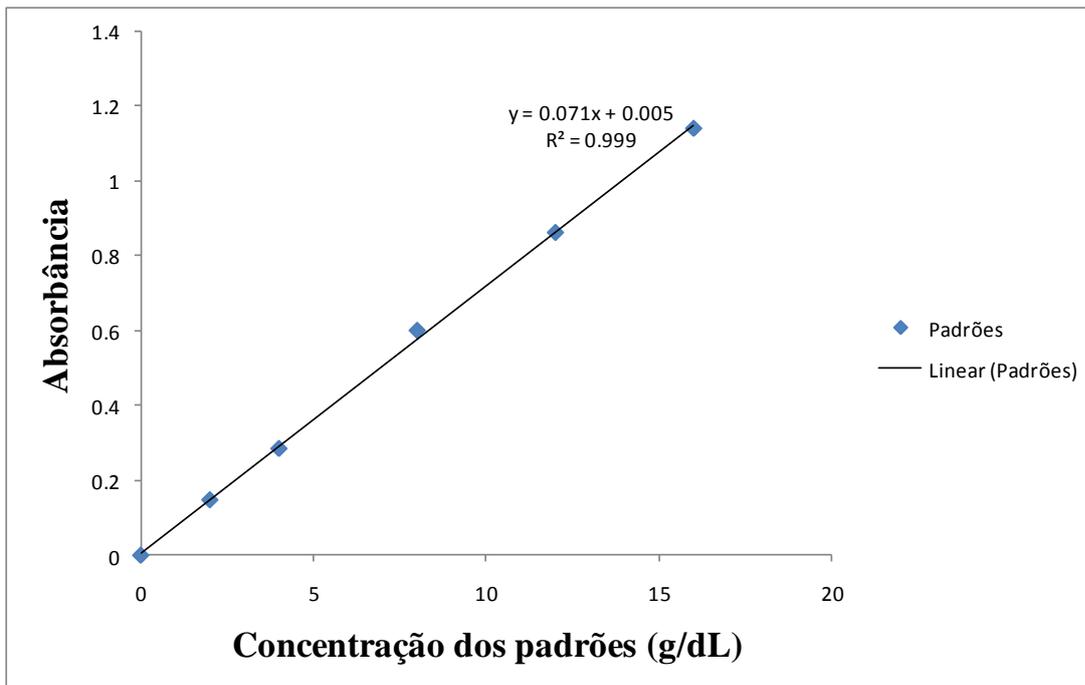


Figura 5-1 - Curva analítica das amostras de géis de colágeno construída de acordo com a resposta do espectrofotômetro.

Utilizando a equação da curva analítica temos:

$$y = 0,071x + 0,005$$

$$y = 2,1883$$

No preparo dos géis descrito anteriormente, após a amostra ser centrifugada, ao se retirar a alíquota sobrenadante, a concentração de colágeno diminui expressivamente, pois sua concentração inicial era igual a $6,7 \pm 0,5\%$ em volume. A unidade g/dL é igual g/100mL, portanto, 2,2g/100mL é igual á $2,2\% \pm 0,5\%$.

5.2 Microscopia ótica

5.2.1 Gel de colágeno

Como os géis de colágeno são translúcidos ou transparentes, necessitam de um corante adequado ou preparação prévia para a investigação ao microscópio ótico. Foi utilizado o corante Comassie Brilliant Blue G, entretanto o resultado não foi satisfatório, ou seja, não foi possível estabelecer uma relação entre as imagens. A Figura 5-2 apresenta algumas imagens obtidas por essa metodologia.

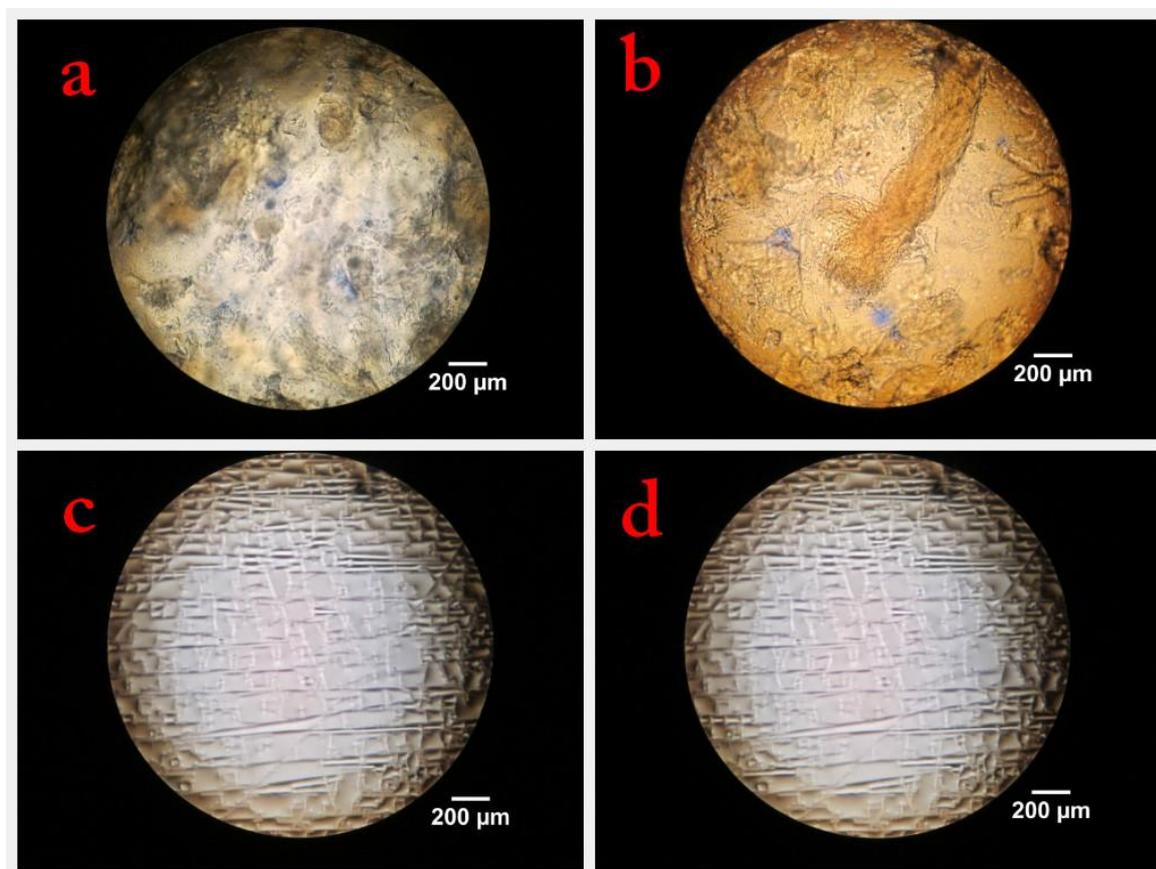


Figura 5-2 – Imagens obtidas por microscopia ótica com aumento de 10x de gel de colágeno (a e b) e gel de colágeno da parte sobrenadante (c e d) com corante Comassie Blue G.

O corante Comassie Brillhant Blue G não foi adequado para essa metodologia.

5.2.2 Géis de hemoglobina bovina e suína

Os ensaios realizados no microscópio ótico para obtenção de imagens dos géis de hemoglobina bovina e suína sem HU, com concentração de HU (20mg/ml) e com o dobro da concentração de HU (40mg/ml), foram executados logo após as amostras gelificarem. As figuras abaixo apresentam as diferenças entre os géis. O gel de hemoglobina bovina sem HU é mostrado na Figura 5-3. É observada a quebra do gel resultante do procedimento de colocá-lo entre uma lâmina e uma lamínula. A dissolução do gel não foi verificada. Os pontos identificados com o número 1 apresentam espaços onde não há a ocorrência de gel e com o número 2 a estrutura do gel.

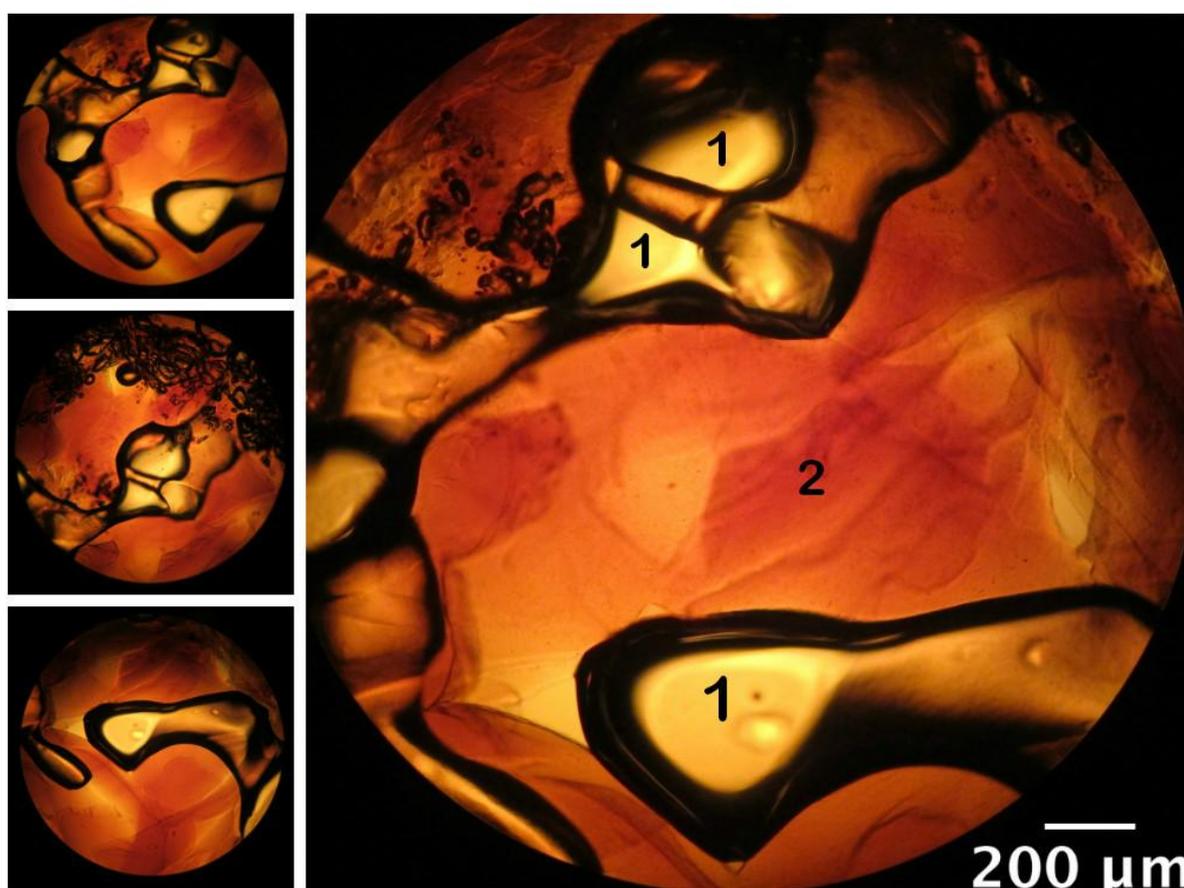


Figura 5-3- Imagens obtidas por microscopia ótica de gel de hemoglobina bovina (HVn1) em solução de glutaraldeído 1% com um aumento de 10x em quatro pontos distintos.

Na Figura 5-4 é apresentado o gel de hemoglobina bovina onde se adicionou 20mg/ml de HU. Pode-se observar pelas imagens que houve a dissolução do gel. Os espaços onde não

há presença de gel são identificados pelo número 1 e onde há uma estrutura do gel pelo número 2.

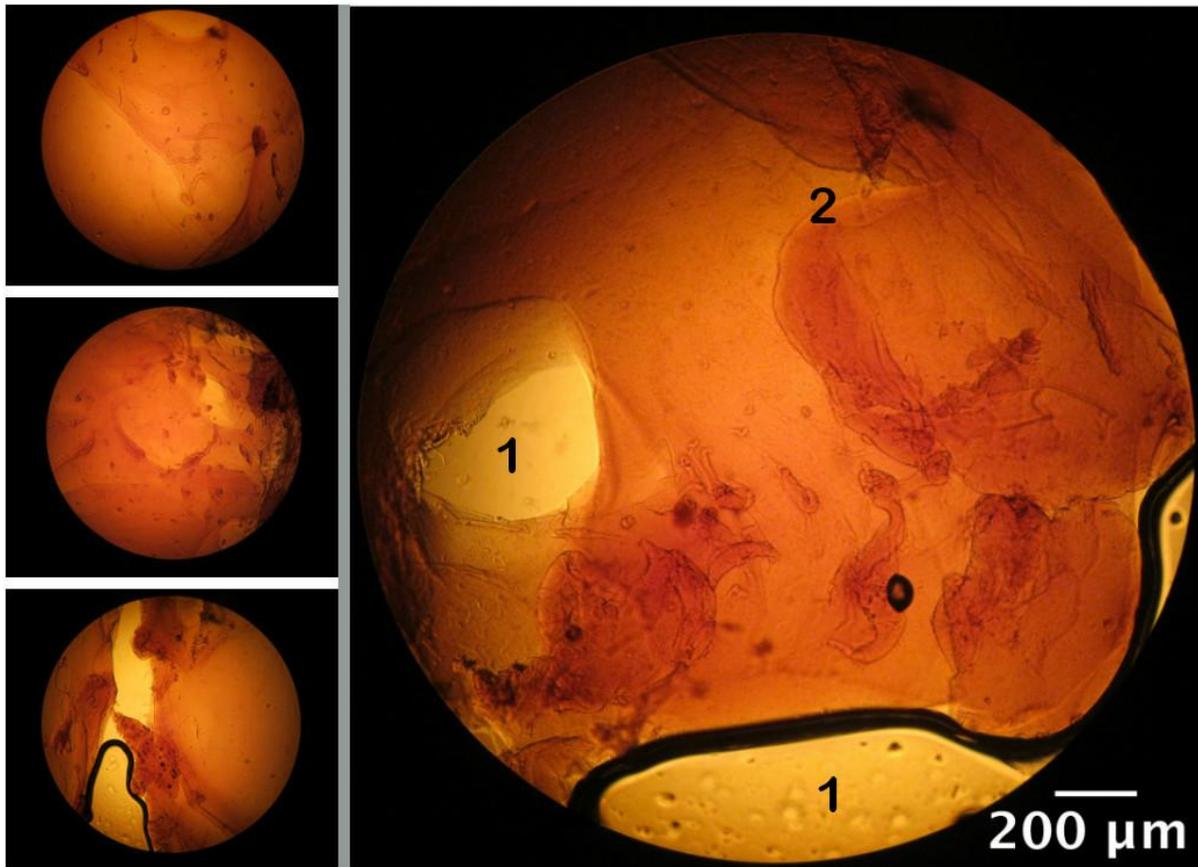


Figura 5-4 - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina bovina (HVn2) em solução de glutaraldeído 1% e 20mg/ml de HU, com um aumento de 10x em quatro pontos distintos.

O gel de hemoglobina bovina com concentração de 40mg/ml é mostrado na Figura 5-5. As imagens evidenciam que o aumento da concentração de HU resulta na dissolução do gel. Assim como o gel apresentado anteriormente, os espaços onde não há presença de gel são identificados pelo número 1 e onde há uma estrutura do gel pelo número 2.

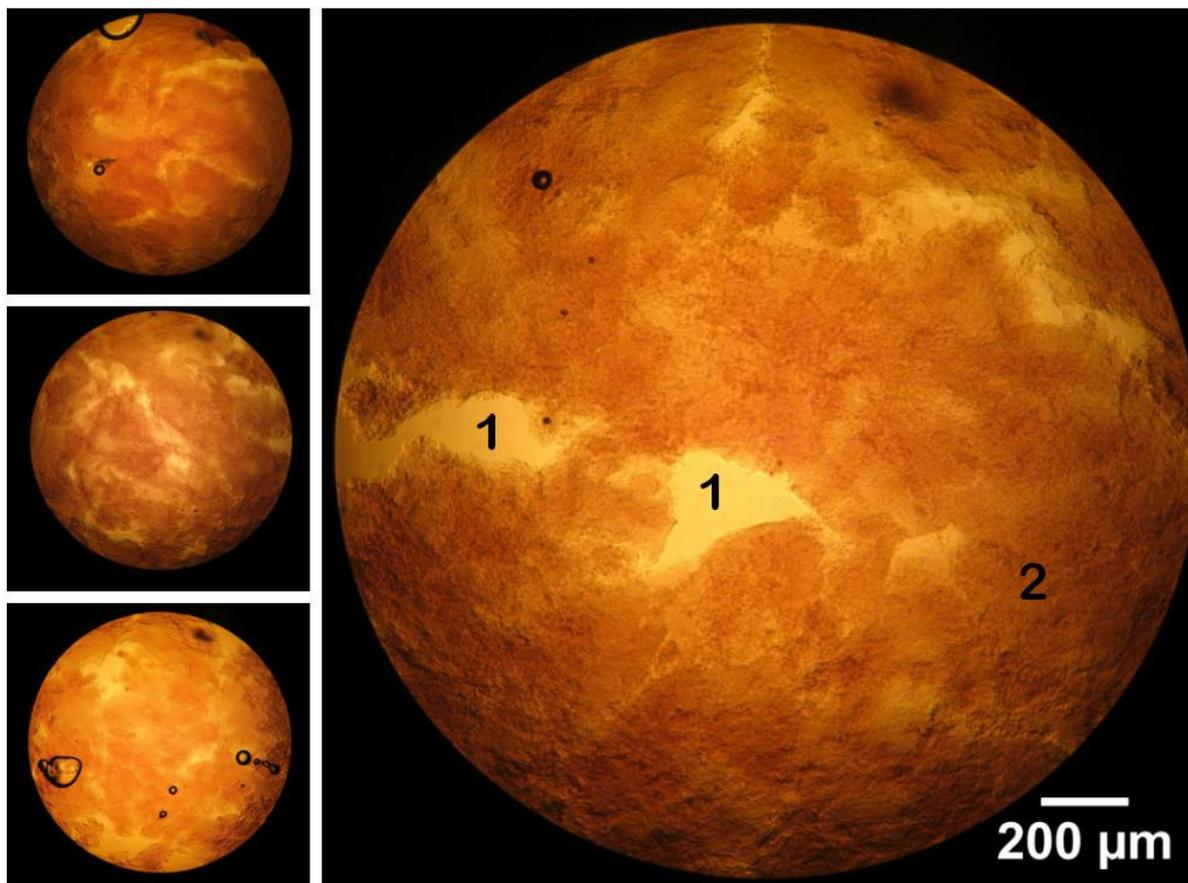


Figura 5-5. - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina bovina (HVn3) em solução de glutaraldeído 1% e 40mg/ml de HU, com aumento de 10x em quatro pontos distintos.

Uma comparação entre os géis de hemoglobina bovina com ou sem HU é apresentada na Figura 5-6. Observa-se a dissolução mais evidente do gel onde há maior concentração de HU.

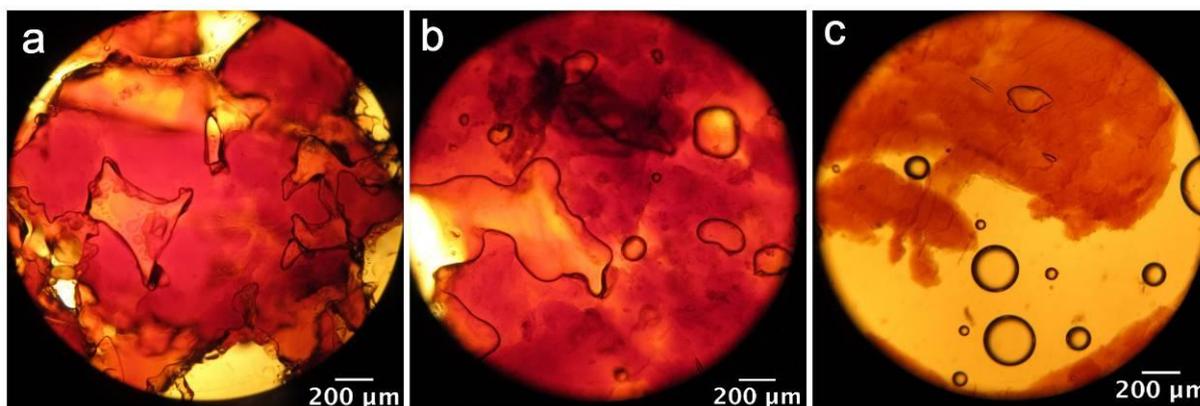


Figura 5-6 - Comparação dos géis de hemoglobina bovina sem HU - HVn1(a), com concentração de HU de 20mg/mL – HVn2(b) e com concentração de HU de 40mg/mL – HVn3(c), ilustrando as alterações em resposta à adição de HU.

O gel de hemoglobina suína sem HU é mostrado na Figura 5-7 apresentando uma estrutura consistente. Assim como o gel de hemoglobina bovina sem HU, a imagem principal mostra a quebra do gel devido aos procedimentos de microscopia. As áreas identificadas com o número 1 representam onde não há presença de gel e a estrutura do gel, indicada pelo número 2.

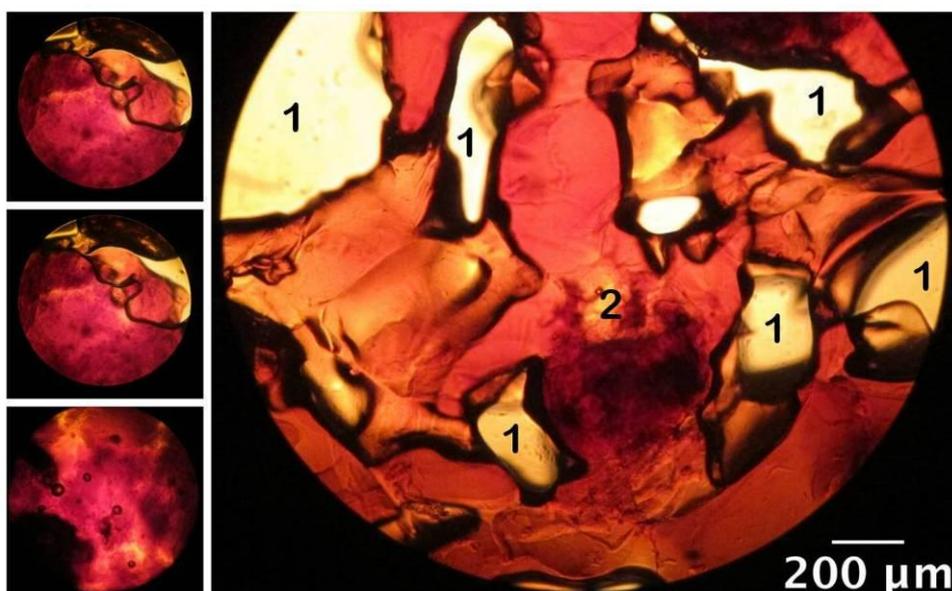


Figura 5-7 - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina suína (HSn1) em solução de glutaraldeído 1% com um aumento de 10x em quatro pontos distintos.

A Figura 5-8 representa o gel de hemoglobina suína com concentração de HU igual à 20mg/ml. Pode-se notar que há uma dissolução do gel. Com a adição de HU, o aprisionamento do solvente fica comprometido

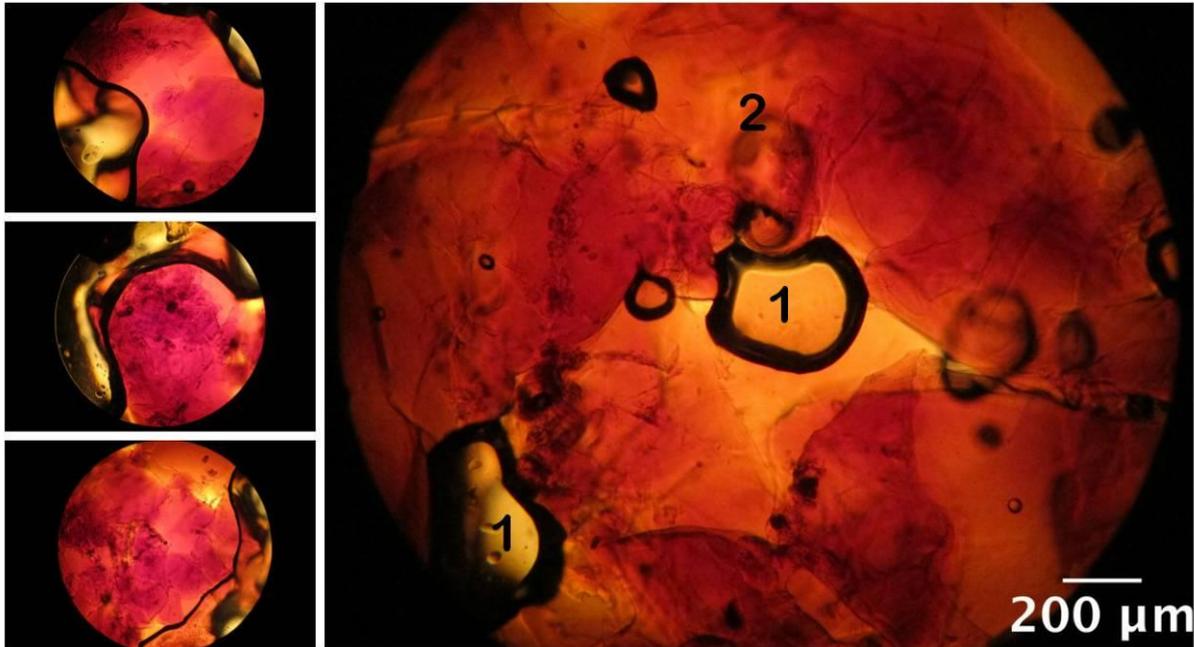


Figura 5-8 - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina suína (HSn2) em solução de glutaraldeído 1% e com 20mg/ml de HU, com aumento de 10x em quatro pontos distintos.

O gel de hemoglobina suína com concentração de 40mg/ml é mostrado na Figura 5-9, assim como no gel de hemoglobina bovina de concentração de HU 40mg/mL, o gel adquire característica de dissolvido, perdendo sua capacidade de aprisionar o solvente.

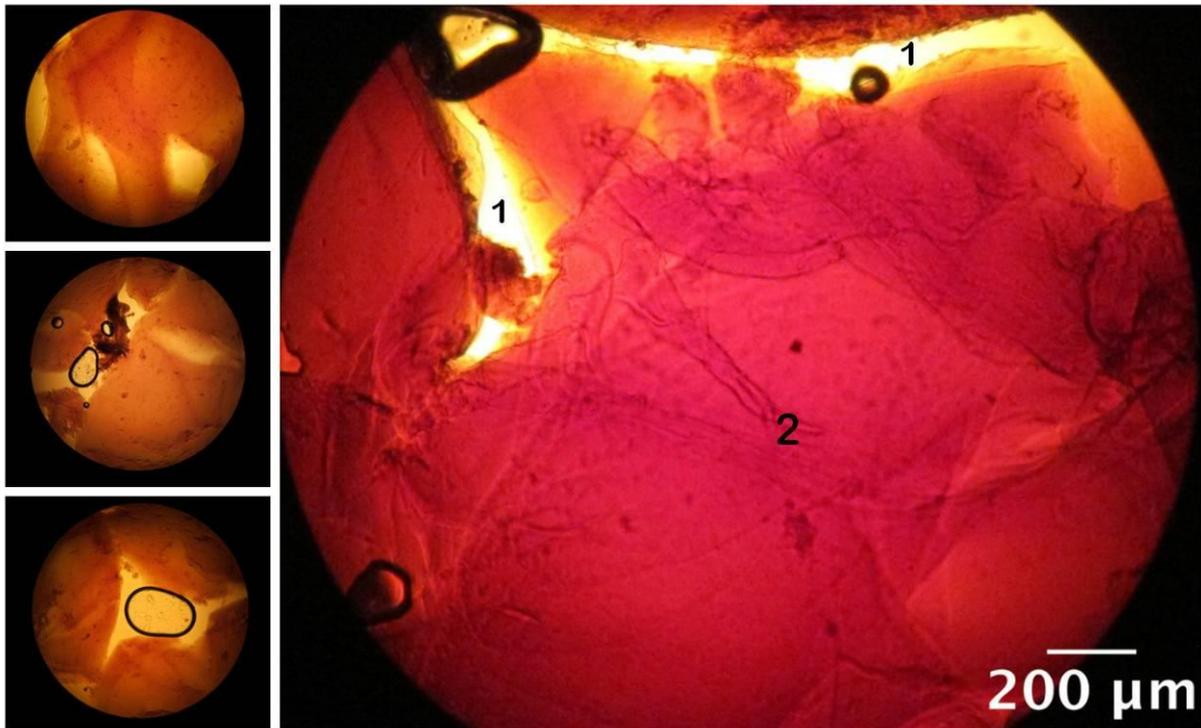


Figura 5-9 - Imagens obtidas por microscopia ótica do gel de hemoglobina suína (HSn3) em solução de glutaraldeído 1% e 40mg/ml de HU, aumento de 10x em quatro pontos distintos.

A Figura 5-10 apresenta uma comparação dos géis de hemoglobina suína com e sem HU. À medida que aumenta a concentração de HU, o gel se torna mais frágil, como se não conseguindo aprisionar o solvente, sofrendo dissolução.

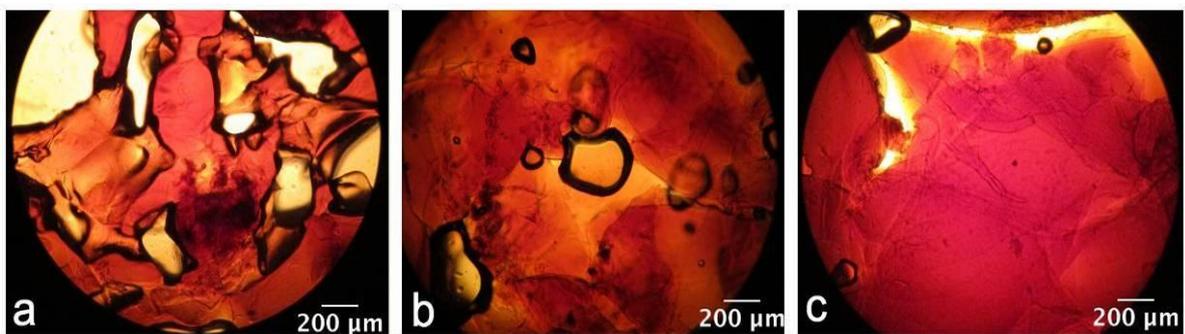


Figura 5-10 - Comparação dos géis de hemoglobina suína sem HU (a) com HU (b) e com concentração de HU duplicada (c) ilustrando efeito da adição de HU em sua estrutura.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura

5.3.1 Géis com concentração de colágeno igual à 6,7.

As imagens obtidas pelo MEV mostram as diferenças da microestrutura entre géis com e sem adição de HU. O gel de colágeno não homogêneo sem HU (C1) apresentado pela letra A na Figura 5-11, evidencia uma estrutura de rede de fibras aleatoriamente dispostas. Pode se observar que essa rede apresenta aglomerados de fibras em alguns pontos, identificados pelas regiões mais claras na imagem. A retenção de solvente para a formação do géis é dependente da rede formada.

Ao analisar o gel de colágeno com concentração de HU igual à 20mg/mL (C2) apresentado pela letra B na Figura 5-11, observa-se a ausência das fibras em rede presentes no gel de colágeno sem HU e uma ligeira compactação de sua estrutura.

Na Figura 5-11 o gel de colágeno com concentração de HU igual à 40mg/mL (C3) é identificado pela letra C, sugerindo que a estrutura desse gel aumenta a compactação, devido à presença de trincas pela superfície. A amostra sofre uma intensa retração, possivelmente pela quantidade de água livre na estrutura.

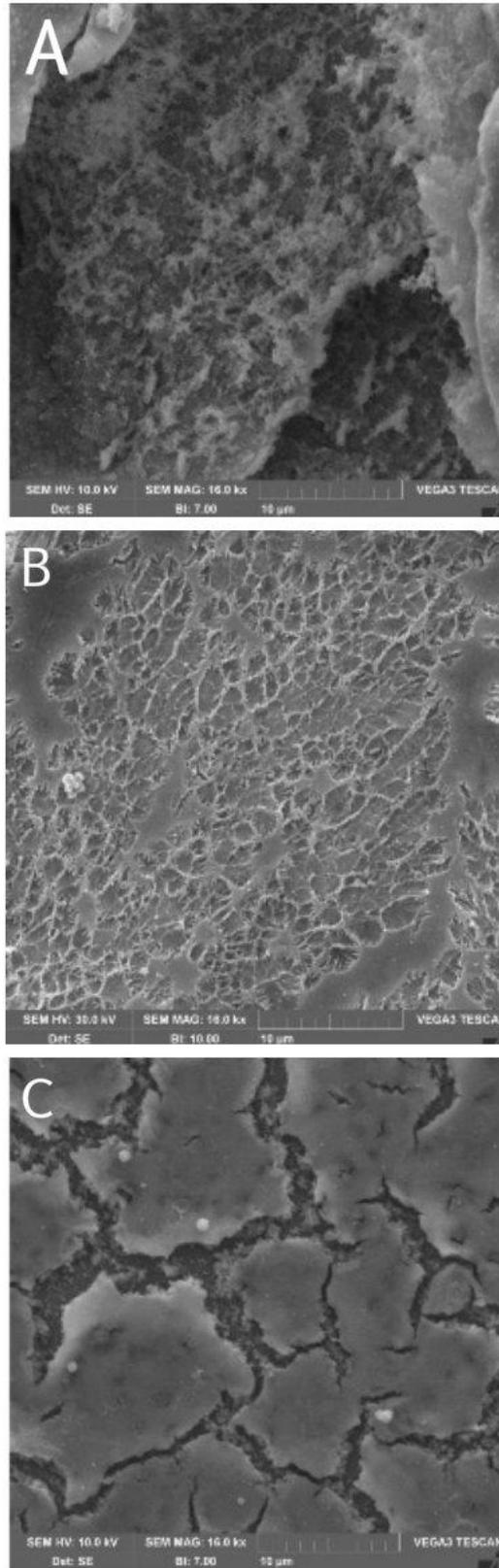


Figura 5-11 - Imagem obtida pelo MEV do gel de colágeno 6,7% mostrando a microestrutura dos géis onde A na há adição de HU (C1), B há adição de HU em uma concentração de 20mg/mL (C2) e C uma concentração de 40mg/mL .

5.3.2 Géis de colágeno 2,2%

O gel de colágeno 2,2% Cs1 (sem HU) mostrado na letra A da Figura 5-12, apresenta a matriz como uma rede de fibras tridimensional organizada, permitindo aprisionamento maior do solvente, quando comparado aos géis de colágeno de 6,7%.

A imagem da amostra de gel de colágeno 2,2% com concentração de HU igual à 20mg/mL (Cs4), apresentada pela letra B da Figura 5-12, permite observar que a estrutura da rede em relação ao gel Cs1 (sem HU) apresenta menor porosidade, conseqüentemente, menor capacidade de retenção de solvente. Nesse caso também como no gel de colágeno C3 (concentração de HU igual à 40mg/mL) representado pela letra C da Figura 5-11, a estrutura se compacta apresentando trincas em toda a superfície. Essas trincas são devido à retração sofrida pelo gel pela incapacidade de retenção da água, resultando em uma estrutura compacta. Observa-se que não existe estrutura de fibras longas como no caso do gel de colágeno sem HU.

A letra C da Figura 5-12 apresenta o gel de colágeno 2,2% com concentração de HU igual à 40mg/mL (Cs5), com características semelhantes ao gel de Cs4 (20mg/mL de HU), representado pela letra B da mesma figura também há presença de trincas, mas em menor quantidade em comparação ao gel Cs4.

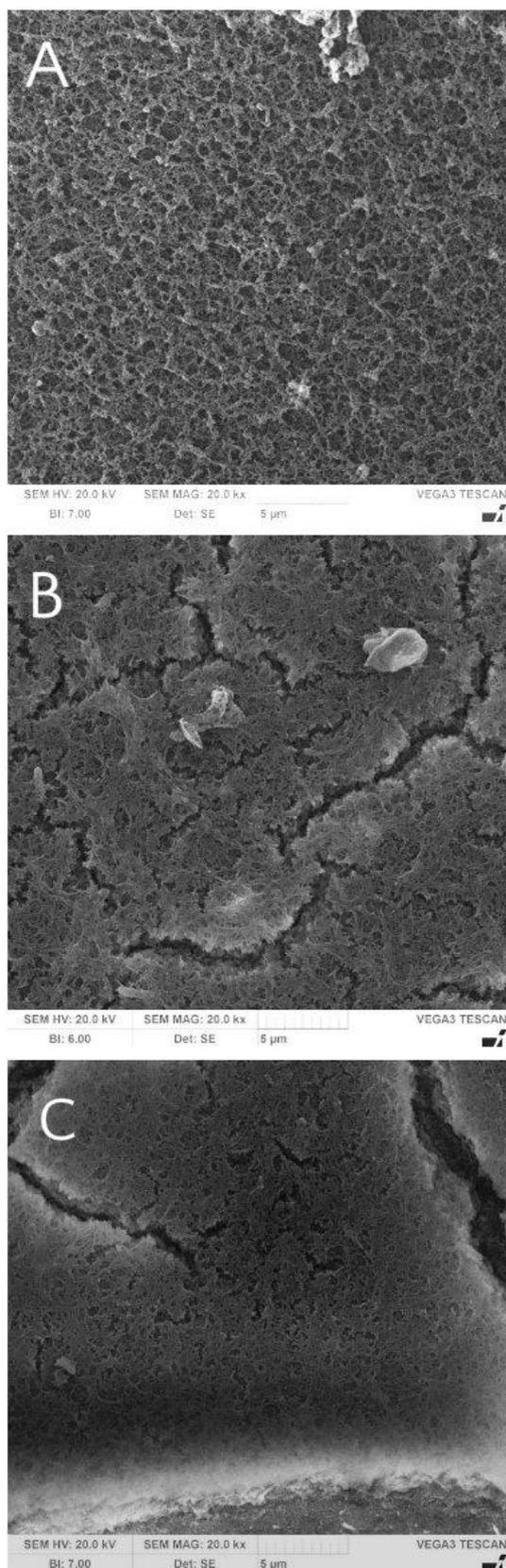


Figura 5-12 - Imagem obtida pelo MEV do gel de colágeno 2,2% onde a letra A apresenta o gel Cs1 (sem HU), a letra B apresenta o gel Cs4 (concentração de HU igual à 20mg/mL) e a letra C apresenta o gel Cs5 (com concentração de HU igual á 40mg/mL).

5.3.3 Géis de hemoglobina bovina

Os géis de hemoglobina bovina têm natureza diferente dos géis de colágeno, pois apresentam ligações cruzadas entre as fibras de HB devido à adição do agente reticulador GTA. Essa ligação é mais intensa que as interações que unem os componentes do géis de colágeno (solução de ácido acético e fibras de colágeno) ocasionando uma estrutura mais compacta. A letra A da Figura 5-13 apresenta imagem do gel de hemoglobina bovina sem HU (HVn1). Pode-se observar a formação de uma estrutura filamentosa mais reticulada do que a rede tridimensional presente no gel de colágeno.

Na letra B da Figura 5-13, a estrutura do gel de hemoglobina bovina com concentração de HU 20mg/mL (HVn2) é apresentada. Observa-se a redução do tamanho dos filamentos de Hb tendo como consequência uma estrutura mais compacta.

Já na letra C da Figura 5-13, na qual a estrutura do gel de hemoglobina bovina com concentração de HU 40mg/mL (HVn3) é apresentada, observa-se o mesmo efeito da amostra anterior com a inexistência de filamentos longos, sendo a microestrutura constituída de agregados nanométricos reticulados pela presença de GTA.

Note que com o aumento da concentração de HU, há perda de características para se obter um gel, como a diminuição de poros.

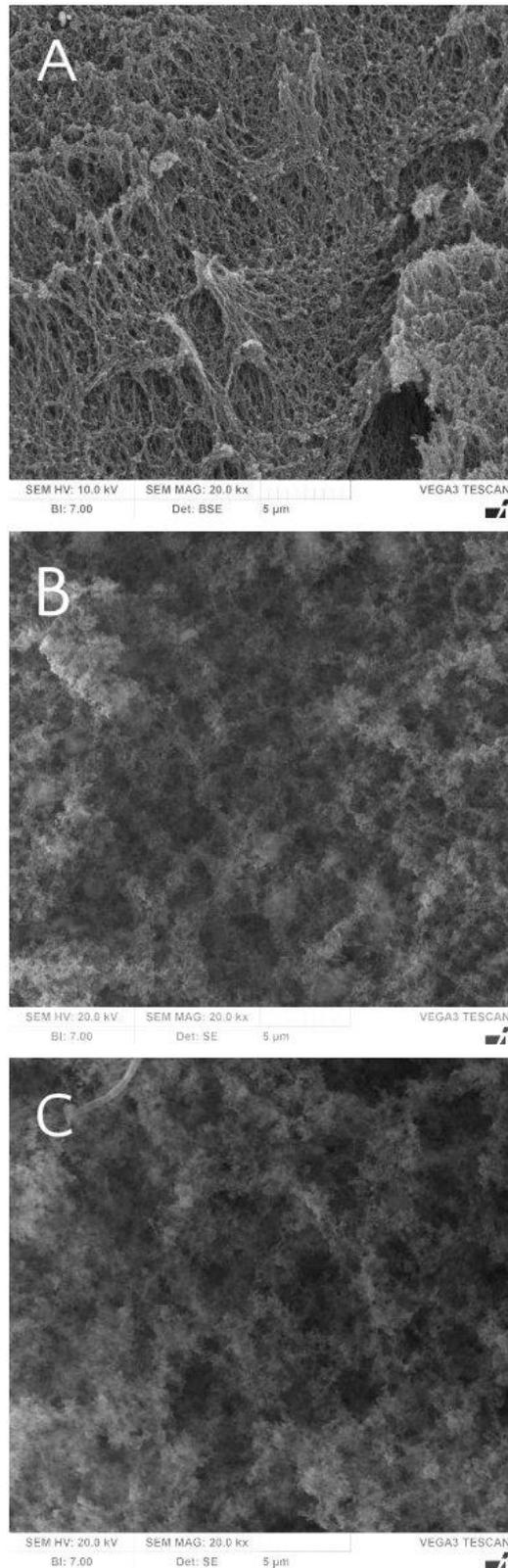


Figura 5-13 - Imagem obtida pelo MEV do gel de hemoglobina bovina onde a letra A apresenta o gel HVn1 (sem HU), a letra B apresenta o gel HVn2 (com concentração de HU igual à 20mg/mL) e a letra C apresenta o gel HVn3 (com concentração de HU igual á 40mg/mL).

5.3.4 Géis de hemoglobina suína

Os géis de hemoglobina suína foram produzidos com o mesmo protocolo dos géis de hemoglobina bovina, apresentando portanto características semelhantes, como uma rigidez maior que os géis de colágeno. Os géis de hemoglobina, por serem feitos por reticulação química, possuem ligações mais fortes que as interações presentes nos géis de colágeno. A letra A da Figura 5-14 apresenta o gel de hemoglobina suína sem HU (HSn1). Pode-se notar um tipo de rede na amostra, característica de estrutura de géis.

O gel de hemoglobina suína com concentração de HU de 20mg/mL (HSn2) é apresentado na letra B da Figura 5-14. Note-se que são observados poros e a estrutura se parece mais a de um sólido poroso do que gel.

A letra C da Figura 5-14 que representa o gel de hemoglobina suína com concentração de HU de 40mg/mL (HSn3), se assemelha mais a estrutura de um sólido poroso e não apresenta estrutura de rede na amostra.

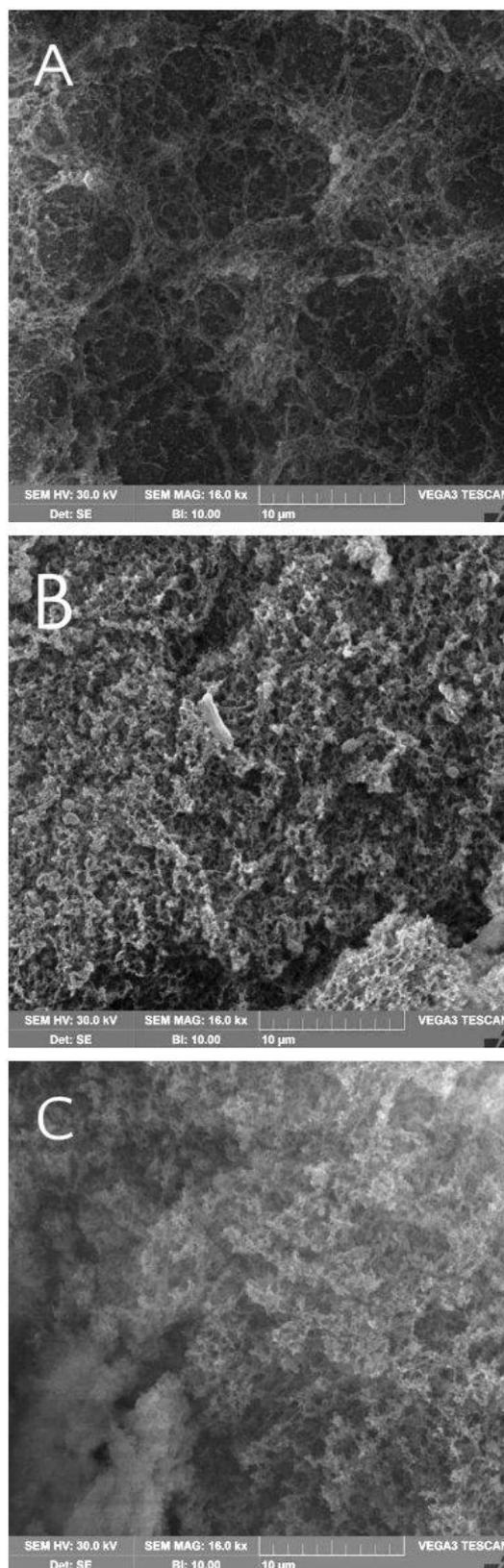


Figura 5-14 - Imagem obtida pelo MEV do gel de hemoglobina suína onde a letra A apresenta o gel HS_n1 (sem HU), a letra B apresenta o gel HS_n2 (com concentração de HU igual à 20mg/mL) e a letra C apresenta o gel HS_n3 (com concentração de HU igual á 40mg/mL).

A partir das imagens obtidas pela técnica de MEV, pode-se inferir que a HU intervém na estrutura dos géis fazendo com que se tornem mais agregados, reduzindo sua porosidade, o que conseqüentemente reduz a retenção de solvente. A HU impede a formação de redes tridimensionais, característica da formação de géis, portanto o poder gelificante da amostra diminui à medida que a concentração de HU aumenta. A Figura 5-15 apresenta estruturas de gel e de sólido poroso observados por outros autores.

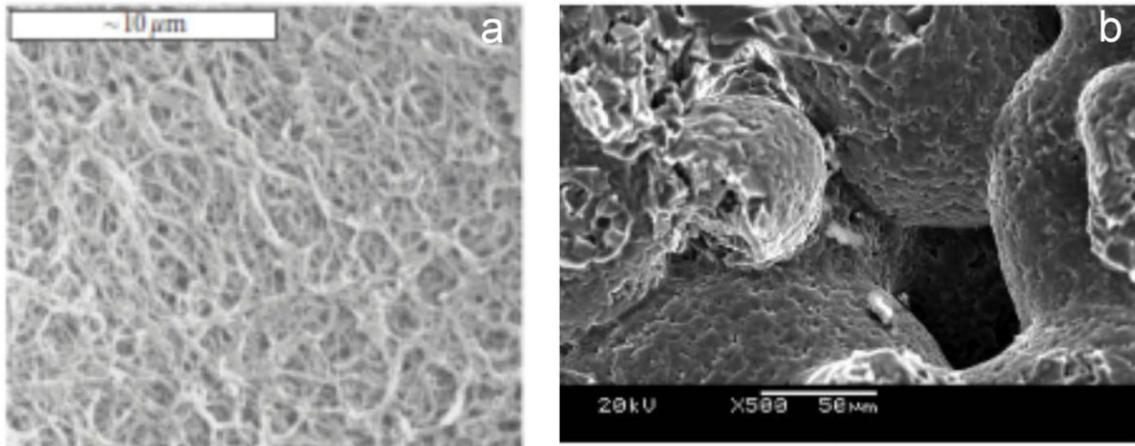


Figura 5-15 – Estruturas de gel^[78] (a) e de sólido poroso^[79] (b).

5.4 Reologia dos géis em função do tempo

Para os ensaios de resistência mecânica em função do tempo foram utilizados apenas os géis homogêneos de concentração 2,2%. Os géis usados foram Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU). Os géis de colágeno com concentração 6,7% apresentam partículas dispersas que se sedimentam com facilidade e poderiam fornecer resultados errôneos. Todos os ensaios foram feitos em ambiente fechado com temperatura controlada.

5.4.1 Resultados a partir do reômetro

5.4.1.1 Ensaio realizado após 24 horas

A Figura 5-16 apresenta o gráfico onde a tensão de cisalhamento (σ) é plotada em função da deformação (γ), cuja faixa de leitura da temperatura foi de 19 à 40°C. O ensaio iniciou com a temperatura de 40°C, na qual a amostra se apresenta com fase sol, e diminuiu até 19°C, amostra no estado gel. O limite de escoamento pode ser determinado através do valor máximo da curva do gráfico de tensão *versus* deformação. A resistência mecânica é comparável. Quanto mais inclinada é a parte inicial da curva no gráfico de tensão *versus* deformação, mais rígido é o gel. O gel sem HU atinge o limite de escoamento com deformações menores, resultado que confirma afirmação anterior.

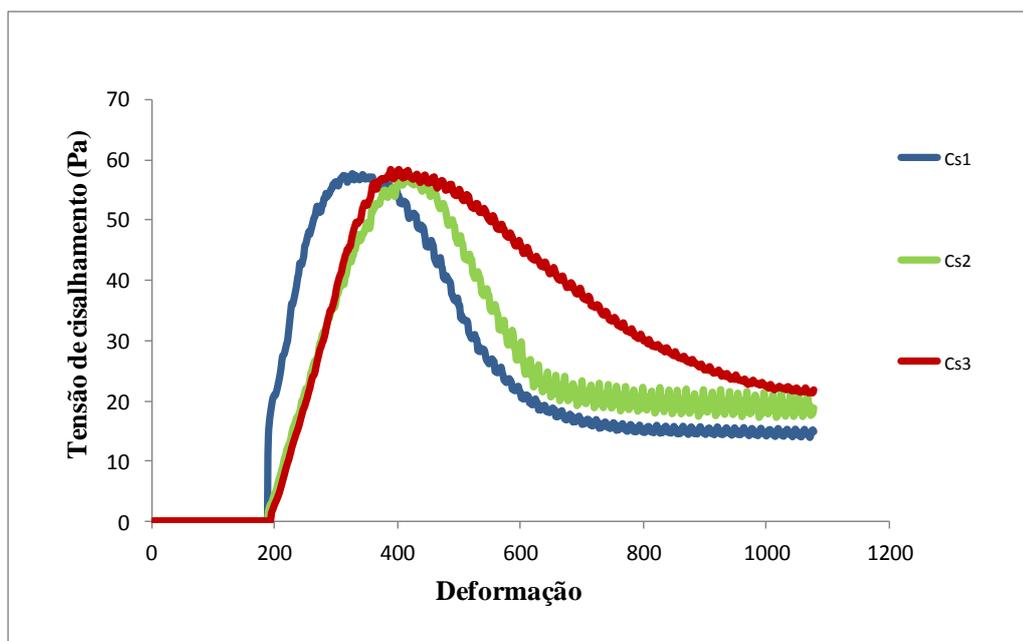


Figura 5-16 - Gráfico de tensão *versus* deformação dos géis Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).

A Figura 5-17 apresenta o gráfico de tensão *versus* tempo de ensaio.

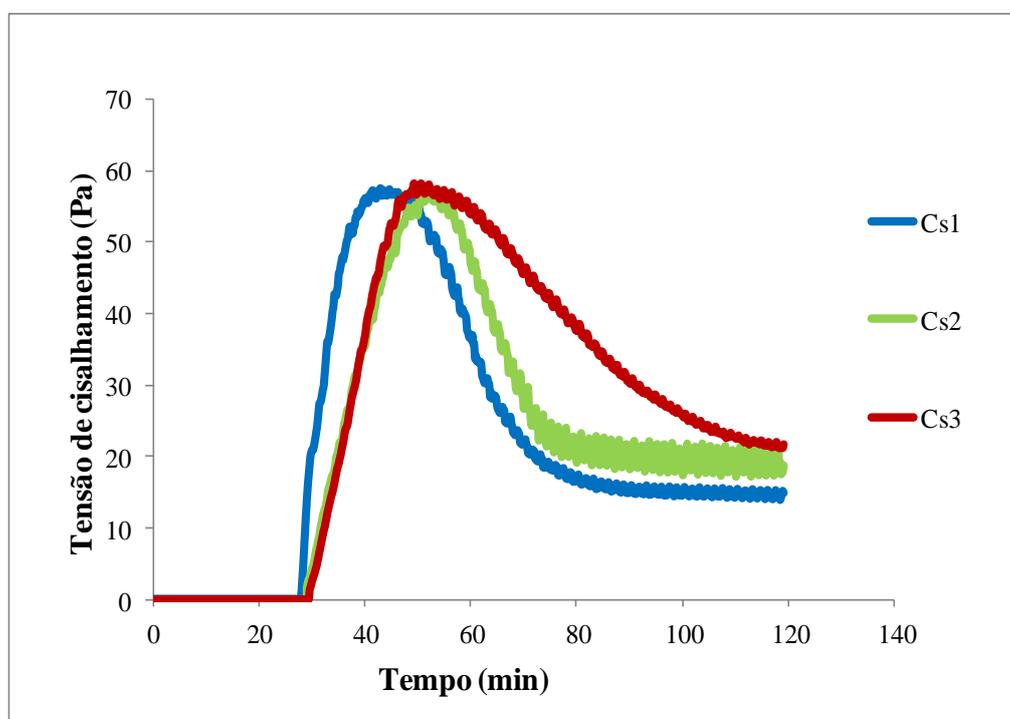


Figura 5-17 - Gráfico de tensão *versus* tempo dos géis Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).

5.4.1.2 Ensaio realizado após 5 dias

Os géis preparados foram deixados em repouso sob refrigeração à 10°C. Após 5 dias, o ensaio foi repetido como mostrado no gráfico da Figura 5-18. Há uma mudança do comportamento da amostra, pois além de ter seu limite de escoamento reduzido, a amostra sem HU possui maior limite de escoamento. Pode se afirmar que a estrutura da amostra foi modificada em função do tempo.

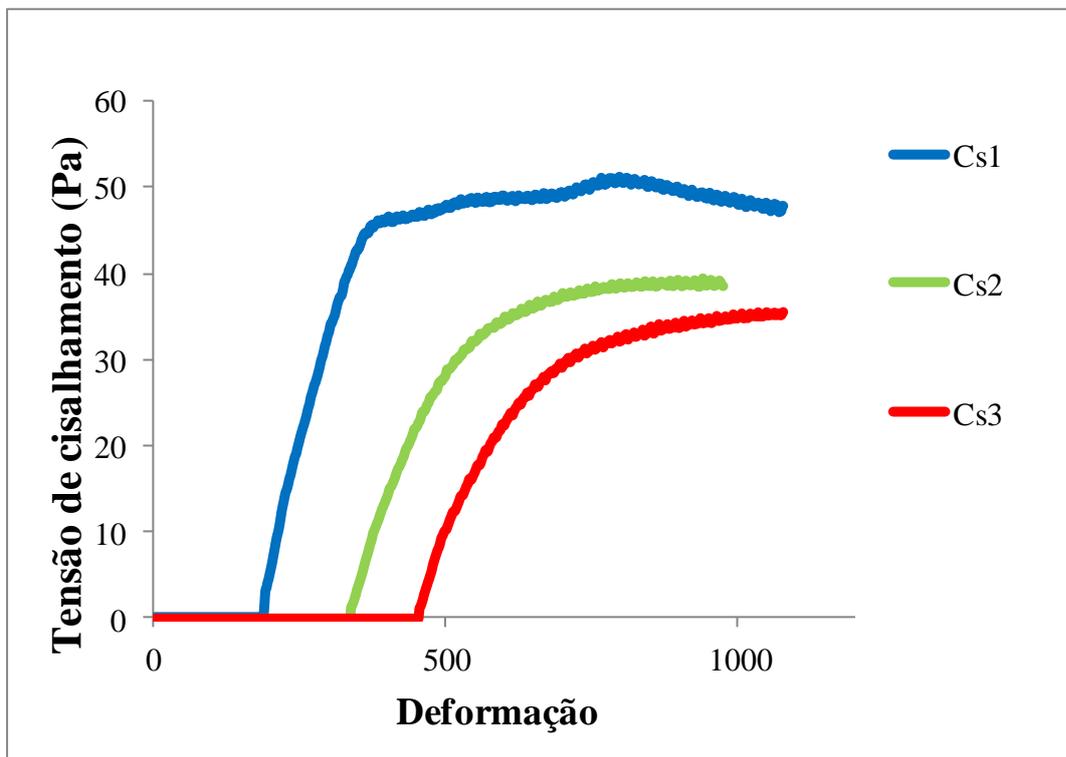


Figura 5-18 - Gráfico de tensão *versus* deformação dos géis Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).

A Figura 5-19 apresenta o gráfico que compara a diferença entre os valores de limite de escoamento das amostra sem HU (Cs1) em função do tempo. A variação dessa propriedade está relacionada às mudanças na estrutura, observadas pelo formato das curvas do gráfico.

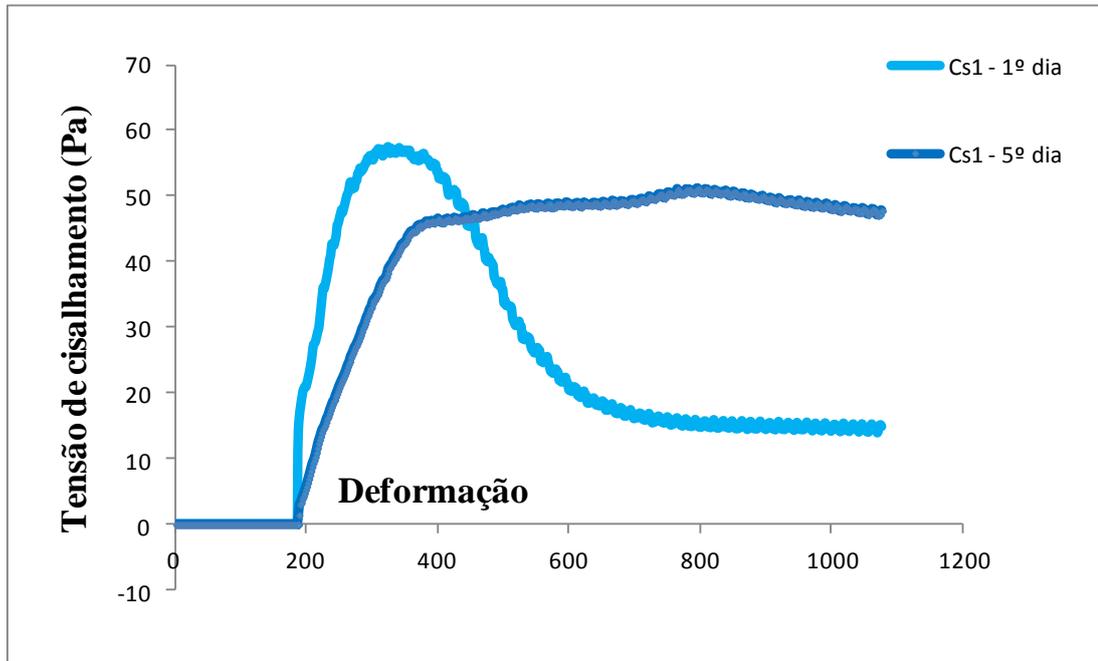


Figura 5-19 - Gráfico de tensão *versus* deformação dos géis sem HU avaliados em dias distintos.

5.4.2 Resultados a partir do viscosímetro – Fase sol

Para o ensaio de viscosidade, utilizou-se um viscosímetro quando a amostra se apresentava na forma sol, a uma temperatura de 37°C. A quantidade de amostra utilizada para cada ensaio foi 0,5mL. Os géis ensaiados foram os de concentração 2,2%. A Figura 5-20 apresenta o gráfico da viscosidade (η) plotada em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) das amostras sem e com HU. Pode-se observar que a amostra sem HU (Cs1) apresenta maior viscosidade que as outras amostras com HU (Cs2 e Cs3). Comparando as amostras com adição de HU, Cs2 (0,49 mg/mL de HU) possui viscosidade semelhante à Cs3 (0,98 mg/mL de HU).

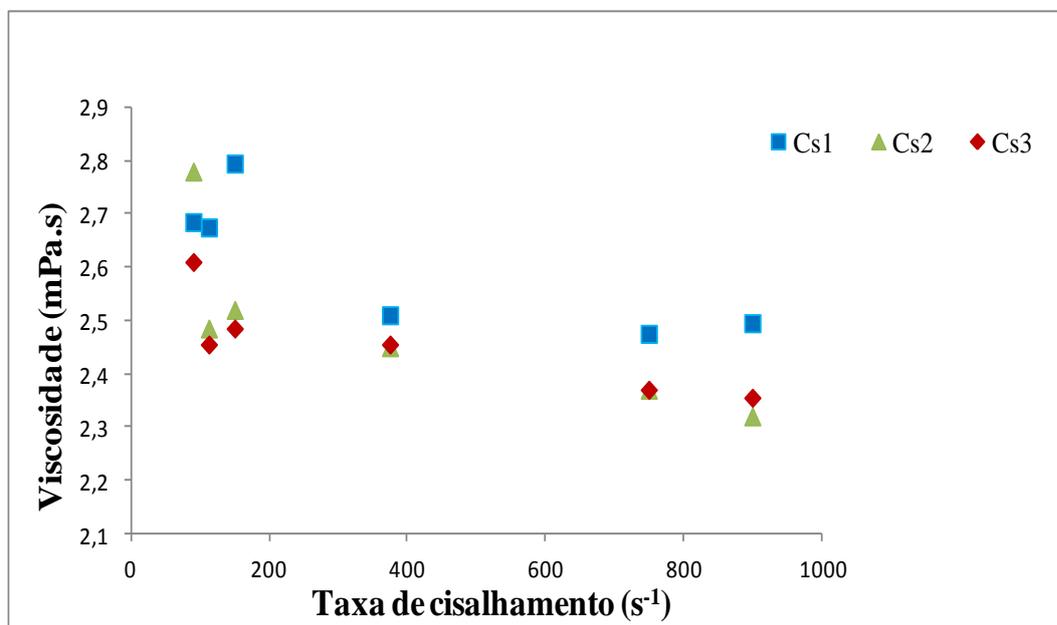


Figura 5-20 – Gráfico de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).

5.4.2.1 Ensaio realizado após 30 horas da preparação da amostra

O ensaio foi repetido e o resultado foi plotado no gráfico da Figura 5-21. A viscosidade de todas as amostras aumentaram, porém Cs1 (sem HU) manteve a maior viscosidade em comparação aos outros géis e a diferença entre os valores de viscosidade tornou-se mais significativa. A amostra Cs3 (0,98 mg/mL de HU) possui a viscosidade menor

que Cs2 (0,49 mg/mL de HU), que por sua vez apresenta viscosidade menor que o Cs1 (sem HU).

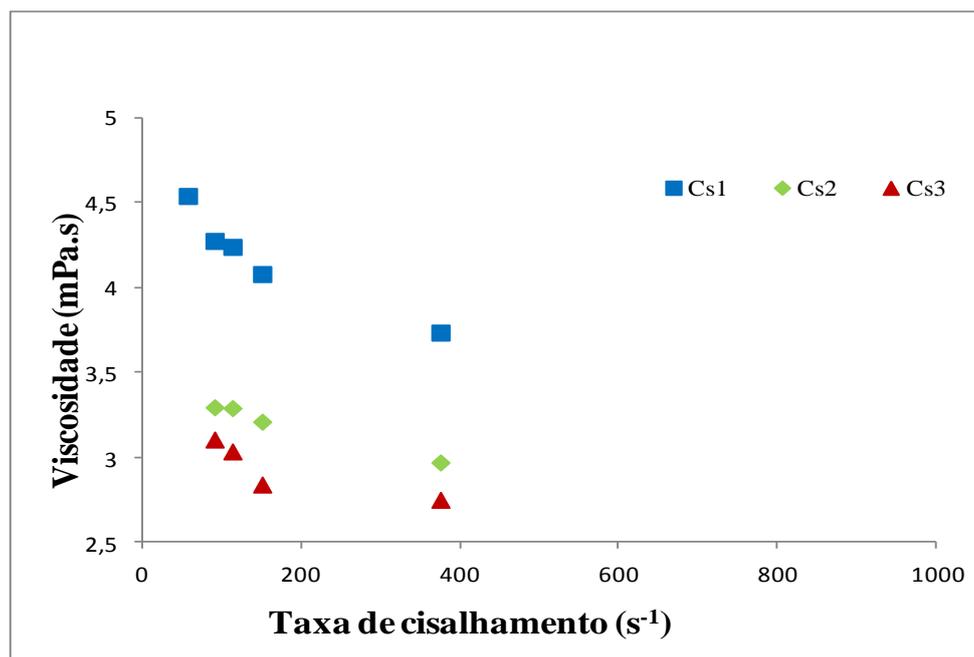


Figura 5-21 - Gráfico de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).

5.4.2.2 Ensaio realizado após 40 horas da preparação da amostra

O ensaio foi repetido e o resultado foi plotado no gráfico da Figura 5-22. A viscosidade de todas as amostras aumentaram mais uma vez e o comportamento do último ensaio se manteve. A amostra Cs1 (sem HU) continua com a viscosidade maior em comparação às outras amostras e Cs3 (0,98 mg/mL de HU) possui viscosidade menor que Cs2 (0,49 mg/mL de HU).

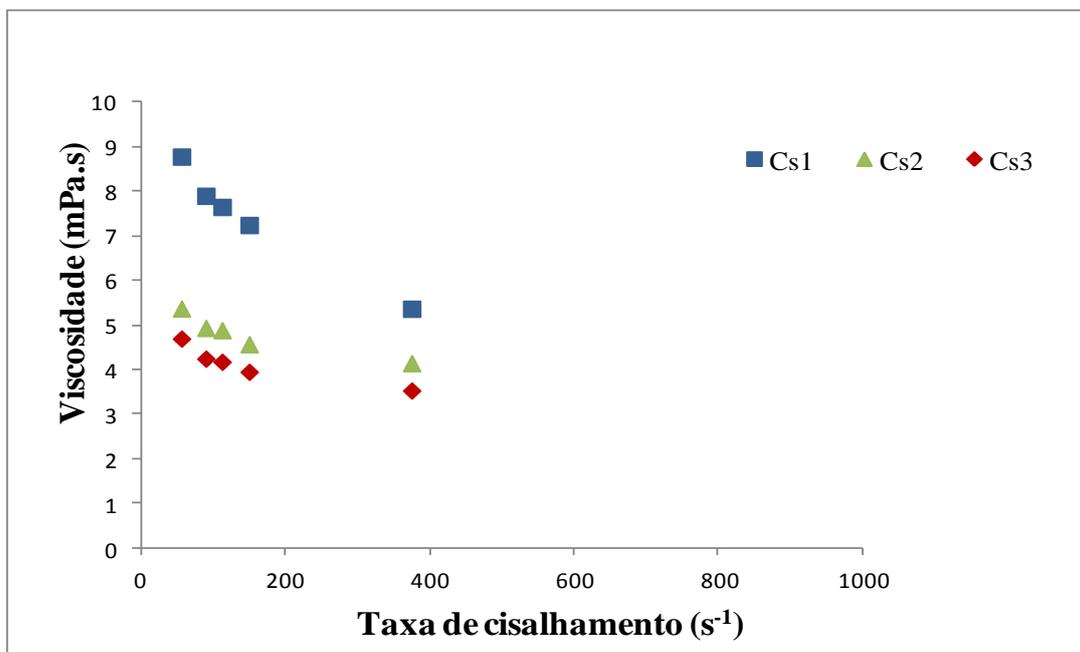


Figura 5-22 - Gráfico de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).

5.4.2.3 Ensaio realizado após 54 horas da preparação da amostra

Nota-se um decréscimo da viscosidade, como mostra o gráfico reportado na Figura 5-23, porém o comportamento dos últimos ensaios se mantiveram, Cs1 (sem HU) continua com a viscosidade maior em comparação às outras amostras e Cs3 (0,98 mg/mL de HU) possui viscosidade menor que Cs2 (0,49 mg/mL de HU).

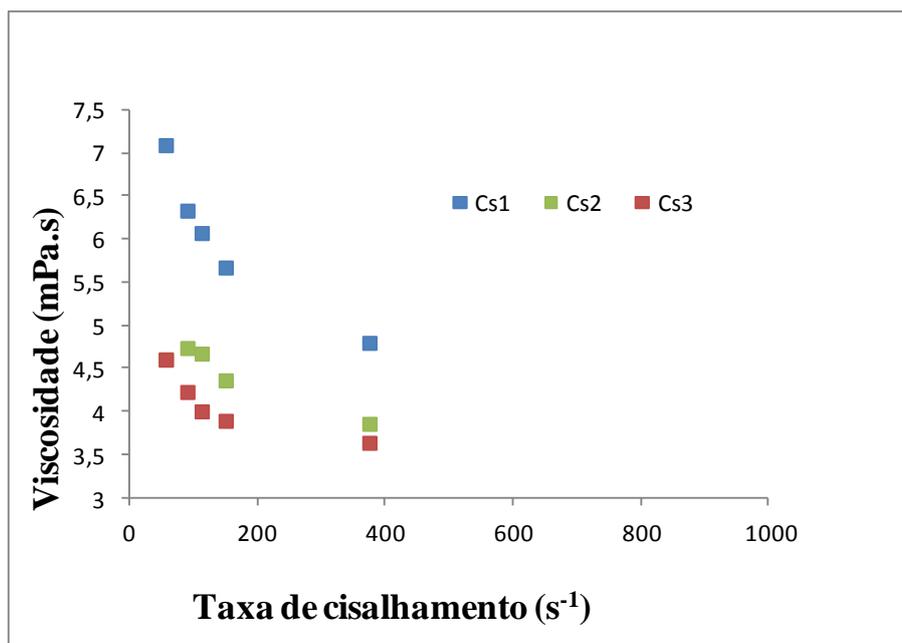


Figura 5-23 - Gráfico de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU).

5.4.3 Ensaios com as amostras Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU)

Os gráficos representados da Figura 5-24 à Figura 5-27, apresentam os resultados da amostra sem HU (Cs1), com concentração de HU igual à 20mg/mL (Cs4) e 40mg/mL (Cs5). O gel sem HU apresenta uma viscosidade maior que os géis com HU. Os géis Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) apresentam uma ligeira diferença de viscosidade, sendo reprodutível em vários ensaios.

5.4.3.1 Ensaios realizados 24 horas depois preparação da amostra

A Figura 5-24 mostra o ensaio dos géis Cs1 (sem HU), Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) na fase sol 24 horas após a preparação. Pode-se notar que a viscosidade dos géis na fase sol são semelhantes. A solução sem HU (Cs1) apresenta uma viscosidade levemente maior.

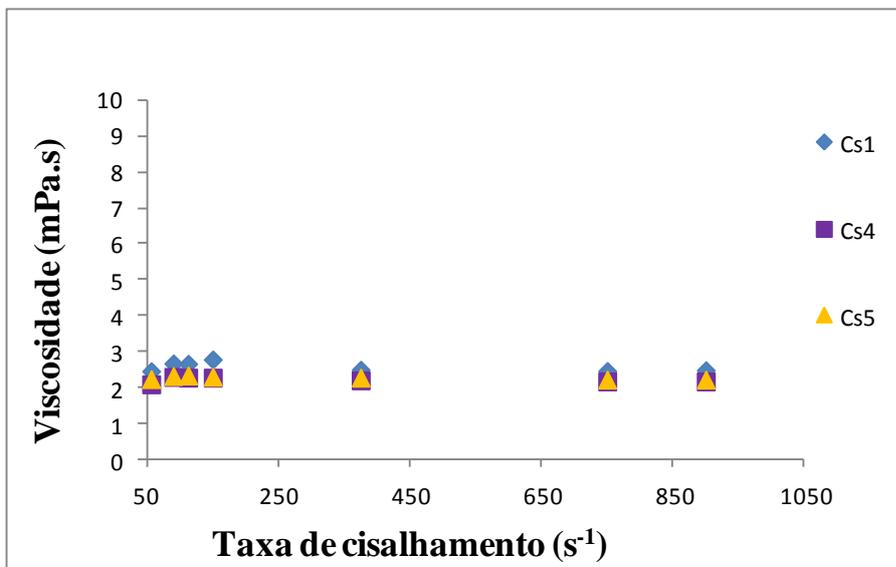


Figura 5-24 - Gráfico da viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20 mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) 24 horas após a preparação.

5.4.3.2 Ensaio realizados após 30 horas da preparação dos géis

Quando se observa a Figura 5-25, nota-se que a viscosidade de todas as soluções continuam semelhantes. Porém o gel Cs1 (sem HU) na fase sol teve um aumento de sua viscosidade maior do que os outros géis com HU (Cs4 e Cs5) na fase sol.

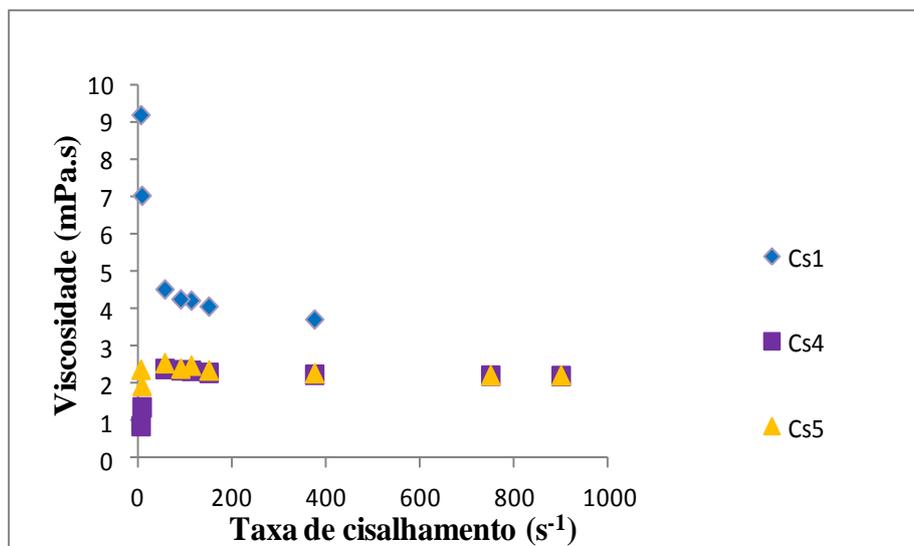


Figura 5-25 - Gráfico da viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20 mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) 30 horas após a preparação.

5.4.3.3 .Ensaio realizados após 40 horas da preparação dos géis

A Figura 5-26 mostra que a viscosidade das três amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU), na fase sol, aumenta, sendo que Cs1 sofre um aumento significativo.

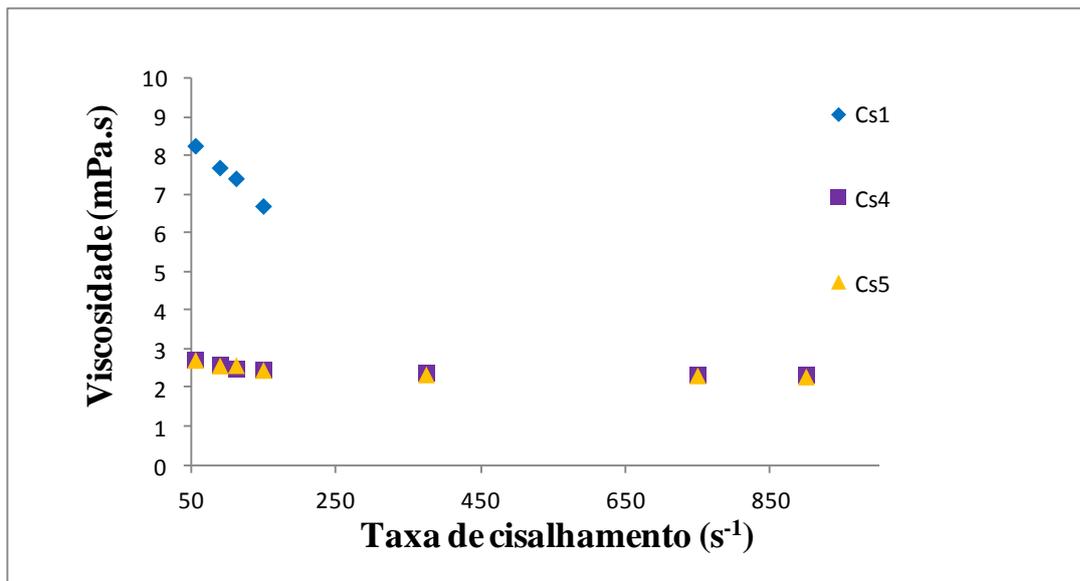


Figura 5-26 - Gráfico da viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20 mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) 40 horas após a preparação.

5.4.3.4 Ensaio realizados após 54 horas da preparação do géis

A Figura 5-27 apresenta uma diminuição de viscosidade de todos os géis na fase sol, resultado que se aproxima do teste de 24 horas, da Figura 5-24, com a amostra Cs1 (sem HU), Cs4 (20mg/mL) e Cs5 (40mg/mL).

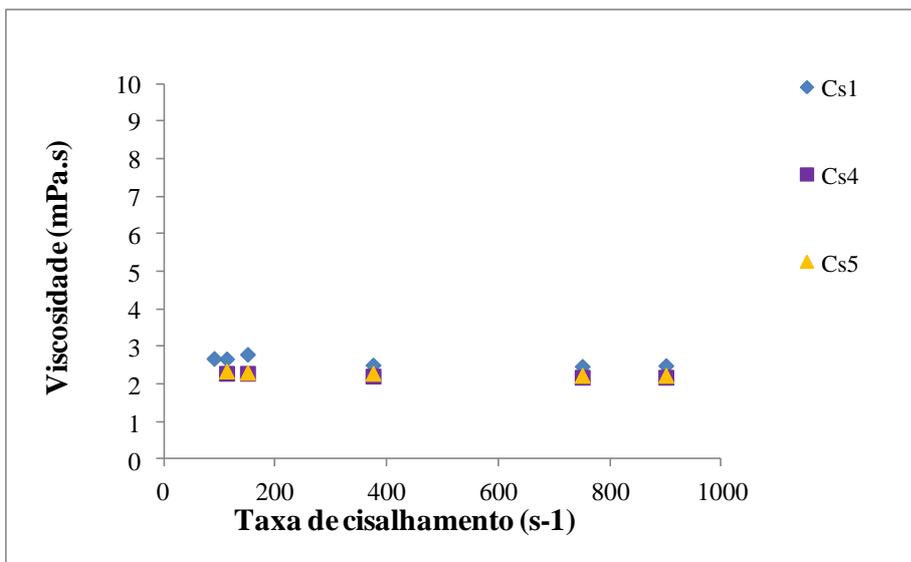


Figura 5-27 - Gráfico de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das amostras Cs1 (sem HU), Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) 54 horas após a preparação.

A partir dos resultados acima, se observa que a viscosidade diminui com o aumento da tensão de cisalhamento e os géis com HU, na fase gel, sempre apresentam viscosidade menor que o gel sem HU, na fase sol.

5.4.4 Perda de massa

Juntamente com o ensaio de viscosidade anteriormente descrito, foi realizado o ensaio da perda de massa dos géis Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49 mg/mL de HU) e Cs3 (0,98 mg/mL de HU), à medida que o gel era aquecido e resfriado sucessivamente. A Figura 5-28 apresenta o gráfico de perda da massa das amostras de acordo com o tratamento dado. O gel sem HU (Cs1) perde maior quantidade de massa do que os géis com HU (Cs2 - 0,49g/mL de HU e Cs3 - 0,98 mg/mL de HU). O gel sem HU apresenta maior quantidade de solvente em sua estrutura pelo fato de sua rede tridimensional ter maior poder de retenção, como apresentado nas considerações do ensaio de MEV, podendo explicar o comportamento descrito pelo gráfico. A viscosidade aumenta com o tempo à medida que há perda de água.

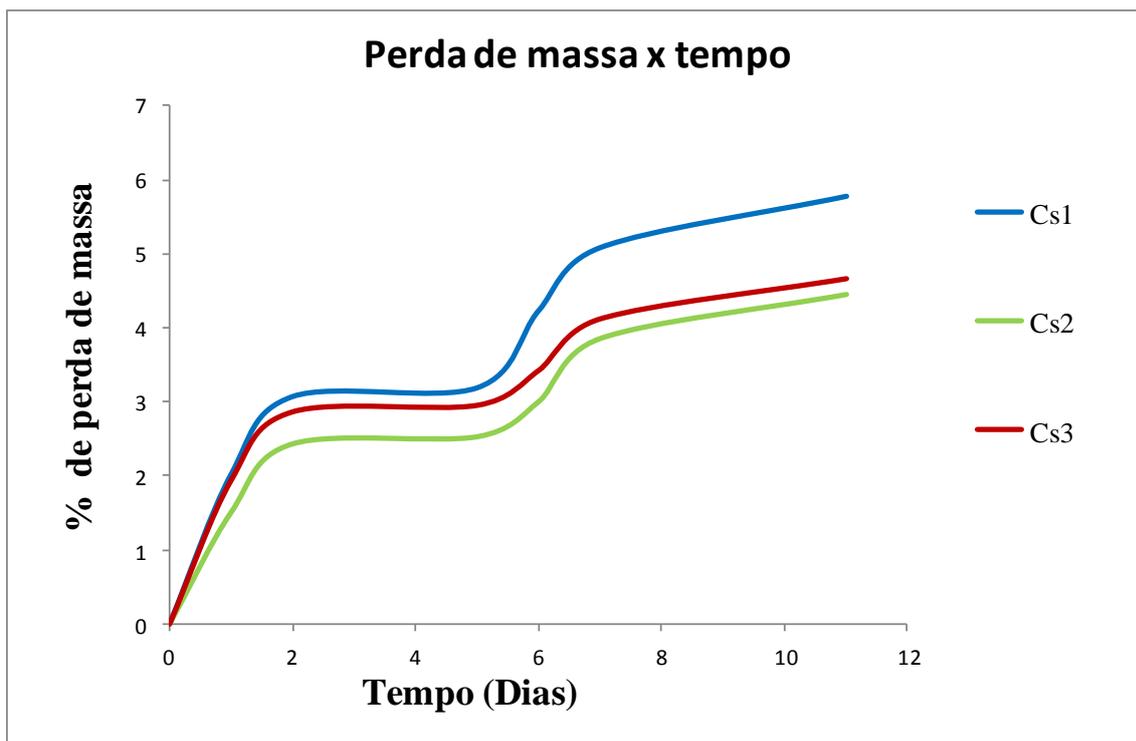


Figura 5-28 – Gráfico da perda de massa pelas amostras Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49mg/mL de HU) e Cs3 (0,98mg/mL) durante os ensaios.

5.5 Calorimetria exploratória diferencial

5.5.1 Géis de colágeno 6,7%

O termograma dos géis de colágeno (C1, C2 e C3) está representado na Figura 5-29, apresentando uma ligeira diferença entre os géis onde o gel sem HU (C1) apresenta maior calor específico. O resultado foi reprodutível.

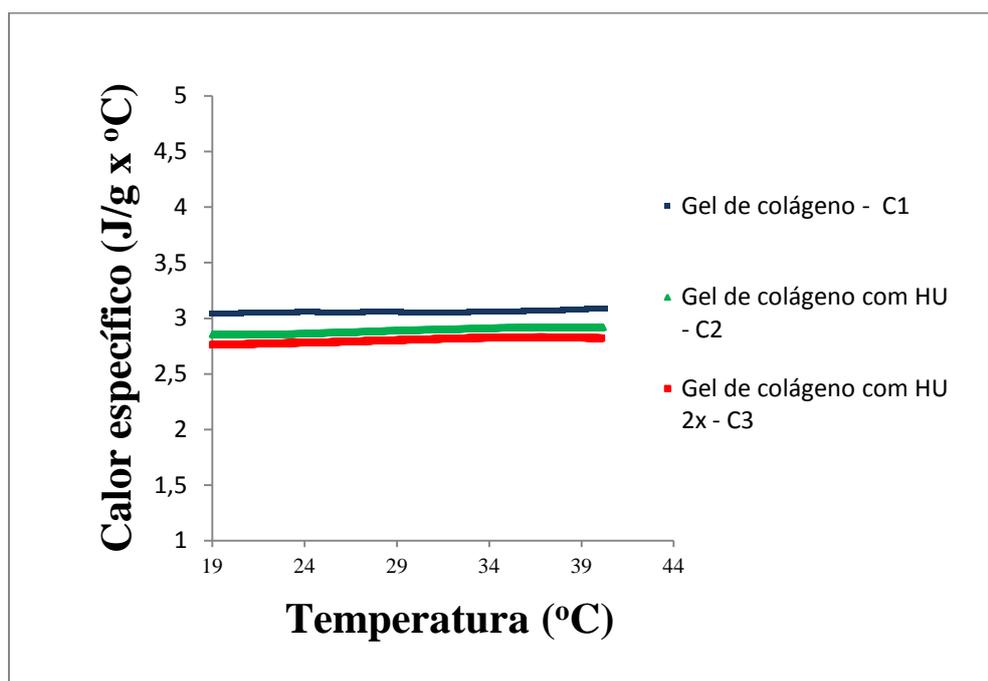


Figura 5-29 - Calor específico *versus* temperatura pelo método StepScan em géis de colágeno 6,7% C1 (sem HU), C2 (20mg/mL) e C3 (40mg/mL).

5.5.2 Géis de colágeno 2,2%

Os resultados foram plotados em gráficos comparando os géis Cs1 (sem HU) e Cs4 (20mg/mL de HU). A faixa da temperatura de trabalho foi de 19 a 40°C.

5.5.2.1 Ensaio após 06 horas da preparação dos géis

A Figura 5-30 apresenta o comportamento térmico do gel Cs1 (sem HU) e do gel Cs4 (20mg/mL de HU). O gel sem HU apresenta maior calor específico.

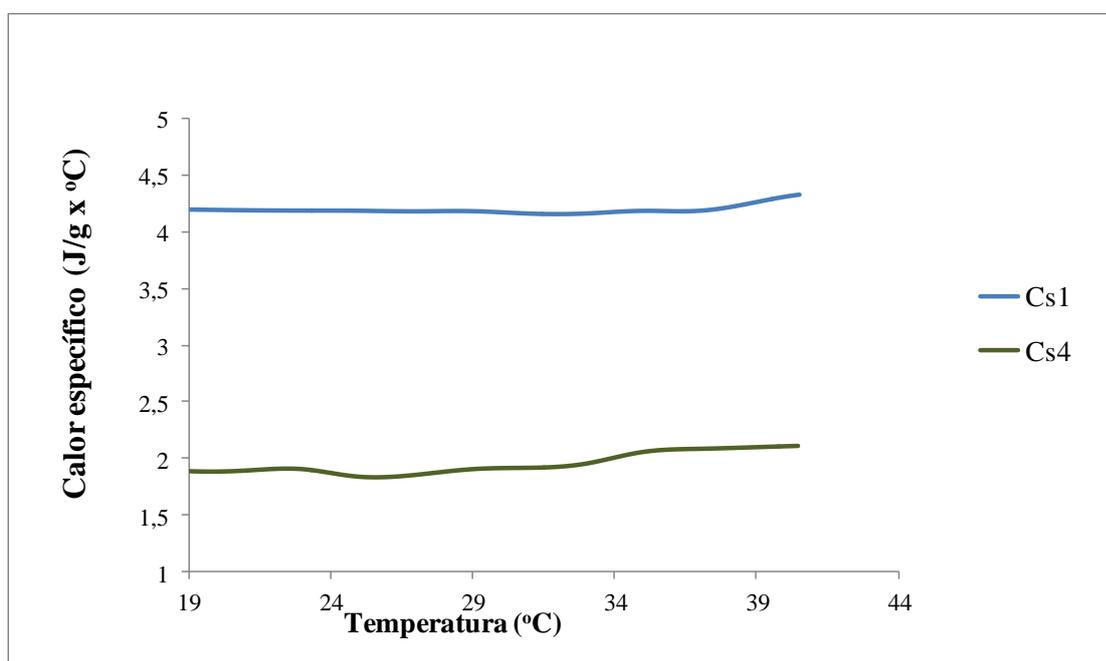


Figura 5-30 - Gráfico do calor específico *versus* temperatura dos géis Cs1 (sem HU) e Cs4 (20mg/mL de HU) após 06 horas da preparação dos géis.

5.5.2.2 Ensaio após 30 horas da preparação dos géis

A Figura 5-31 apresenta o resultado do ensaio repetido horas depois. O comportamento térmico do gel Cs1 (sem HU) e do gel Cs4 (20mg/mL de HU) se manteve o mesmo, com o gel Cs1 (sem HU) apresentando maior calor específico. O Cp é menor em ambas as amostras quando comparado ao ensaio anterior.

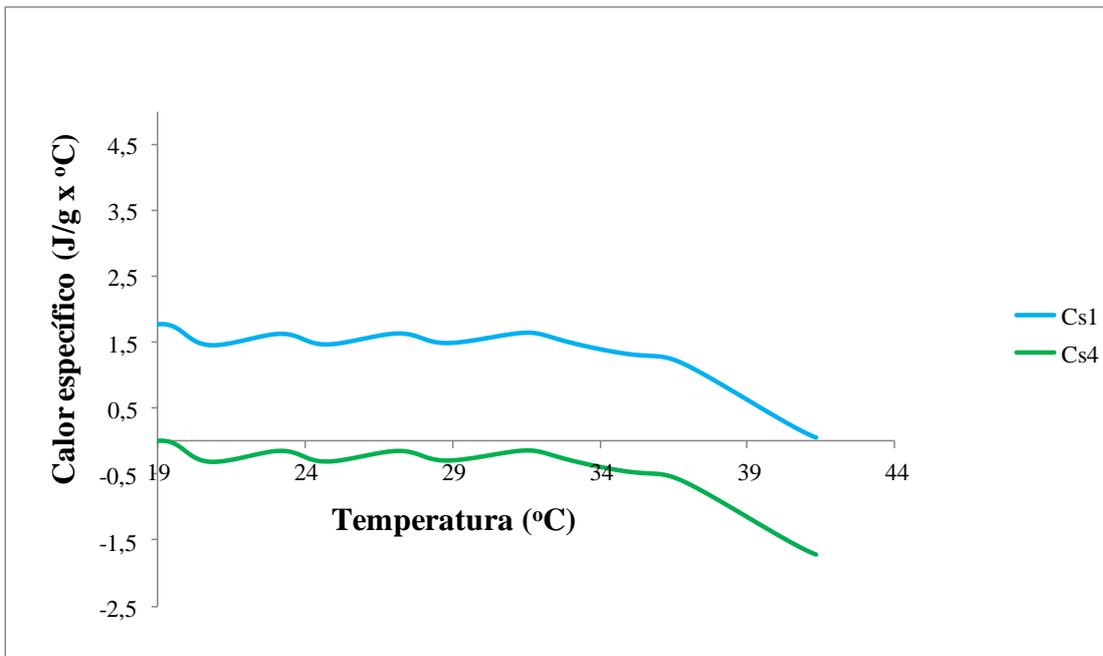


Figura 5-31 - Gráfico do calor específico *versus* temperatura dos géis Cs1 (sem HU) e Cs4 (20mg/mL de HU) após 30 horas da preparação dos géis.

5.5.2.3 Ensaio após 54 horas da preparação dos géis

A Figura 5-32 apresenta o comportamento térmico do gel Cs1 (sem HU) e do gel Cs4 (20mg/mL de HU). O gel Cs1 (sem HU) apresenta maior calor específico. Nota-se que o calor específico de ambas amostras é menor que o ensaio anterior.

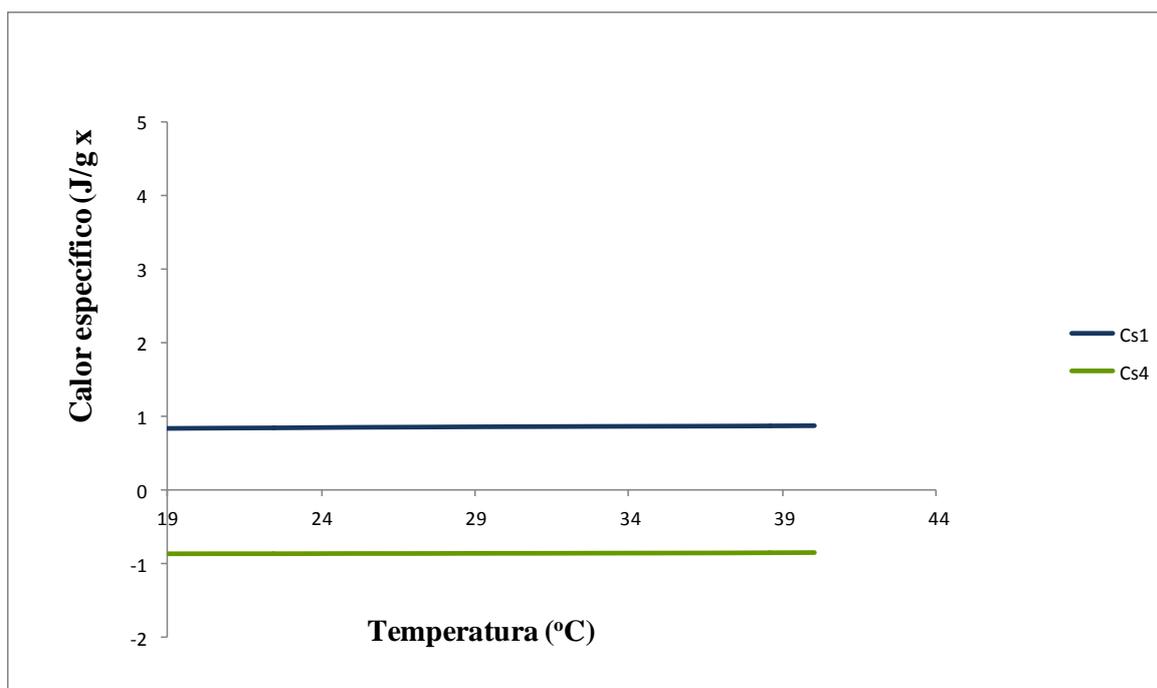


Figura 5-32 - Gráfico do calor específico *versus* temperatura dos géis Cs1 (sem HU) e Cs4 (20mg/mL de HU) após 54 horas da preparação dos géis.

5.5.2.4 Comparando os géis

A Figura 5-33 apresenta a diminuição de calor específico do gel Cs1 (sem HU) em função dos dias no ensaio de DSC.

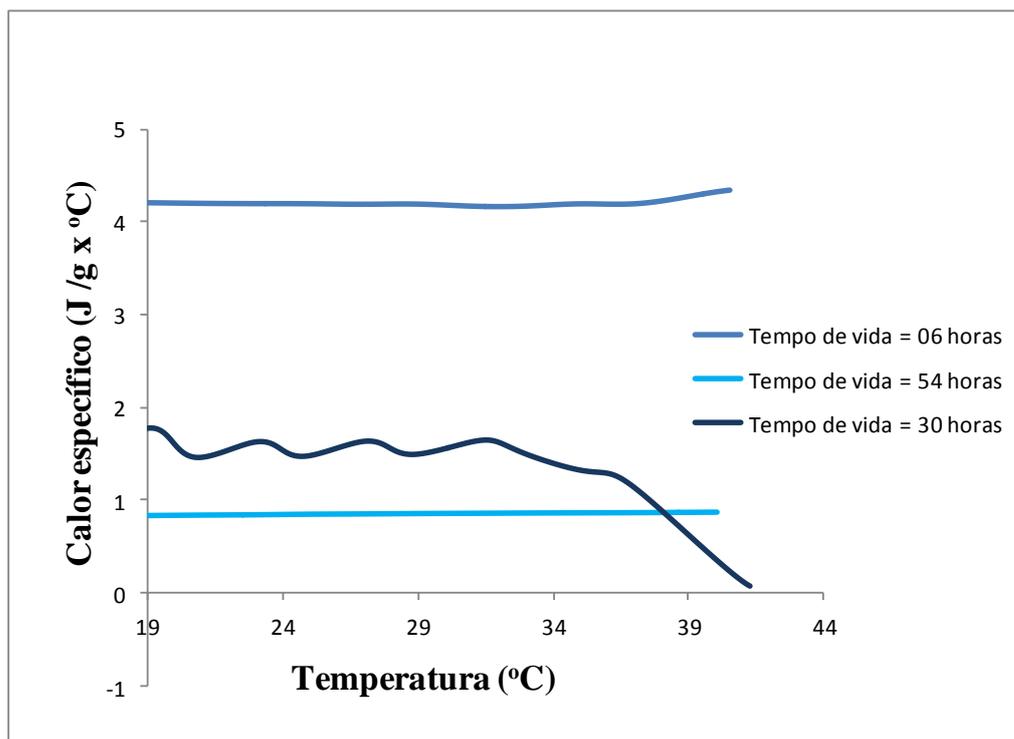


Figura 5-33 - Gráfico calor específico *versus* temperatura do gel Cs1 (sem HU) de acordo com os tempos de vida.

A Figura 5-34 apresenta a diminuição de calor específico do gel Cs4 (20mg/mL de HU) em função dos dias, comportamento semelhante ao gel Cs1 (sem HU).

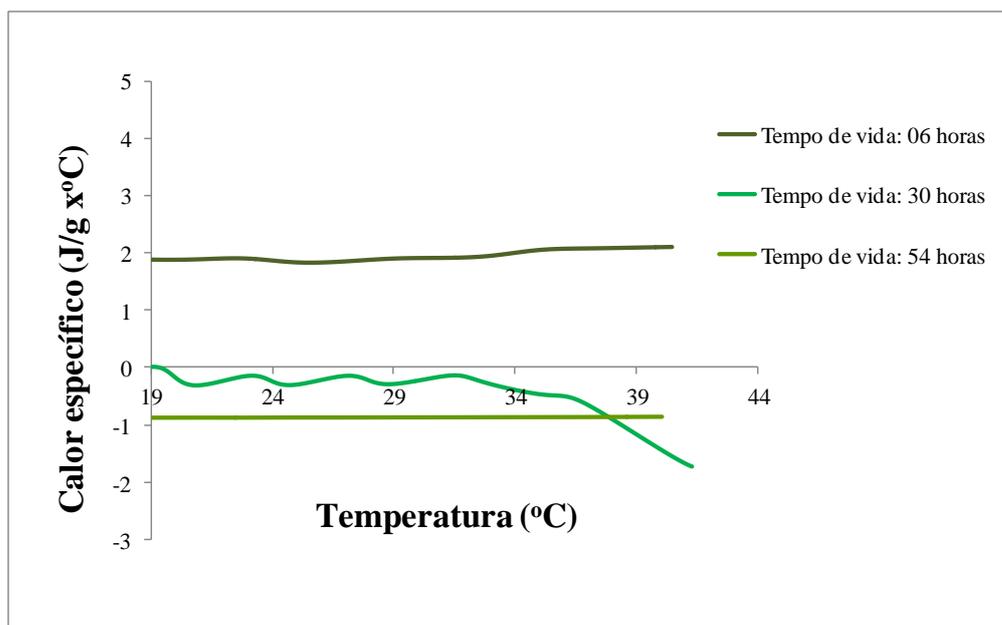


Figura 5-34 - Gráfico calor específico *versus* temperatura do gel Cs4 (20mg/mL de HU) de acordo com os tempos de vida.

O gel de colágeno sem HU apresenta uma rede tridimensional mais organizada, conseguindo reter mais solvente dentro da sua estrutura, como visto pela letra A da Figura 5-12 do ensaio de MEV anteriormente descrito, portanto, essa amostra apresenta um maior calor específico. Os géis de colágeno com adição de HU tem menor capacidade de retenção de solvente em suas estruturas mostradas nas letras B e C da Figura 5-12, apresenta, portanto, um menor C_p .

Baseado na discussão anterior, era de se esperar que o gel Cs5 (40mg/mL de HU) apresentasse um calor específico menor que o gel Cs4 (20mg/mL de HU) e conseqüentemente menor que o gel Cs1 (sem HU). A Figura 5-35 apresenta a diferença entre eles. Nota-se que os géis com HU, Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU) possuem comportamento semelhante, exceto por um declive no final da curva, cujo motivo é desconhecido.

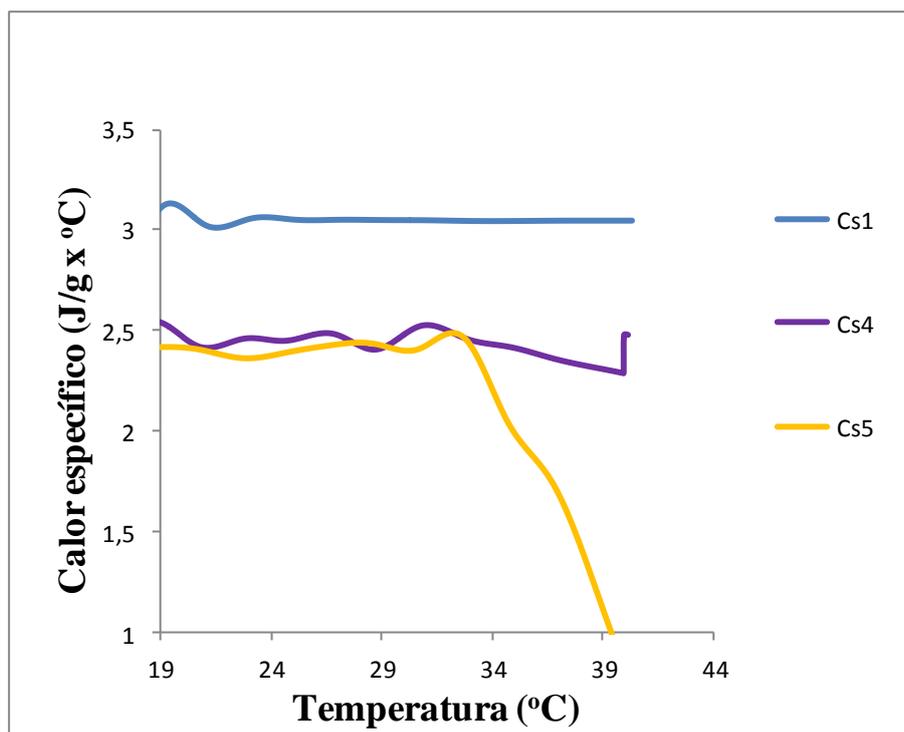


Figura 5-35 - Gráfico calor específico *versus* temperatura dos géis Cs1 (sem HU), Cs4 (20mg/mL de HU) e Cs5 (40mg/mL de HU).

A diferença entre os géis citada anteriormente foi válida somente para os géis Cs1 (sem HU) e Cs4 (20mg/mL de HU). A Figura 5-36 apresenta um resultado incoerente comparado com o anterior, onde o gel Cs5 (40mg/mL de HU) possui o maior Cp que os outros géis.

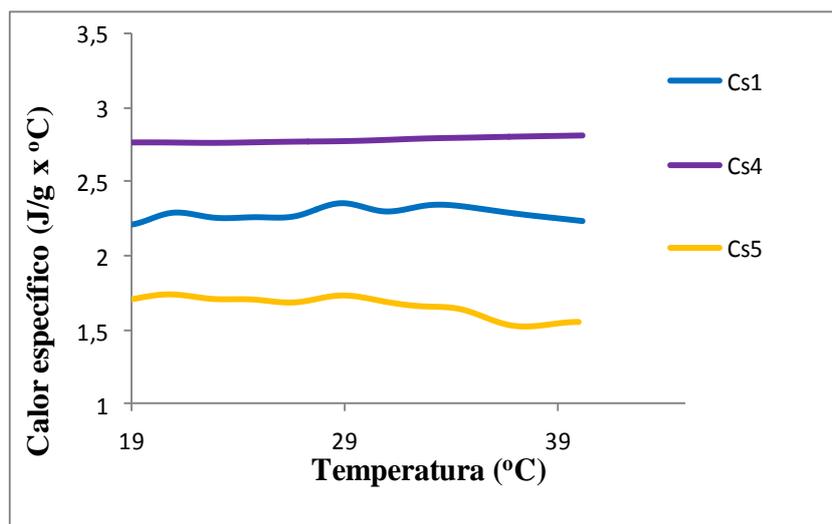


Figura 5-36 - Calor específico *versus* temperatura pelo método StepScan DSC em géis de colágeno 2,2% sem HU (Cs1), com 20mg/mL HU (Cs4) e com 40mg/mL de HU (Cs5).

5.5.3 Gel 6,7% e gel 2,2%

Os géis que possuem maior concentração de solvente, géis de 2,2% de colágeno, apresentam mais ligações de hidrogênio, e conseqüentemente aumento das forças intermoleculares. Ao fornecermos calor, há um aumento da energia média das moléculas, fazendo com que essas se movam mais rapidamente. Parte da energia fornecida é retirada primeiro para quebrar essas ligações de hidrogênio e o restante para aumentar o movimento molecular. Quando o solvente é absorvido pelo material, sua mobilidade fica restrita, o que requer maior energia. Essa afirmação pode ser uma justificativa para a Figura 5-37 que apresenta a diferença entre os géis C1 e Cs1 (sem HU), onde C1 possui concentração de colágeno maior que o gel Cs1 (sem HU), aprisionando maior quantidade de solvente em sua estrutura e conseqüentemente apresentando maior calor específico.

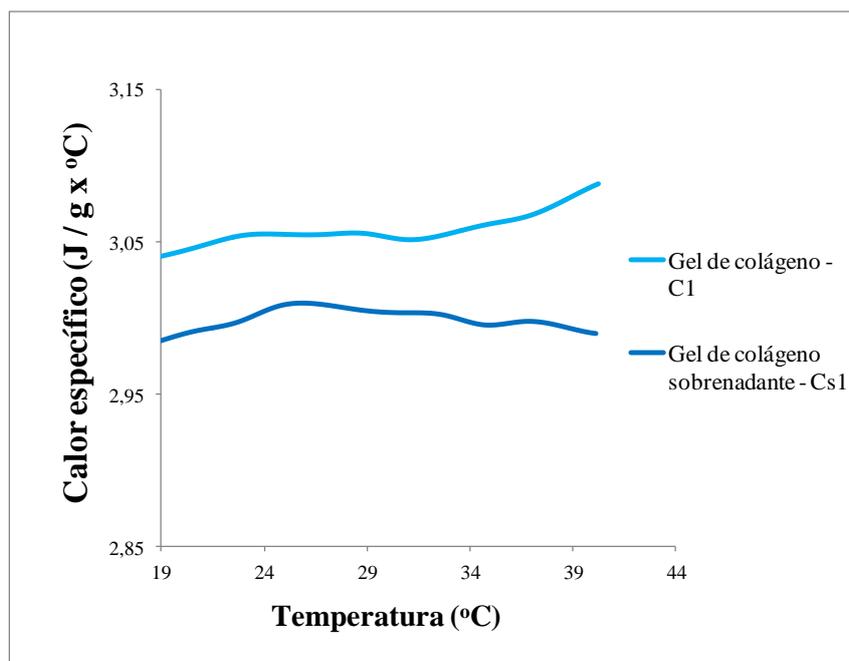


Figura 5-37 - Calor específico *versus* temperatura pelo método StepScan DSC indicando as diferenças entre o gel de colágeno 6,7% (C1) e o gel 2,2% (Cs1).

5.5.4 Géis de hemoglobina bovina

Os géis de hemoglobinas bovina e suína apresentaram comportamento térmico semelhante, porém diferente do comportamento dos géis de colágeno. Na hemoglobina bovina representada pela Figura 5-38, o gel que apresenta maior calor específico é o gel com concentração de HU de 40mg/mL (HVn3).

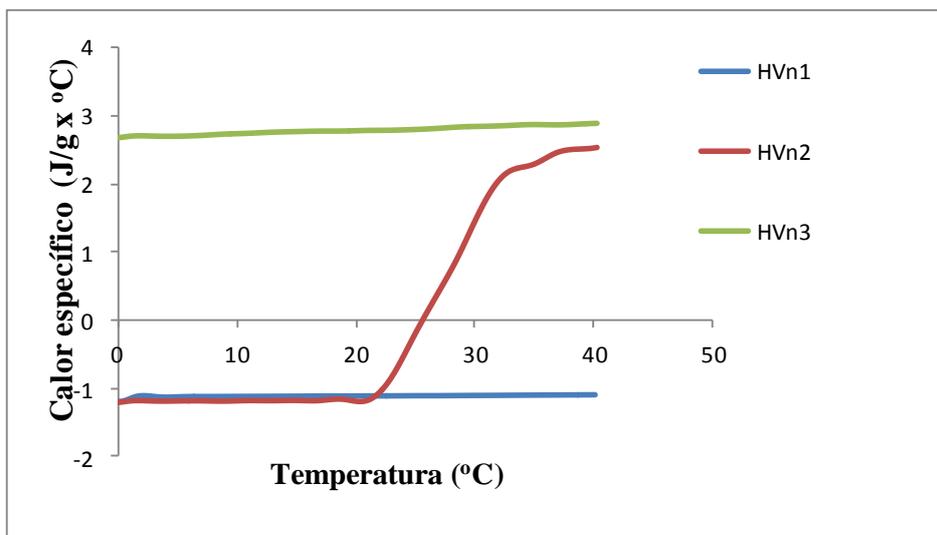


Figura 5-38 - Calor específico *versus* temperatura através do método StepScan DSC de géis de hemoglobina bovina obtidos em solução de glutaraldeído 1% sem HU (HVn1), com concentração de HU de 20mg/mL(HVn2) e com concentração de HU de 40mg/mL(HVn3).

5.5.5 Géis de hemoglobina suína

Para a hemoglobina suína, a diferença entre o gel sem HU e o gel com concentração igual à 40mg/mL (HSn3) foi mínima comparada com a do gel de hemoglobina com concentração igual à 20mg/mL (HSn2), perfil mostrado na Figura 5-39.

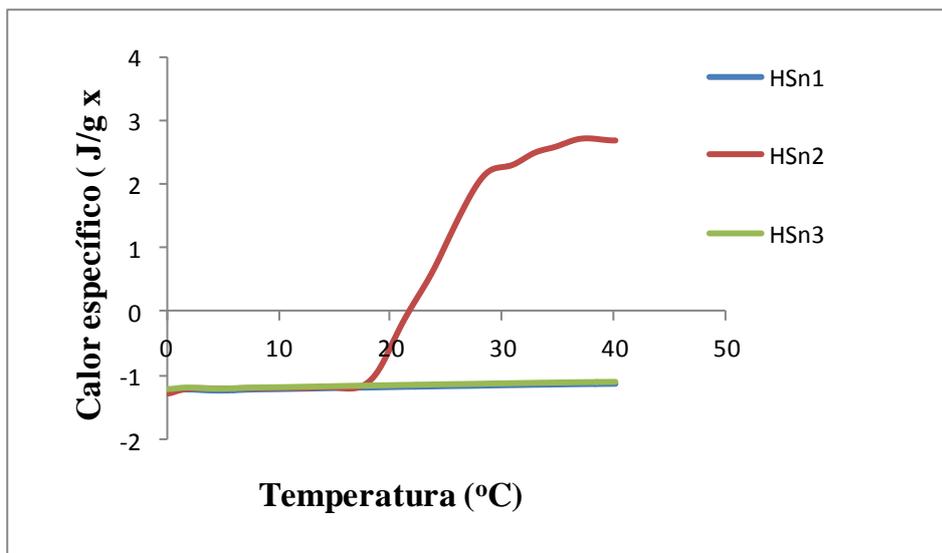


Figura 5-39 - Calor específico *versus* temperatura através do método StepScan DSC de géis de hemoglobina suína obtidos em solução de glutaraldeído 1% sem HU (HSn1), com concentração de HU de 20mg/mL (HSn2) e com concentração de HU de 40mg/mL (HSn3).

5.5.6 Diferença entre os géis de hemoglobina bovina e suína

Uma vez que são géis com interações físico-químicas diferentes, gel físico (géis de colágeno) e gel químico (géis de hemoglobina), apresentam comportamento distintos. Na Figura 5-40, é apresentada a comparação entre os géis de hemoglobinas bovina (HVn1) e suína (HSn1) sem HU. A hemoglobina suína apresenta maior calor específico, apresentando maior capacidade de retenção de líquido. Os valores dos géis HSn1 e HSn2 são muito semelhantes.

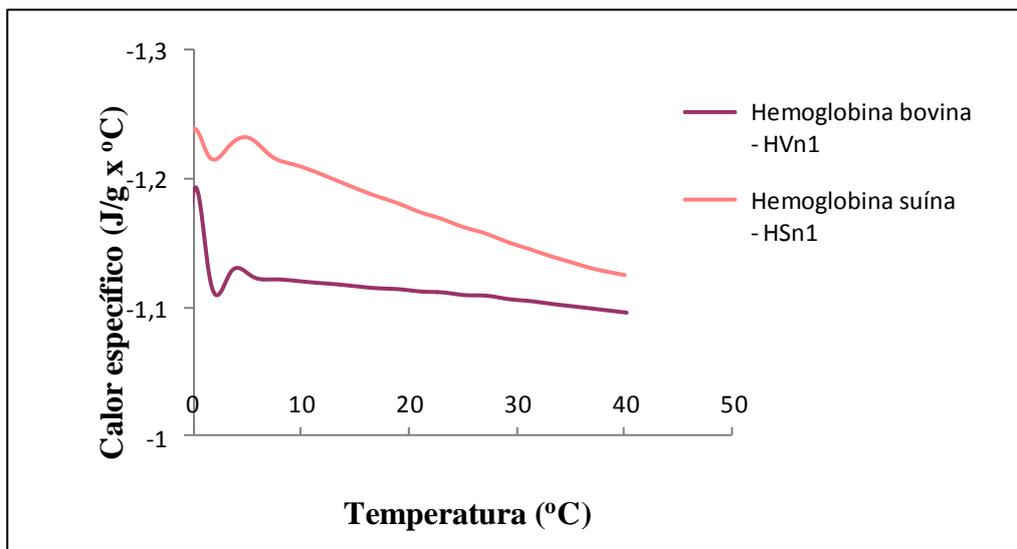


Figura 5-40 - Calor específico *versus* temperatura pelo método StepScan DSC demonstrando as diferenças entre os géis de hemoglobinas bovina e suína.

5.5.7 Géis de colágeno e géis de hemoglobinas

Na Figura 5-4,1 foram comparados os géis de colágeno 6,7% (C1), 2,2% (Cs1), de hemoglobina bovina (HVn1) e de hemoglobina suína (HSn1), todos sem a presença de HU. A diferença entre eles é devido a natureza dos géis. Os géis físicos (C1 e Cs1), apresentam calor específico maior que os géis químicos (HVn1 e HSn1), evidenciando que os géis físicos conseguem reter mais solvente.

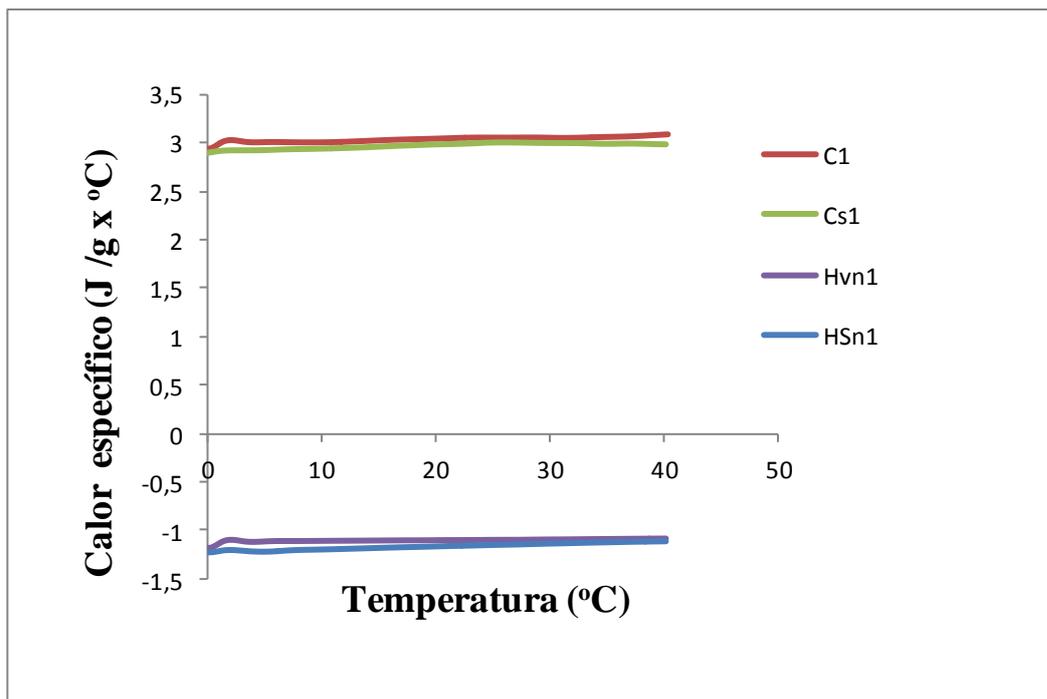


Figura 5-41 - Calor específico *versus* temperatura através do método StepScan DSC de géis de colágeno 6,7% (C1) e 2,2% (Cs1), géis de hemoglobina bovina (HVn1) e suína (HSn1) em solução de glutaraldeído 1%.

6. CONCLUSÕES

O efeito despolimerizante da hidroxiuréia (HU) sobre os géis de colágeno (gel físico) e géis de hemoglobina (gel químico) foram evidenciados por várias técnicas experimentais.

As técnicas de microscopia indicaram a diferença de estrutura entre os géis. A microscopia ótica apresentou a dispersão dos géis de hemoglobina à medida que a concentração de HU aumentava. A microscopia eletrônica de varredura dos géis de colágeno revelou que a adição de HU resulta na desarticulação da rede tridimensional, característica do gel, que se desfaz. Com adição de HU os géis de hemoglobina bovina e suína apresentam ao MEV a microestrutura mais próxima de um sólido poroso.

Os ensaios reológicos indicaram que a adição de HU nos géis com concentração de colágeno de 2,2% m/v, reduziram o limite de escoamento. As amostras de gel físico (gel de colágeno) têm intensa dinâmica interna e modificaram sua microestrutura. Após o quinto dia de vida, o gel passa a ter comportamento indicado na literatura como de líquido viscoso, diminuindo o limite de escoamento, diminuindo a sua rigidez com o tempo.

Na fase líquida estudada com auxílio de ensaios de viscosidade, os géis aumentaram a viscosidade com o tempo. Com adição de HU há uma diminuição da viscosidade, evidenciando o efeito de despolimerização da HU.

O ensaio de perda de massa indicou uma ligeira perda de massa dos géis de colágeno 2,2% Cs1 (sem HU), Cs2 (0,49mg/mL) e Cs3 (0,98mg/mL), sendo que o gel sem HU teve a maior porcentagem de perda. Esse resultados corroboram com os resultados do MEV, onde ficou evidenciado que a rede tridimensional mais organizada facilita a volatilização de solvente, caso do gel sem HU (Cs1).

Os ensaios de calorimetria exploratória diferencial indicaram que entre os géis de colágeno, o calor específico aumenta com a concentração de colágeno. Com adição de HU, o calor específico diminui. Nos géis de hemoglobina bovina e suína com concentração de HU igual à 20mg/mL, existe uma clara transição no intervalo de temperatura de 20°C à 40°C. Os géis de concentração de HU igual à 40mg/mL não apresentaram transição pois a estrutura do gel foi desarticulada.

Pode-se inferir que a HU tem efeito na gelificação, sendo possível admitir que esse efeito também ocorra na polimerização da hemoglobina HbS.

7. Sugestão para trabalhos futuros

A partir do presente trabalho sugere-se a ampliação com a realização das seguintes etapas:

- Desenvolvimento de novos métodos de preparo de géis com maior aproveitamento da amostra, pois há uma quantidade considerável de resíduos ;
- Levantamento, seleção e investigação de agentes gelificantes para compará-los com a polimerização da hemoglobina falciforme e de agentes anti-gelificantes para testar o efeito despolimerizante sobre os géis;
- Preparação de géis de hemoglobina extraída de amostra de sangue de doadores e pacientes;
- Determinação do calor específico da hidroxiuréia;
- Prosseguimento da determinação, identificação e compreensão das transições térmicas de géis pelo ensaio de calorimetria exploratória diferencial;
- Avaliação do efeito de gases (CO₂ e ar) em amostras de géis para compará-los com a polimerização de hemoglobina falciforme;
- Desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostras na fase gel para microscopia ótica e eletrônica de varredura;
- Aperfeiçoar a metodologia de ensaios de reologia para a investigação de géis.

8. Referências Bibliográficas

1. HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. Archives International Medicine, v. 6, p. 517-521, 1910.
2. PAULING, L. Molecular disease and evolution. Bulletin of the New York Academic Medicine, v. 40, p. 334-342, 1964.
3. ZAKHAROV, M. N.; APRELEV, A.; TURNER, M, S.; FERRONE, F. A. The microrheology of sickle hemoglobin gels. Biophysical Journal, v. 99, p. 1149-1156, 2010.
4. Portal do governo brasileiro. Lançamento da campanha para desmistificar a anemia falciforme. 2012. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/lançada-campanha-para-desmistificar-a-anemia-falciforme>. Acesso em 16 de janeiro de 2014.
5. CHARACHE, S.; TERRAIN, M. L.; MOORE, R. D.; DOVER, G. J.; BARTON, F. B.; ECKERT, S. V.; MCMAHON, R. P.; BONDS, D.R. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. New England Journal of Medicine, v.332, p. 1317-1322, 1995.
6. YAROSLAVSKY, A. N. et al. Optics of blood. In: TUCHIN, V. V. Handbook of optical biomedical diagnostics. Massachusetts: SPIE PRESS, 2002.
7. SHIGA, T.; MAEDA, N.; KON, K. Erythrocytes Rheology. Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 10, p. 9-48, 1990.
8. KIM, Youngchan.; KIM, Kyoo Hyun.; PARK, Youngkeun. Measurement techniques for red blood cell deformability: recent advances. Em MOSCHANDREOU, Terry E. Blood Cell- An Overview of studies in Hematology. INTECH, 2012, p. 167-192.

9. PIMENTA, L. Dosagem de hemoglobina glicosilada no monitoramento de diabetes mellitus. *Labor News*, v. 221, 2011.
10. MEHANNA, A. S. Sickle Anemia and Antisickling Agents Then and Now. *Current Medical Chemistry*, V. 8, P. 79-88, 2001.
11. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 1998. 1020 páginas.
12. TANAKA, P. P.; TANAKA, M. A. Substâncias Carreadoras de Oxigênio à Base de Hemoglobina: Situação Atual e Perspectivas. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 53, p. 543-554, 2003.
13. PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J., WELLS, I. C. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*, v. 110, p. 543-548, 1949.
14. RESS, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. *Seminar*, v.376, p. 2018-2031, 2010.
15. SYDENSTRICKER, V. P. Futher observations on sickle cell anemia. *Journal American Medical Association*, v.83, p. 12-15, 1924.
16. GRAHAM, G. S. Case of sickle cell anaemia with necropsy. *Archive of Internal Medicine*, v. 34, p. 778-800, 1924.
17. WATSON, J.; STAHAM, A. W.; BILLELO, F. P. The significance of the paucity of sickle cells in newborn negro infants. *American Journal of Medical Science*, v. 215, p. 419-423, 1948.
18. PERUTZ, M. F.; LIQUIORI, A. M.; EIRICH, F. X-ray and solubility studies of the haemoglobin of sickle-cell anaemia patients. *Nature*, v. 167, p. 929-931, 1951.

19. JOHN, A. B.; RAMLAL, A.; JACKSON, H.; MAUDE, G. H.; SHARMA, A. W.; SERJEANT, G. R. Prevention of pneumococcal infection in children with homozygous sickle cell disease. *BMJ*, v. 26, p. 1567-1570, 1984.
20. GASTON, M. H. M.; VERTER, J. L., *et al.* Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. *New England Journal of Medicine*, v. 314, p. 1593-1599, 1986.
21. JOHNSON, F. L.; LOOK, A. T.; GOCKERMAN J.; RUGGIERO, M. R.; DALLA-POZZA, L.; BILLINGS, F. T. Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *New England Journal of Medicine*, v. 311, p. 780-783, 1984.
22. ADAMS, R. J.; MCKIE, V. C.; HSU, L., *et al.* Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *New England Journal of Medicine*, v. 339, p. 5-11, 1998.
23. VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 4^a edição. Estados Unidos: Wiley, 2011. 1512 páginas.
24. PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *New England Medical Journal*, Boston, v. 358, p. 1362-1369, 2008.
25. HANNEMANN, A.; WEISS, E.; REES, D. C.; DALIBALTA, S.; ELLORY, J. C.; GIBSON, J. S. The Properties of Red Blood Cells from Patients Heterozygous for HbS and HbC (HbSC Genotype). *Hindawi Publishing Corporation*, v. 20, p. 1-8, 2011.
26. FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries new concepts, and future promise. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, p. 850-858, 2007.
27. BRIEHL R. W. Solid-like behavior of unshared sickle haemoglobin gels and the effects of shear. *Nature*, v. 288, p. 622-624, 1980.

28. GABRIEL D. A.; SMITH L. A.; JOHNSON C.S., Jr. Elastic properties of deoxy hemoglobin S (deoxy-HbS) gels. *Archive Biochemistry and Biophysics*, v. 211, p. 774–776, 1981.
29. DANISH E. H.; HARRIS J. W.; KRIEGER, I.M. Rheologic behavior of deoxyhemoglobin S gels. *Journal of Molecular Biology*, v. 196, p. 421–431, 1987.
30. EATON, W. A.; HOFRICHTER, J. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Advances in Protein Chemistry*, v. 40, p. 63-279, 1990.
31. FERRONE, F. A.; HOFRICHTER, J.; EATON, W. A. Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. *Journal of Molecular Biology*, v. 183, p. 611-631, 1985b.
32. LUNGI, A.; ALONI, C.; GIGANTE, L.; MAZZEI, N.; CARDILLO, P. Hydroxyurea explosion: a thermoanalytical and calorimetric study. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, v. 15, p. 489–495, 2002.
33. GALKIN, O.; PAN, W.; FILOBELO, L.; HIRSCH, R. E.; NAGEL, R. L.; VEKILOV, P. G. Two- Step Mechanism of Homogeneous Nucleation of Sickle Cell Hemoglobin Polymers. *Biophysical Journal*, v. 93, p. 902-913, 2007.
34. DRESLER, W. F. C.; STEIN, R. Ueber den Hydroxylharnstoff. *Justus Liebigs Ann. Chem. Pharmacol.*, v. 150 p. 242-252, 1869.
35. ROSENTHAL, F.; WISLICKI, L.; KOLLEK, L. Ueber die Beziehungen von Schwersten Blutgiften zu Abbauprodukten des Eiseisses. Ein Beitrag zum Entstehungsmechanismus de Perniziosen Anamie. *Klin. Wochstr.*, v. 7, p. 972-977, 1928.
36. TIMSON, T. Hydroxyurea. *Mutation Research*, v. 32, p. 115-132, 1975.

37. KUMAR, S., SINHA, P. K., MUDALI, U. K., NATARAJAN, R. Thermal decomposition studies of aqueous and nitric solutions of hydroxyurea. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 292, p. 1131-1135, 2012.
38. MAITY, G. P. Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids. *Journal of Physical Sciences*, v. 11, p. 156-171, 2007.
39. BRINCKMANN, J.; NOTBOHM, H.; MULLER, P. K., *et al.* Collagen: primer in structure, processing and assembly. Springer, 2005. 252 páginas.
40. BAER, E.; HILTNER, A.; Keith, H. D. Hierarchical structure in polymeric materials. *Science*, Ohio, v. 235, p. 1015-1022, 1987.
41. TANAKA, F. Polymer Physics – Applications to molecular association and thermoreversible gelation. Cambridge, p. 97-127.2011.
42. ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian, *et al.* The Shape and Structure of Proteins. Em *Molecular Biology of the Cell*. 4a. edição, Nova York: Garland Science; 2002. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26830/>. Acessado em 15 janeiro de 2014.
43. PARK, Joon; LAKES, Roderic S. Biomaterials - An introduction. 3a. edição. Nova York: Springer, 2007. 561 páginas.
44. CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxialamida internos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, p. 40-43, 1997.
45. STOWELL, C. P.; LEVIN, J.; SPIESS, B. D.; WINSLOW, R. M. Progress in the development of RBC substitutes. *Transfusion*, v. 41, p. 287–299, 2001.

46. KLUGER, R.; FOOT, J.S.; VANDERSTEEN, A. A. Protein-protein coupling and its application to functional red cell substitutes. *Chemical Communication*, v. 46, p. 1194-1202, 2010.
47. FAUST, B. *Modern Chemical Techniques: Background reading for Chemistry Teachers*. 3^a. edição. Editora The Royal Society of Chemistry, 1997. 192 páginas.
48. MURPHY, D. B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Estados Unidos da América: Editora John Wiley & Sons, Inc., 2001. 384 páginas.
49. KNOLL, M. Aufladepotential und Sekundäremission elektronenbestrahlter Körper. *Z Tech. Phys.* v.16, 467-475, 1935.
50. ZWORYKIN, V.K.; HILLER, J.; SNYDER, R.L. *ASTM. Bulletin*. n. 15, p.117, 1942.
51. BOZZOLA, J. J., RUSSEL, L. D. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Segunda edição. Illinois: Jones and Bartlett publishers, 1998. 670 páginas.
52. KAECH, A. *An Introduction to Electron Microscopy Instrumentation, Imaging and Preparation*. Center for Microscopy and Image Analysis, University of Zurich. 2013.
53. HAFNER. B. *Scanning Electron Microscopy Primer*. Characterization Facility, University of Minnesota. Twin Cities: 2007.
54. MENARD, K. *StepScan DSC for Obscured Transitions*. Thermal Laboratory College of Materials Science and Engineering, 2013.
55. MENCZEL, J. D.; PRIME, R. B. *Thermal Analysis of Polymers – Fundamentals and applications*. EUA, 2009. 696 páginas.

56. RAMOS, Júlia C. Metodologia para controle operacional de barreiras geossintéticas empregados em depósitos de rejeitos de mineração. 2013. 139 páginas. Dissertação (Mestrado em Geotecnia) – Escola de Minas/UFOP, 2013.
57. HOHNE, G. W. H.; HEMMINGER, W. F.; FLAMMERSHEIM, H. J. Differential Scanning Calorimetry. 2a. edição. Nova York: Springer, 2003. 298 páginas.
58. THOMAS, L. C. Use of multiple heating rates DSC and modulated temperature DSC to detect and analyze temperature-time dependent transition in materials. American Laboratory, 2001.
59. CHEN, W.; DADMUN, M.; ZHANG, G.; Boller, A.; WUNDERLICH, B. Isotropization of nematic liquid crystals by TDMSC. *Thermochemica Acta*, v. 324, p. 87-94, 2008.
60. LAPPALAINEN, M.; KARPPINEN, M. Techniques of differential scanning calorimetry for quantification of low contents of amorphous phases. *Journal Thermal Analysis and Calorimetry*, Hungria, v. 102, p. 171-180, 2010.
61. BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. An introduction to rheology. 1ª edição. Amsterdam: Elsevier, 1965. 200 páginas.
62. MALKIN, A. Y.; ISAYEV, A. Rheology: Concepts, Methods and Applications. 2a. edição. Toronto: ChemTec Publishing, 2011. 528 páginas.
63. BARNES, Howard A. A handbook of elementary rheology. 1a. edição. Inglaterra: Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics – University of Wales, 2000. 210 páginas.
64. TANJORE, Deepti. A new application for Brookfield viscometers viscoelastic property determination. 2005. 174 páginas. Dissertação de Mestrado de Ciências – Universidade do Estado da Carolina do Norte, Departamento de Engenharia biológica e agrícola., Carolina do Norte, 2005.

65. SANTOS, Nuno. Estudo da Reologia de Fluidos Análogos do Sangue. 2009. 85 páginas. Bolsa de iniciação – Mestrado em Engenharia Mecânica – Universidade do Porto, Faculdade de Engenharia, Portugal, 2009.
66. CHHABRA, R. P. Non-Newtonian Fluids: An Introduction. Em DESHPANDE, A. P., KRISHNAN, J. M. e KUMA, P. B. S. Rheology of Complex Fluids. Munich. Springer, 2010, p. 3-34.
67. BARNES, H. A. The yield stress – a review or ‘παντα ρει’ – everything flows. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Reino Unido, v. 81, p. 133-178, 1998.
68. PERNELL, C.W., FOEGEDING, E.A., DAUBERT, C.R. Measurement of the Yield Stress of Protein Foams by Vane Rheometry. Journal of food science, v. 65, p. 110-114, 2000.
69. BARNES, H. A.; NGUYEN, Q. D. Rotating sensor de cisalhamento Vane rheometry — a review. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Reino Unido, v. 98, p. 1-14, 2000.
70. HAUG, I. J.; DRAGET, K. I. Gelatins. In: PHILIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Handbook of food proteins. Filadélfia: Editora Woodhead Publishing Limited, 2011. P. 92-114.
71. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. J. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal biological chemistry, v. 177, p. 751-66, 1949.
72. WEICHELBAUM, T. E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. American journal of clinical pathology, v. 16, p. 40, 1946.
73. SLATER, L.; CARTER, P. M.; HOBBS, J. R. Measurement of albumin in the sera of patients. Annals of clinical biochemistry, v. 12, p. 33-40, 1975.

74. BATSAKIS, J. G.; AROUSOHN, R. S.; WALKER, W. A.; BARNES, B. Serum albumin. A CAP survey. American journal clinical pathology, v. 66, p. 238-43, 1976.
75. HOEL. P. G. Estatística Elementar. 3ª.edição. Rio de Janeiro: Editora Fundo de Cultura S/A, 1969.
76. TONKS, D. B. A Study of the Accuracy and Precision of Clinical Chemistry Determinations in 170 Canadian Laboratories. Journal clinical chemistry, v. 9, p. 217-233, 1963.
77. TIETZ, N. W., BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. Textbook of Clinical Chemistry. 2ª. edição. Filadélfia: WB Saunders - Science, 1994. 2326 páginas.
78. SOUZA, W. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. 3ª. edição. Brasil. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2010. 372 páginas.
79. XU, B.; Chow, M.; Zhang, Y. Experimental and modeling study of collagen scaffolds with the effects of crosslinking and fiber alignment. International Journal of Biomaterials, v, 2011, p. 1-12, 2011.
80. SHANJANI, Y.; CROOS, J. N. A.; PILLIAR, R. M.; KANDEL, R. A.; TOYSERKANI, E. Solid freeform fabrication and characterization of porous calcium polyphosphate structures for tissue engineering purposes. Original research report, p. 510-519, 2010.

9. Publicações do autor



REDEMAT
REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS
UFOP - CETEC - UEMG



The effect of hydroxyurea (HU) in the phase transitions of collagen gels

Alves, E. D. L.¹, Cardoso, A. V.^{1,2}

¹REDEMAT-Rede Temática em Engenharia de Materiais UFOP-UEMG-CETEC, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Centro de Tecnologia SENAI CETEC, Belo Horizonte, MG, Brasil



Key words: Hydroxyurea, collagen, SSDSC

INTRODUCTION

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited blood disorder that affects red blood cells (RBC). The sickle cell gene causes the body to produce abnormal hemoglobin (HbS) which polymerizes – in its deoxygenated state – generating nanometric fibers which cause the gelification, consequently red blood cells develop a sickle form¹. These sickled red blood cells can block blood vessels resulting in vaso-occlusion, tissue and severe organ damage. The drug that reduces the severity of sickle cell disease is hydroxyurea (HU)^{2,3}. Our hypothesis is that HU has an anti-gelling effect, dissolving the HbS gel, and decreasing the vascular occlusion risk. To investigate the anti-gelling action of HU we used bovine collagen type I as the gelling agent, the thermal analysis technique of modulated Step Scan DSC (SSDSC) to analyze the effect of HU addition on the phase transitions of the collagen gel and scanning electron microscope (SEM) to reveal the differences between gel-morphologies.

OBJECTIVE

To investigate the anti gelling effect of HU on type I collagen gels using differential scanning calorimetric (DSC) and scanning electron microscopy(SEM).

MATERIALS AND METHOD

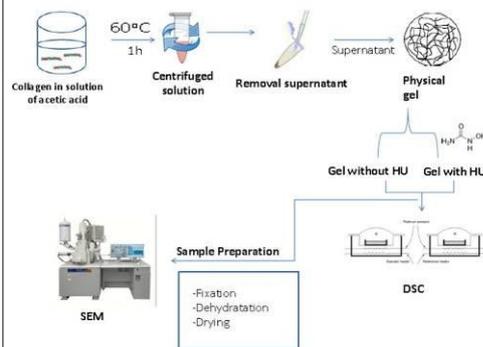


Figure 1 – Diagram of sample preparation

Gels of type I collagen from bovine tendon were solubilized in a solution of acetic acid 0,02M at least 1 hour at 60°C. The mixture was centrifuged at 2500 rpm for 15 minutes and the supernatant was collected. The solution pH was adjusted for 7.4. In such experiments, four parts of collagen solution was mixed with one part of hydroxyurea. Step Scan DSC experiments were carried out with temperature step 3°C, heating rate in the temperature step 2°C min⁻¹, basic isotherm duration of 60s with equilibrium criterion ($\pm 0.05\mu W$). Samples of gels were fixed, dehydrated and dried using a protocol suggested by Glauert, 1975⁴.

RESULTS AND DISCUSSION

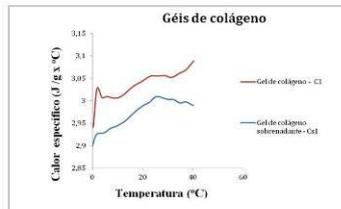


Figure 2 - SSDSC scan of collagen gels with and without HU in the interval 0°C to 40 °C.

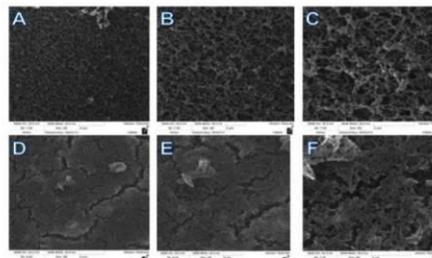


Figure 3 – SEM 2D images of collagen gels alone (images A,B and C) and with addition of hydroxyurea (images D,E,F). Magnifications of top and bottom images are the same (A=D- 5000x, B=E-10000x and C=F - 20000x)

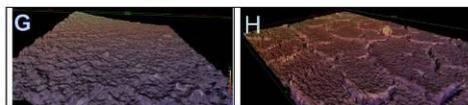


Figure 4 – SEM 3D images of collagen gel (G) and collagen gel with addition of hydroxyurea (H). Magnification 1000x.

The figure 2 displays the distinct behavior of gels with and without HU as temperature increases. The collagen gel without hydroxyurea holds more water inside his structure therefore presenting a higher specific heat. The collagen gel with HU addition is much weaker on holding water and therefore presents lower cp.

In figures 3 and 4, the SEM images 2D and 3D show the differences of microstructure between gels with and without HU. The collagen gel without HU presents a three-dimensional network top images with random array of fibers allowing the entrapping of a large volume of water solvent, therefore presenting a high Water Holding Capacity (WHC). The structure of collagen gels with HU a looser network structure compared to other gel presents less blanks and resulting in reduced capacity to retain the solvent.

REFERENCES

1. Finch, J.T., Perutz, J. F., Bertles, J.F., Dobler, J. Structure of Sickled Erythrocytes and of Sickle-Cell Hemoglobin Fibers. Proc. Nat. Acad. Sci. 1973, 3:718-722.
2. Lunghi A, Aloni C, Gigante L, Mazzetti N, Cardillo P. Hydroxyurea explosion: a thermoanalytical and calorimetric study. Journal of Loss Prevention in the Process Industries 2002;15:489–495.
3. Charache, S., Terrain, M. L., Moore, R. D., Dover, G. J., Barton, F. B., Eckert, S. V., McMahon, R.P., Bonds, D.R. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. N Engl J Med. 1995;332(20):1317-22.
4. Glauert, A.M. Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens. North-Holland Publishing Company, 1975. 3:45-46.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Center of Microscopy in Federal University of Minas Gerais and Bioengineering Center of Invasive Species for technical assistance with the SEM experiments and valuable suggestions. For CAPES and FAPEMIG for financial support and NovaProm Food Ingredients Ltda. by to provide some raw materials for this work.

Figura 9-1 - Pôster apresentado no XII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais – SBPMat^[56].



Salvador, 18 de Novembro de 2013.

Assunto: Convite

A/C: Antonio Valadão Cardoso e Ellen Denise Lopes Alves

Prezados,

De 20 a 23 de Novembro de 2013 estaremos realizando em no Centro de Convenções da Bahia, em Salvador, o VII Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme.

Na oportunidade estaremos organizando também a Tenda Maria Felipa, espaço sociopoético da Educação Popular em Saúde, onde a temática da doença falciforme continuará a ser desenvolvida com outras linguagens e concepções.

Portanto vimos através desta convidá-la à apresentar no espaço da Tenda Maria Felipa, exposição sobre: "Gelatinização e agentes anti-geleíficantes: um modelo para compreender a geleificação da Hb S e o efeito da hidroxurêla", temática esta que muito nos interessa para a discussão da doença falciforme no SUS.

A data, da apresentação poderá ser no dia 21 de novembro, às 16:45h, por quinze minutos, abrindo para o debate, numa mesa onde falaremso de cuidado integral e ahidroxiurêia vem assumindo importante papel na melhora da condição de vida das pessoas com doença falciforme.

Grato

Altair dos Santos Lira

Comissão Organizadora

VII Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme

Figura 9-2 - Carta convite para apresentação no VII Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme.