

MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA HEMOGLOBINA BOVINA COM SACARÍDEOS

Felipe Fortes de Lima

Dissertação em Ciência e Tecnologia de Polímeros, submetida ao Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros, sob orientação da Professora Cristina Tristão de Andrade.

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dissertação de Mestrado:

Modificação química da hemoglobina bovina com sacarídeos

Autor: Felipe Fortes de Lima

Orientador: Cristina Tristão de Andrade

Co-orientador: Maria Celiana Pinheiro Lima

Data da defesa: 16 de julho de 2007

Aprovada por:

Professora Cristina Tristão de Andrade, DSc
Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – IMA / UFRJ
Orientadora/Presidente da Banca Examinadora

Professora Maria Celiana Pinheiro Lima, DSc
CEFET - RJ
Co-orientadora

Professor Luis Cladio Mendes, DSc
Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – IMA / UFRJ

Professor Edwin Gonzalo Azero Rojas, DSc
Departamento de Ciências Naturais – DCN / UNIRIO

Gisela Kloc Lopes, DSc
Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – IMA / UFRJ

Rio de Janeiro
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Felipe Fortes de.

Modificação química da hemoglobina bovina com sacarídeos / Felipe Fortes de Lima. – Rio de Janeiro, 2007.
xx, 97 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Polímeros) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – IMA, 2007.

Orientador: Cristina Tristão de Andrade.

Co-orientador: Maria Celiana Pinheiro Lima.

1. Hemoglobina bovina. 2. Amilose. 3. Carreador de oxigênio. 4. Hylon VII. 5. Polímeros. I. Andrade, Cristina Tristão (Orient.). II. Lima, Maria Celiana Pinheiro (Co-orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano. IV. Título.

Esta Dissertação de Mestrado foi desenvolvida nos Laboratórios do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio Janeiro, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Esta Dissertação de Mestrado dá prosseguimento a uma linha de pesquisa do IMA-UFRJ, iniciada com a seguinte dissertação:

Purificação e caracterização de hemoglobina humana: Efeitos dos métodos usados para lise de hemácias. Lúcio André Monteiro de Barros, dissertação de mestrado defendida em 2003. Professor Orientador: Cristina Tristão de Andrade.

Isolamento, purificação e modificação química de hemoglobina. Maria Celiana Pinheiro Lima, tese de doutorado defendida em 2006. Professor Orientador: Cristina Tristão de Andrade.

CRÉDITOS

O apoio financeiro dado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Frigorífico J N de Abreu Comércio de Carnes LTDA, por ceder as amostras de sangue bovino, utilizadas nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

- As minhas orientadoras, Dr. Cristina Tristão de Andrade e Dr. Maria Celiana Pinheiro Lima, pela amizade e paciência, por toda dedicação e disposição em ajudar, me orientando neste trabalho. Obrigado pelos ensinamentos!
- Aos meus pais e minha irmã, por se mostrarem tão presentes, obrigado pelo incentivo e compreensão. As minhas avós Yedda e Cícera pela força. Muito obrigado pela participação na minha formação como pessoa.
- A minha namorada e grande amiga Bianca, por toda compreensão e companheirismo nas horas que mais precisei.
- Aos amigos do IMA, Patrícia, Diego, Carlos Ivan, Gisela, Márcia, Thiago, Fernanda, Natália, Regina, Leandro, Adriano que compartilharam comigo os momentos de angústia e felicidades para a conclusão deste trabalho.
- Aos professores do IMA que contribuíram para o meu crescimento acadêmico.
- Aos funcionários: Arceu, Léa Lopes, Márcia Benzi, Dalva, Victor Pita, Sandra, Maria das Graças, Eduardo Mendez que sempre se mostraram prestativos quando mais precisei.
- A todos os amigos que direta ou indiretamente torcem por mim.

*“Aprender sem pensar é inútil.
E pensar sem aprender, perigoso”*
Confúcio

Resumo da Dissertação apresentada no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (MSc), em Ciência e Tecnologia de Polímeros.

MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA HEMOGLOBINA BOVINA COM SACARÍDEOS

Orientador: Cristina Tristão de Andrade

Co-orientador: Maria Celiana Pinheiro Lima

A pesquisa por um substituto sangüíneo ideal foi motivada principalmente pelo desejo em atenuar os principais problemas relacionados à transfusão sangüínea: a necessidade de prova cruzada, o tempo de armazenamento relativamente curto das células sangüíneas, e a transmissão de doenças infecciosas. Os substitutos sangüíneos apresentam apenas a função de carrear os gases oxigênio e dióxido de carbono durante um certo período de tempo. O sangue bovino foi usado como matéria-prima no desenvolvimento de substituto para o sangue porque a hemoglobina bovina (HbBv) possui comportamento favorável em relação à afinidade ao oxigênio em presença de íons cloreto. A HbBv para servir como carreador de oxigênio deve ser isolada, purificada e modificada quimicamente. A modificação é importante para manter e aumentar a massa molar da HbBv uma vez que, sem a modificação, a HbBv sofre dissociação na corrente sangüínea, o que causa toxicidade renal. No presente trabalho, a HbBv foi isolada, extensivamente purificada e modificada com oligômeros de amilose. A amilose foi obtida por meio da fusão dos grânulos de amido modificado geneticamente, com elevado teor de amilose (Hylon VII). A amilose foi hidrolisada por ultra-som e caracterizada por GPC e por viscosimetria. Os produtos oriundos da reação de HbBv com oligômeros de amilose oxidados (poli-HbBv) foram analisados por técnicas de GPC e eletroforese. O teor de met-hemoglobina (HbBv oxidada) nos produtos foi quantificado por espectroscopia de absorção no ultravioleta.

Rio de Janeiro

2007

Abstract of Dissertation presented to Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano of Universidade Federal do Rio de Janeiro, as partial fulfillment of the requirement for the degree of Master in Science (MSc), Science and Technology of Polymers.

CHEMICAL MODIFICATION OF BOVINE HEMOGLOBIN WITH SACHARIDES

Advisor: Cristina Tristão de Andrade

Co-advisor: Maria Celiana Pinheiro Lima

The search for an optimal blood substitute was primarily motivated by the desire of attenuating major blood transfusion-related problems: need for cross test, relatively short storing time of blood cells and transmission of infectious diseases. Blood substitutes present the only function of carrier gases oxygen and carbon dioxide during a certain period of time. The bovine blood was used as raw material in the development of blood substitutes because the bovine hemoglobin (HbBv) possesses a favorable behavior in relation to the affinity to oxygen in presence of chloride ions. To serve as an oxygen carrier, HbBv should be isolated, extensively purified and chemically modified. The modification is important to increase the molar mass of HbBv because, without modification, HbBv suffers dissociation in the corporal circulation, which causes renal toxicity. In the present work, HbBv was isolated, purified and modified with oligomers of amylose. A sample of Hylon VII, genetically modified starch with a high content of amylose, was processed in the internal mixer of a Haake system. The resulting product was treated by ultrasound, and characterized by GPC and viscosimetry. Products from the reaction of HbBv with oxidized oligomers of amylose (poly-HbBv) were analyzed by GPC and electrophoresis. The content of methemoglobin, oxidized hemoglobin, was also quantified.

Rio de Janeiro

2007

Parte desta Dissertação de Mestrado foi apresentada no seguinte congresso:

Felipe Fortes de Lima, Diego S. Baptista, Maria Celiana P. Lima e Cristina T. Andrade. Quantification of methemoglobin and macromolecular characterization of modified bovine hemoglobin samples. 15th World Fórum on Advanced Materials – POLYCHAR 15, Rio de Janeiro, abril de 2007.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da composição do sangue	03
Figura 2 – Estrutura bicôncava das hemácias	04
Figura 3 – Modelos espaciais da estrutura da hemoglobina	06
Figura 4 – Curva de dissociação da oxi-hemoglobina em função da pO_2	08
Figura 5 – Complexo ferro-protoporfirina ligado a uma molécula de O_2	09
Figura 6 – Afinidade por oxigênio de soluções de hemoglobina bovina (curva 1) e de hemoglobina humana (curva 2)	11
Figura 7 – Dissociação de tetrâmero em dímero.....	12
Figura 8 – Ilustração de principais modificações em hemoglobina	14
Figura 9 – Estruturas químicas da amilose (a) e amilopectina (b).....	15
Figura 10 – Estrutura supramolecular da amilopectina	18
Figura 11 – Difractogramas de raios-X dos diferentes tipos de amidos	11
Figura 12 – Comparação entre padrão, Hemopure e HbBv na análise por eletroforese	28
Figura 13 – Curva de dissociação de HbBv e Hemopure nas condições de pH 7,4 100 mM de Cl^- a 37°C	28
Figura 14 – Estrutura do grupo de troca iônica da resina Q Sepharose Fast Flow	35
Figura 15 – Reação de oxidação da amilose	50
Figura 16 – Amostra FFL-001 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20min; 170°C; 70 rpm; ρ_{amido} 0,508 g/cm ³)	53

Figura 17 – Amostra FFL-002 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20 min; 170 °C; 90 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$).....	53
Figura 18 – Amostra FFL-003 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20 min; 180 °C; 70 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$)	53
Figura 19 – Amostra FFL-004 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20 min; 180 °C; 90 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$).....	53
Figura 20 – Amostra FFL-005 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20 min; 180 °C; 110 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$).....	54
Figura 21 – Amostra FFL-006 com 20% de umidade e 50% de glicerol (15 min; 180 °C; 90 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$)	55
Figura 22 – Amostra FFL-007 com 20% de umidade e 50% de glicerol (15 min; 180 °C; 100 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$).....	55
Figura 23 – Curva de torque das amostras FFL-008 e FFL-009 (15min; 180 °C)	56
Figura 24 – Curva de temperatura das amostras FFL-008 e FFL-009 (15min; 180 °C)	56
Figura 25 – Amostra FFL-010 com 30% de glicerol (15 min; 180 °C; 70 rpm; $\rho_{\text{amido}} 1,2 \text{ g/cm}^3$)	56
Figura 26 – Amostra FFL-011 com 30% de glicerol (15 min; 180 °C; 80 rpm; $\rho_{\text{amido}} 1,2 \text{ g/cm}^3$)	56
Figura 27 – Amostra FFL-012 com 40% de glicerol (10 min; 150 °C; 50 rpm)	57
Figura 28 – Amostra FFL-013 com 40% de glicerol (10 min; 150 °C; 60 rpm)	57
Figura 29 – Curvas de torque das amostras FFL-014 e FFL-015 (10 min; 120 °C)	58
Figura 30 – Curvas de temperatura das amostras FFL-014 e FFL-015 (10min; 120 °C)	58

Figura 31 – Curvas de torque das amostras FFL-016 e FFL-017 (10 min; 100°C)	58
Figura 32 – Curvas de temperatura das amostras FFL-016 e FFL-017 (10 min; 100°C)	58
Figura 33 – de torque das amostras FFL-014 e FFL-016 (10 min; 50 rpm)	59
Figura 34 – Curvas de temperatura das amostras FFL-014 e FFL-016 (10 min; 50rpm)	59
Figura 35 – Curvas de torque das amostras FFL-015 e FFL-017 (10 min; 40 rpm)	59
Figura 36 – Curvas de temperatura das amostras FFL-015 e FFL-017 (10 min; 40 rpm)	59
Figura 37 – Amostra FFL-018 com 10% de glicerol (10 min; 100°C; 50 rpm; amido 1,2 g/cm ³)	60
Figura 38 – Curva de torque das amostras FFL-018 e FFL-016 (10 min; 100°C; 50 rpm; amido 1,2 g/cm ³).....	60
Figura 39 – Amostra FFL-019 com 30% de glicerol (10 min; 100°C; 40 rpm; amido 1,2 g/cm ³)	61
Figura 40 – Difração de raios-X do Hylon VII <i>in natura</i> (a), da amostra processada FFL-017 prensada em filme (b), e da amostra processada FFL-017 em filme vazado	62
Figura 41 – Espectro ¹ H NMR do Hylon VII <i>in natura</i> em DMSO-d ₆ a 30 °C.....	64
Figura 42 – Espectro ¹ H NMR da amostra processada em DMSO-d ₆ a 30 °C.....	65
Figura 43 – Espectro ¹ H NMR da amostra hidrolisada em DMSO-d ₆ a 30 °C	66
Figura 44 – Espectros de absorção na região do infravermelho do Hylon <i>in natura</i> (a), do amido processado (b) e da amilose hidrolisada (c)	68

Figura 45 – Termogramas do Hylon VII <i>in natura</i> (a), do amido processado (b) e amilose hidrolisada (c)	70
Figura 46 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-0	72
Figura 47 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-1	72
Figura 48 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-17-2.....	73
Figura 49 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-3	73
Figura 50 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-4	73
Figura 51 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-5.....	73
Figura 52 – Cromatogramas das amostras de amilose hidrolisadas em diferentes condições	74
Figura 53 – Estruturas propostas para as espécies formadas a partir de reação da HbBv com a <i>o</i> -amilose	76
Figura 54 – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a amilose após a reação com NaIO ₄ (<i>o</i> -amilose)	76
Figura 55 – Curva de calibração da concentração de albumina <i>versus</i> absorbância	77
Figura 56 – Efeito do número de lavagens no procedimento de extração de albumina do concentrado de células vermelhas	78
Figura 57 – Cromatogramas de HbBv purificada e dos produtos de HbBv modificados (mHbBv) pertencentes ao grupo 1	81
Figura 58 – Eletroforese SDS-PAGE da HbBv modificada com a <i>o</i> -amilose; padrão (linha 1), mHbBv-01 (linha 3), mHbBv-02 (linha 4), mHbBv-03 (linha 5), mHbBv-04 (linha 6) e mHbBv-05 (linha 7)	81
Figura 59 – Cromatogramas de HbBv purificada e dos produtos de HbBv modificados (mHbBv) pertencentes ao grupo 2	82

- Figura 60 – Eletroforese SDS-PAGE da HbBv modificada com a *o*-amilose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), mHbBv-06 (linha 3), mHbBv- 07 (linha 4) e mHbBv-08 (linha 5) 82
- Figura 61 – Gráfico de absorvância versus comprimento de onda para a amostra de HbBv modificada por *o*-amilose (FFL 08) 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de aminoácidos diferentes dos da hemoglobina humana.....	10
Tabela 2 – Temperatura de gelatinização de diversas fontes de amido	20
Tabela 3 – Características e especificações do Hemopure	29
Tabela 4 – Reagentes utilizados na preparação do Gel Fracionador (T=7,5%) ...	39
Tabela 5 – Reagentes utilizados na preparação do Gel Concentrador (T=3,5%).....	40
Tabela 6 – Concentração e massa molecular dos padrões utilizados.....	42
Tabela 7 – Misturas relacionadas com a densidade do amido de 0,508 g/cm ³	43
Tabela 8 – Misturas relacionadas com a densidade do amido de 1,2 g/cm ³	44
Tabela 9 – Condições para a formação de filme	45
Tabela 10 – Concentração e massa molecular dos padrões utilizados.....	47
Tabela 11 – Mostra o tempo e a quantidade de vezes que foi necessário o uso do ultra-som.....	48
Tabela 12 – Condições reacionais para amilose oxidada	52
Tabela 13 – Temperatura de início da degradação, T_{onset} , temperatura de taxa máxima de degradação, T_{deg} , e teor de água perdido durante os ensaios de degradação térmica do material	70
Tabela 14 – Dados viscosimétricos obtidos para a amilose em solução de KOH 1M a 25°C	72
Tabela 15 – Diferenças entre as análises de viscosidade e GPC	75
Tabela 16 – Valores da massa molecular numérica média (M_n), massa molecular ponderal média (M_w) e polidispersão (PD)	80
Tabela 17 – Teor de MetHb nos produtos de HbBv modificada	84

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
2.1 – SANGUE	02
2.1.1 – Hemácias	04
2.1.2 – Hemoglobina	05
2.1.2.1 - Hemoglobina bovina (HbBv)	09
2.1.3 - Dissociação da hemoglobina	11
2.2 - AMIDO	14
2.2.1 - Amilose	15
2.2.2 - Amilopectina	17
2.2.3 - Outros componentes	17
2.2.4 - Cristalinidade	18
2.2.5 - Plastificantes	21
2.2.6 - Retrogradação	23
2.3 - HEMOGLOBINAS MODIFICADAS QUIMICAMENTE	24
2.3.1 - Hemolink (Hemosol Inc.)	24
2.3.2 - PHP (Apex Bioscience)	25
2.3.3 - Hemopure (Biopure)	27
2.3.4 – PolyHeme	30
3 – OBJETIVOS	31
4. - PARTE EXPERIMENTAL	31
4.1 – MATERIAIS	31
4.2 – MÉTODOS	33
4.2.1 - Isolamento de hemácias	33
4.2.1 - Determinação da concentração de albumina	33
4.2.3 - Hemólise	34
4.2.3 - Purificação adicional da Hb	35
4.2.4.1 - Lavagem da resina de troca iônica	35
4.2.4.2 - Dinamização da resina	35
4.2.4.3 - Cromatografia líquida em coluna	36
4.2.5 - Caracterização da matéria-prima	36
4.2.5.1 - Amido	36
4.2.5.1.1 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	36

4.2.5.1.2 - Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (^1H NMR)	36
4.2.5.1.3 - Análise termogravimétrica (TGA)	37
4.2.5.1.4 - Difração de raios-X	37
4.2.5.2 - Hemoglobina Bovina	37
4.2.5.2.1 - Concentração	37
4.2.5.2.2 - Eletroforese	38
4.2.5.2.2.1 - Preparação das soluções para a eletroforese	38
4.2.5.2.2.2 - Preparação dos Géis	39
4.2.5.2.2.3 - Preparação das amostras para eletroforese	40
4.2.5.2.2.4 - Corrida eletroforética	40
4.2.5.2.2.5 - Coloração e descoloração do gel	41
4.2.5.2.2.6 - Preparação dos padrões de proteínas para eletroforese	41
4.2.5.2.3 - Cromatografia de permeação em gel (GPC)	41
4.2.5.2.3.1 - Preparação dos padrões	42
4.2.5.2.4 - Determinação de Meta-hemoglobina	42
4.2.6 - Processamento do amido	43
4.2.6.1 - Caracterização da amostra processada	44
4.2.6.1.1 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	44
4.2.6.1.2 - Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (^1H NMR)	44
4.2.6.1.3 - Análise termogravimétrica (TGA)	45
4.2.6.1.4 - Difração de raios-X	45
4.2.6.1.5 - Análise da massa molecular por viscosimetria	45
4.2.6.1.6 - Cromatografia de permeação em gel (GPC)	46
4.2.6.1.6.1 - Preparo das soluções dos padrões de Dextrana	46
4.2.7 - Hidrólise do amido processado com auxílio de ultra-som	47
4.2.8 - Caracterização do produto hidrolisado	48
4.2.8.1 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	48
4.2.8.2 - Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (^1H NMR)	48
4.2.8.3 - Análise termogravimétrica (TGA)	49
4.2.8.4 - Difração de raios-X	49
4.2.8.5 - Análise da massa molecular por viscosimetria	49
4.2.8.6 - Cromatografia de permeação em gel (GPC)	49
4.2.9 - Modificação química do oligômero de amilose	49
4.2.10 - Caracterização do oligômero de amilose oxidado (α-amilose)	50
4.2.10.1 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	50

4.2.11 - Modificação química da hemoglobina bovina com oligômeros de amilose oxidados	50
4.2.12 - Caracterização dos produtos resultantes da modificação química da hemoglobina bovina com o oligômero de amilose oxidado	52
4.2.12.1 - Determinação de Mete-hemoglobina (MetHb)	52
4.2.12.2 - Eletroforese	52
4.2.12.3 - Cromatografia de permeação em gel (GPC)	52
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 - PROCESSAMENTO DO AMIDO	53
5.2 - CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO <i>IN NATURA</i> , AMIDO PROCESSADO E AMILOSE HIDROLISADA	61
5.2.1 - Difração de Raios-X	61
5.2.2 - Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (¹H NMR)	62
5.2.3 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	66
5.2.4 - Análise Termogravimétrica (TGA)	69
5.2.5 - Viscosidade da amilose hidrolisada	71
5.2.6 - Cromatografia de permeação em gel (GPC) da amilose hidrolisada	73
5.3 - OBTENÇÃO DO REAGENTE FORMADOR DE LIGAÇÕES CRUZADAS (AMILOSE HIDROLISADA OXIDADA)	75
5.4 - OBTENÇÃO DA HbBv A PARTIR DO SANGUE BOVINO	77
5.5 - OBTENÇÃO DA HbBv MODIFICADA COM O-AMILOSE ANALISADA POR GPC E ELETROFORESE	78
5.6 - METE-HEMOGLOBINA (MetHb)	83
6 - CONCLUSÕES	84
7 - REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

Substitutos para o sangue vêm sendo desenvolvidos há vários anos. De acordo com Riess, o termo “substituto do sangue” não é adequado, já que os produtos em desenvolvimento baseados em hemoglobina (Hb) têm apenas a função de transportar oxigênio e dióxido de carbono por um período limitado de tempo (RIESS, 2001).

Existem vários fatores que motivam o desenvolvimento de substitutos para o sangue. Uma das preocupações em relação ao sangue provém do aumento da demanda em relação ao estoque. De acordo com projeções (VAMVAKAS & TASWELL, 1994) para os Estados Unidos, no ano de 2030, mantendo-se constante o número de doações, haverá uma demanda superior a 4 milhões de unidades além das coletadas. Os principais fatores envolvidos são o envelhecimento da população e o aumento da expectativa de vida. O desenvolvimento da ciência e biotecnologia em muito progrediu nestes últimos anos, entretanto ainda é incapaz de produzir o sangue artificial. Um dos motivos se deve ao fato de o sangue desempenhar importante papel em nosso organismo, tendo como principais funções (VUYLSTEKE, 2001): transporte de gases, energia e neuromediadores, manutenção do volume vascular, imunidade e coagulação. Por estas razões, torna-se muito difícil a preparação de um agente substituto ideal com as mesmas propriedades.

Apesar do desenvolvimento e da implementação de novos procedimentos de manipulação do sangue e de testes sensíveis para a detecção de agentes contaminantes, as transfusões de sangue ainda oferecem riscos relacionados à transmissão de vírus (como o da hepatite B, da hepatite C, do HIV), à contaminação bacteriana, à transmissão de malária, da leishmaniose e da doença de Chagas. Mais recentemente, o risco de transmissão de encefalopatias degenerativas tem sido debatido, principalmente na Europa (ANDREWS, FARRINGTON & COUSENS, 2000; HOUSTON, FOSTER & CHONG, 2000; SANDERS, ACKERS & LIGOR, 1996; WILSON, CODE & RICKETTS, 2000).

Uma solução estável carreadora temporária de oxigênio teria ainda outras aplicações, como na conservação de órgãos para transplante, no aumento *in vivo* da

sensibilidade de órgãos a terapias por radiação e, ainda, poderia ser usado em animais. Além disso, um sistema carreador teria valor terapêutico em situações nas quais o sangue não é capaz de fornecer oxigênio aos tecidos, como em casos de infarto. Como a tipagem prévia não se faz necessária, as transfusões instantâneas seriam facilitadas (BUNN, 1995; GOODNOUGH, SCOTT & MONK, 1998; RIESS, 2001). Nos Estados Unidos, cerca de 22 milhões de unidades de hemo componentes são transfundidas a cada ano, o que faz desta prática uma das mais importantes intervenções médicas da atualidade (WALL & PRIELIPP, 2000).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SANGUE

Em termos médicos, o sangue é o “tecido circulante” do organismo, meio pelo qual o oxigênio (O_2) e os nutrientes são transportados para os tecidos e o dióxido de carbono (CO_2) e vários outros produtos metabólicos são removidos para a excreção. Essa definição simples exemplifica as principais funções do sangue e denota a grande importância do sangue para a manutenção da vida humana (BARROS, 2003).

Além destas funções, o sangue também é responsável pela condução de hormônios de uma parte a outra do organismo (correlação humoral), pela regulação do balanço hídrico de todos os compartimentos do corpo humano por meio da pressão osmótica e pela manutenção de um ambiente apropriado a todos os líquidos teciduais para a sobrevivência e a perfeita função das células. Essa manutenção se deve à contínua circulação do sangue pelo organismo e ao fornecimento de mecanismos de defesa. Os leucócitos são as unidades móveis do sistema imunológico do organismo, e proporcionam uma defesa rápida e poderosa contra qualquer agente infeccioso. Por outro lado, as plaquetas, que são discos com 2 a 4 μm de diâmetro, atuam nas superfícies vasculares lesadas, garantindo a integridade do sistema circulatório, e têm função na coagulação do sangue (BARROS, 2003).

Os elementos celulares correspondem a aproximadamente 45% do volume de sangue, enquanto o plasma corresponde a 55%. A Figura 1 mostra o esquema representativo da composição do sangue (SOUZA & ELIAS, 1995).

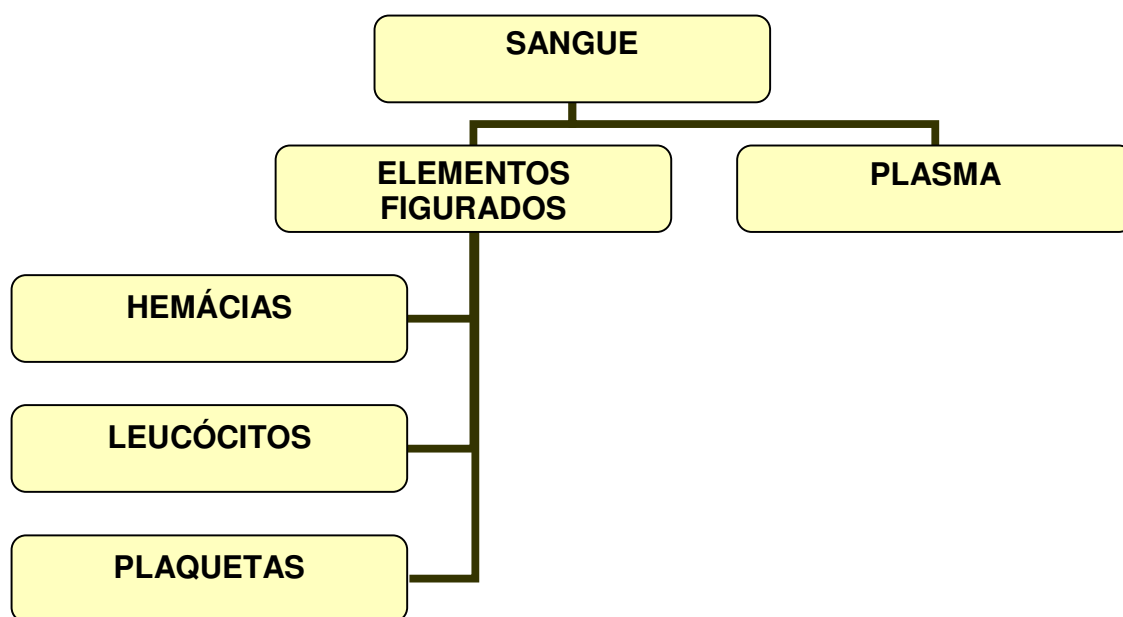


Figura 1 – Esquema representativo da composição do sangue (SOUZA & ELIAS, 1995)

O plasma é um líquido viscoso que contém 90% de água e 10% de sólidos, constituídos de proteínas, lipídeos, glicose, ácidos e sais, vitaminas, minerais, hormônios e enzimas. Em cada litro de sangue existem 60 a 80 gramas de proteína. A maior parte é constituída pela albumina; em menor proporção estão as globulinas, relacionadas à formação de anticorpos para a defesa do organismo e o fibrinogênio, uma proteína fundamental no processo de coagulação do sangue (SOUZA & ELIAS, 1995).

A albumina tem o peso molecular de 69.000 Daltons e corresponde a 55% do total de proteínas plasmáticas. A sua principal função está relacionada à manutenção da pressão colóido-osmótica. As proteínas plasmáticas são sensíveis aos diversos tipos de traumatismos, inclusive o térmico. Quando submetidas a temperaturas elevadas, da ordem de 45°C, podem ser desnaturadas ou destruídas, perdendo as suas funções. Os demais constituintes do plasma são importantes no equilíbrio eletrolítico, na nutrição

dos tecidos, no equilíbrio ácido-básico e no controle e regulação hormonal do organismo (SOUZA & ELIAS, 1995).

2.1.1. Hemácias

As hemácias, glóbulos vermelhos ou eritrócitos, são as células mais numerosas do sangue. Têm a forma de um disco bicôncavo, com um excesso de membrana, em relação à porção celular (Figura 2). A membrana em excesso permite à hemácia alterar a sua forma na passagem pelos capilares, sem sofrer distensão ou ruptura. A forma bicôncava da hemácia favorece a existência de uma grande superfície de difusão, em relação ao seu tamanho e volume. A hemácia circulante não tem núcleo; seu diâmetro é de aproximadamente 8 μm e a espessura é de 2 μm na periferia e cerca de 1 μm na sua porção central (SOUZA & ELIAS, 1995).

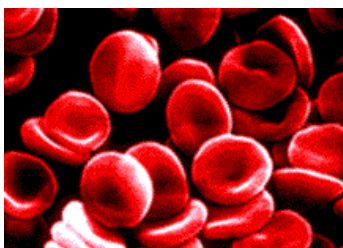


Figura 2 – Estrutura bicôncava das hemácias (BARROS, 2003)

As hemácias correspondem a mais de 99% das células encontradas no sangue e são responsáveis pelo transporte de oxigênio e gás carbônico. A massa de eritrócitos é constituída de aproximadamente 34% de hemoglobina que confere aos eritrócitos a capacidade de transportar o gás oxigênio e o gás carbônico pelo organismo. Essa função fisiológica exercida pela hemoglobina se deve a sua estrutura (BARROS, 2003).

A maioria das membranas contém cerca de 40% de lipídeo e 60% de proteína, mas existe uma variável. Em um extremo, a membrana interna da mitocôndria contém apenas cerca de 20 a 25% de lipídeo e, no outro, a membrana mielínica que circunda certos nervos pode conter mais de 75% de lipídeo. Os lipídeos das membranas são amplamente polares; predominam os fosfoglicerídeos, com quantidades muito menores de esfingolipídeos. Realmente, quase todos os lipídeos polares das células estão

localizados em suas membranas. A relação de diferentes espécies de lipídeos polares nas membranas é característica do tipo do sistema de membrana, do órgão e das espécies (LEHNINGER,1993).

Composição lipídica da membrana da hemácia bovina : Esfingomielina > fosfatidil-etanolamina > fosfatidilcolina. Composição lipídica de membrana da hemácia humana: Fosfatidilcolina > fosfatidil-etanolamina > fosfatidilserina > esfingomielina (ALEXANDER-VON-HUMBOLDT, 1991; LEHNINGER,1993).

Quando é realizada a hemólise da parede celular das células vermelhas do sangue os resíduos de fosfolipídeos remanescentes, fosfatidilserina, fosfatidil-etanolamina e fosfatidilcolina podem ocasionar coagulação sanguínea tornando-se tóxicos e provocando uma reação inflamatória sistêmica caracterizada pela ativação do complemento. Fosfatidilserina e fosfatidil-etanolamina normalmente se encontram no interior da membrana dos eritrócitos, apresentando uma particular afinidade pela hemoglobina, quando comparados aos outros fosfolipídeos conferindo à Hb uma atividade inflamatória (FEOLA, SIMONI & CANIZARO, 1991; NAKAI *et al.*, 1994).

2.1.2. Hemoglobina

O metabolismo das células aeróbicas depende do recebimento contínuo de oxigênio, usado na oxidação de nutrientes. Por outro lado, o gás carbônico resultante desta oxidação deve ser removido constantemente. O oxigênio, no entanto, é pouco solúvel em soluções aquosas e não pode ser transportado para os tecidos em quantidades suficientes se estiver simplesmente dissolvido no plasma sanguíneo. O transporte ocorre em geral pelo auxílio de uma proteína – a hemoglobina. Entretanto, nenhum dos grupamentos laterais constituintes da cadeia polipeptídica da proteína é adequado para a ligação reversível com as moléculas de O₂. Esse papel é desempenhado por um grupo prostético denominado heme. O heme é constituído por uma complexa estrutura orgânica em anel, a porfirina, a qual está ligada um único átomo de ferro em estado Fe⁺². O átomo de ferro possui seis ligações de coordenação, quatro delas com átomos de nitrogênio que fazem parte do plano do anel de porfirina e duas delas que estão perpendiculares a esse plano (Figura 3). Os átomos de nitrogênio

coordenados ao ferro ajudam a impedir a conversão do Fe^{+2} para o estado férrico (Fe^{+3}). No estado Fe^{+2} , o ferro liga-se reversivelmente ao oxigênio. No estado Fe^{+3} , a ligação não ocorre. Neste estado a Hb é denominada MetHb (LEHNINGER, 1993).

A hemoglobina humana adulta (HbA) consiste de duas cadeias polipeptídicas alfa (α) e duas beta (β), cada cadeia contém um grupo heme capaz de ligar-se a uma molécula de oxigênio (1g de Hb liga 1,39 mL de O_2). A cadeia α é constituída por um grupo de 141 resíduos de aminoácidos e tem a massa molar de 15.750 Daltons. A cadeia *beta* é formada pela união de 146 resíduos de aminoácidos e tem a massa molar de 16.500 Daltons. A HbA resultante tem uma massa molar aproximado de 64.725 Daltons. As cadeias *alfa* e *beta* têm seqüências de aminoácidos diferentes e se encontram arranjadas em estruturas tridimensionais semelhantes, mediante interações não-polares e ligações de hidrogênio. A molécula de Hb apresenta uma conformação quase esférica, com um diâmetro de 55 Å, onde as quatro cadeias encontram-se arranjadas formando um tetrâmero (Figuras 3a e 3b) (BARROS, 2003; MOORE, 2003; SOUZA, 1995).

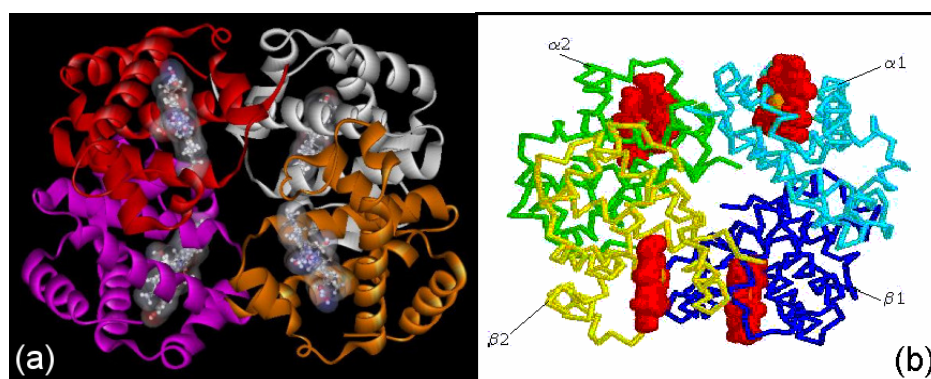


Figura 3 – Modelos espaciais da estrutura da hemoglobina (BARROS, 2003)

Os grupos heme estão localizados em fendas próximas da face externa da molécula, uma em cada subunidade. Os quatros pontos de ligação ao oxigênio estão separados; a distância entre os dois átomos de ferro mais próximos é de 25 Å. Cada cadeia α está em contato com ambas as cadeias β . Em contraste, há pouca interação entre as duas cadeias α ou entre as duas β (STRYER, 1992).

As subunidades da globina da desoxi-hemoglobina encontram-se associadas por interações eletrostáticas, sob uma tensão de conformação que possui afinidade por oxigênio relativamente baixa. Análises de difração de raios-X mostraram duas conformações predominantes para a hemoglobina – o estado R e o estado T, denominações que se referem ao tempo relaxado e tenso, respectivamente. O estado R refere-se à conformação predominante quando a Hb possui alta afinidade pelo O_2 – na forma oxi-hemoglobina; e o estado T é mais estável quando o O_2 está ausente – desoxi-hemoglobina. A transição do estado T para o estado R é acompanhada por afinidades crescentes da molécula de Hb pelo oxigênio, tornando mais fácil a ligação de outras moléculas de O_2 , de tal maneira que a ligação da quarta molécula de oxigênio à Hb é 300 vezes mais fácil do que a ligação da primeira. A esse fenômeno dá-se o nome de cooperatividade (LEHNINGER, 1993; MOORE, 2003).

O coeficiente de Hill é um parâmetro que informa sobre o efeito da cooperatividade nos locais de múltiplas ligações de oxigênio, sendo responsável pela forma sigmóide da curva de dissociação da oxi-hemoglobina. O coeficiente de Hill de células vermelhas sangüíneas (RBC) é de 2,7 (varia de 2,4 a 2,9). Fatores que modificam a afinidade pelo O_2 incluem o ácido 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) presente na RBC, concentrações de dióxido de carbono e de íon hidrogênio no sangue, e temperatura corporal. A ligação de 2,3-DPG entre as cadeias β de Hb estabiliza o estado T e reduz a afinidade por O_2 . Reversivelmente, a perda de 2,3-DPG aumenta a afinidade por O_2 ; isto é, a curva de dissociação da oxi-hemoglobina muda para a esquerda, o que define a redução de P_{50} . A P_{50} é a tensão de O_2 quando os sítios de ligação de Hb estão 50% saturados (uma medida da afinidade pelo O_2); o valor de P_{50} para adultos ao nível do mar é de 26,3 mmHg (MOORE, 2003).

A Figura 4 mostra a curva de dissociação da oxi-hemoglobina em função da pO_2 até 100 torr (a pressão parcial aproximada do oxigênio nos tecidos). Uma solução de oxi-hemoglobina pura liberaria 5% de seu oxigênio a 40 torr. Nas mesmas condições, o sangue total libera 20-25% de seu oxigênio (RAW, FREEDMAN & MENUCCI, 1981).

A curva de afinidade por oxigênio da hemoglobina no sangue total é deslocada para a direita, quando comparada à curva de afinidade de uma solução de hemoglobina pura

(Figura 4). O deslocamento da curva de afinidade da hemoglobina pura para a direita pode ser provocado aumentando-se a concentração de H^+ ou de CO_2 , sendo esse efeito chamado de *efeito Bohr*. Como no sangue venoso, a concentração de CO_2 aumenta e o pH diminui, o efeito Bohr facilita a liberação de oxigênio para os tecidos e, nas condições inversas, como ocorre nos pulmões, a ligação de oxigênio é facilitada. A oxigenação de Hb reduz sua afinidade por dióxido de carbono – efeito Haldane. Somente 10% do dióxido de carbono é retirado dos tecidos como carboxi-hemoglobina; 80% é transportado como bicarbonato. Finalmente, a redução da temperatura interna aumenta a afinidade da Hb por O_2 , isto é, reduz o valor de P_{50} (RAW, FREEDMAN & MENUCCI, 1981).

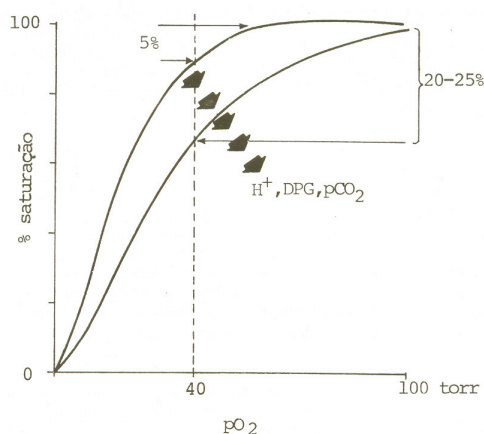


Figura 4 – Curva de dissociação da oxi-hemoglobina em função da pO_2 (RAW, FREEDMAN & MENUCCI, 1981)

A Figura 5 mostra um diagrama simplificado do transporte de O_2 e CO_2 pela hemoglobina durante as circulações pulmonar e sistêmica. O sangue venoso chega no circuito pulmonar em grande maioria desoxigenado, ligado a 2,3-DPG e Hb protonada em estado T. Condições locais (alta pO_2 , elevado pH, temperatura e pCO_2 mais baixos) favorecem a dissociação da Hb e do 2,3-DPG, a liberação de CO_2 e a mudança para o estado R. O estado R tem uma afinidade maior por O_2 , o que permite a ligação do O_2 aos grupos heme e então o CO_2 é liberado e expirado. Quando o sangue arterial circula por órgãos/tecidos metabolicamente ativos, as condições locais (baixa pO_2 , baixo pH, temperatura e pCO_2 mais elevados) favorecem a Hb a mudar novamente para o estado

T. Essa transição do estado R para o estado T é facilitada pela ligação eletrostática reversível do 2,3-DPG às duas cadeias beta. Enquanto o oxigênio (um substrato para o metabolismo aeróbico) está sendo liberado aos tecidos, o CO₂ (resto metabólico) liga-se a um grupo amino primário das cadeias de globina (grupos terminais amino de resíduos de lisina). O composto carbaminodeoxiHb resultante é então transportado de volta para os pulmões pelo sangue venoso. Novamente, as condições nos pulmões favorecem a Hb de transformar-se de novo em estado R, permitindo a liberação de CO₂ enquanto se liga ao O₂. Durante o processo, o 2,3-DPG dissocia-se da Hb. Todo o ciclo se repete (KIM & GREENBURG, 2004).

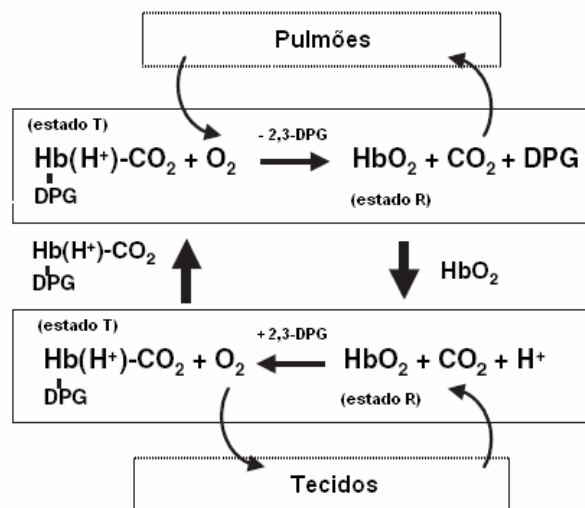


Figura 5 – Esquema simplificado sobre o transporte de gases pela hemoglobina (KIM & GREENBURG, 2004)

2.1.2.1. Hemoglobina bovina (HbBv)

É possível comparar as cadeias α e β da hemoglobina de espécies diferentes. Para se fazer comparação, alinham-se as cadeias de acordo com o maior número de aminoácidos coincidentes. Uma vez feito isso, pode-se ver que na maioria dos casos ou há uma substituição de aminoácido ou um aminoácido simplesmente está faltando. A diferença total é mostrada na Tabela 1 (RAW, FREEDMAN & MENUCCI, 1981).

Tabela 1 – Número de aminoácidos diferentes dos da hemoglobina humana (RAW, FREEDMAN & MENUCCI, 1981)

<i>Espécie</i>	<i>α</i>	<i>β</i>
Chimpanzé	0	0
Cavalo	18	26
Boi	17	26

A afinidade ao oxigênio por células vermelhas bovinas pode ser modulada por adição ou redução de íons cloreto ou pela mudança de pH do meio. Em condições fisiológicas de pH e de íons cloreto, a afinidade da hemoglobina bovina ao oxigênio é menor do que a hemoglobina humana. Em presença de íons cloreto, a hemoglobina bovina não é sensível ao 2,3-DPG, enquanto na ausência de íons cloreto as hemoglobinas bovina e humana respondem ao 2,3-DPG de forma semelhante. Isto é devido à alta ligação preferencial do halogênio pela conformação *desoxi* no sistema bovino. Reação da desoxi-hemoglobina com 2,3-dibromo-salicil-fumarato resulta numa diminuição da afinidade ao oxigênio. As células vermelhas bovinas não contêm 2,3-DPG, então podem ser estocadas sob refrigeração em solução salina por pelo menos 2 meses sem modificações significativas em relação à afinidade ao oxigênio. Somando-se a isso o baixo tempo de retenção em ratos demonstrada em experiências, permitiria a utilização dessa proteína como um carreador de oxigênio (BUCCI *et al.*, 1988).

Outro fator a favor da utilização da Hb bovina é que esta aparentemente não causa uma rápida formação de anticorpos quando é injetada em outras espécies (HU & SU, 2002).

A afinidade por oxigênio de soluções de hemoglobina bovina em condições fisiológicas de íons cloreto é menor do que soluções de hemoglobina humana como mostra a Figura 6. Esta característica proporciona à hemoglobina bovina a habilidade de liberar oxigênio contra pressão parcial de oxigênio nos tecidos. Na realidade, um grande impedimento para a utilização de solução de hemoglobina humana como carreador de oxigênio baseado em hemoglobina é devido a sua afinidade por oxigênio

se tornar muito alta, impedindo a sua liberação para os tecidos. Isto se deve à carência de interação com fosfatos orgânicos fora dos eritrócitos (FRONTICELLI *et al.*, 1986).

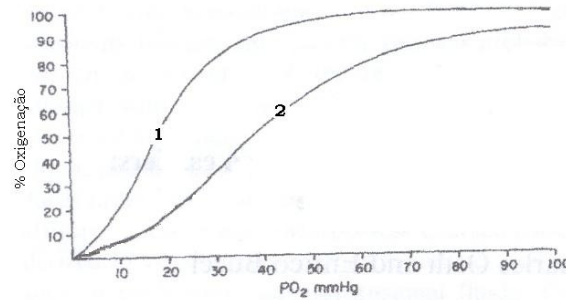


Figura 6 – Afinidade por oxigênio de soluções de hemoglobina bovina (curva 1) e de hemoglobina humana (curva 2) (FRONTICELLI *et al.*, 1986)

2.1.3. Dissociação da hemoglobina

Os carreadores de oxigênio à base de hemoglobina utilizam como substrato a molécula de hemoglobina obtida de unidade de sangue com data de validade expirada, do sangue bovino ou obtidas por meio de engenharia genética (SHOEMARKER, GERBER & EVANS, 1994).

As forças estabilizadoras do tetrâmero são mais fracas entre as cadeias de globinas idênticas, e dessa forma as subunidades tendem a dissociar-se em dímeros $\alpha\beta$, como mostra a Figura 7. De fato, um equilíbrio existe dentro das RBC entre os tetrâmeros e os dímeros $\alpha\beta$, e a presença de elevada concentração de hemoglobina favorece a estrutura tetramérica. Fora das RBC, a hemoglobina dissocia-se em dímeros $\alpha\beta$ que são rapidamente oxidados e excretados da circulação, assim negando sua utilidade fundamental como carreador de oxigênio. Esses dímeros têm demonstrado grande toxicidade causando disfunção renal, aumento da pressão colóide osmótica, aumento de afinidade por O₂, sofrimento gastrointestinal, e vasoconstrição sistêmica caracterizado por um aumento da pressão sangüínea e a diminuição do débito cardíaco (D'AGNILLO & ALAYASH, 2000; GOULD *et al.*, 1995; HU & SU, 2002; HU & SU, 2003; PALAPARTHY, WANG, & GULATI, 2000).

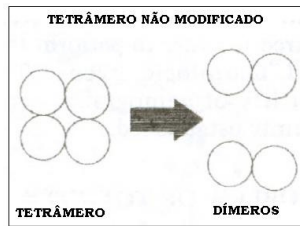


Figura 7 – Dissociação de tetrâmero em dímero (PALAPARTHY, WANG & GULATI, 2000)

A fim de evitar os problemas relacionados com a dissociação da hemoglobina em dímeros, a Hb deve ser quimicamente modificada para ser usada como um substituto para o sangue. Vários processos de modificação têm sido realizados para aumentar as propriedades fisiológicas da SFH (hemoglobina livre de estroma) a fim de propiciar sua função como um eficiente carreador de oxigênio e conferir a eficácia terapêutica necessária. As modificações químicas incluem a formação de ligações cruzadas intramoleculares, polimerização, conjugação ou modificações que empregam uma combinação destes métodos para atingir esse objetivo. Os reagentes para a modificação química da hemoglobina devem ser atóxicos, não-imunogênicos e devem apresentar o mínimo de atividade detergente para evitar a desnaturação da proteína (PALAPARTHY, WANG & GULATI, 2000; RIESS, 2001).

Existem dois sítios principais nos quais os agentes de ligação cruzada podem ligar-se às hélices da Hb. O primeiro sítio correspondente aos resíduos de lisina 82 da cadeia de globina β , o que leva à formação de uma ligação cruzada β - β . O segundo sítio ocorre entre as cadeias da globina α nos resíduos de lisina 99 e resulta em uma ligação do tipo α - α na Hb. Os grupamentos ϵ -amino do resíduo de lisina são os mais abundantes na molécula da Hb e grande parte deles está na superfície da proteína. Contudo, existem ao todo 44 resíduos de lisina com grupos ϵ -amino nas cadeias laterais, 28 resíduos de ácido aspártico, 24 resíduos de ácido glutâmico com grupamentos ácido carboxílico nas cadeias laterais, alguns grupos imidazóis da histidina; grupos guanino da histidina e grupos fenólicos da tirosina, que podem participar de várias reações. São em geral caracterizadas como reações de sítio específico às reações de piridoxilação, carboximetilação, alquilação-S e reações para a

formação de ligações cruzadas, que utilizem reagentes carregados negativamente, enquanto que reações de polimerização e conjugação a polímero, tais como reações com glutaraldeído, glicolaldeído e polissacarídeos oxidados por metaperiodato de sódio (NaIO_4) ocorrem essencialmente ao acaso em diversos sítios na superfície da proteína. A aparente especificidade de um reagente é freqüentemente um simples reflexo da diferença na velocidade de reação e pode mudar com o meio e razão reagente/proteína. Modificações químicas sucessivas levam ao aumento da heterogeneidade dos produtos e em alguns casos, os diversos reagentes competem por um mesmo sítio reativo. Cada modificação pode obviamente ter conseqüências nas propriedades da proteína (LUNDBLAD, 1991; RIESS, 2001; WONG, 1991).

A Figura 8 mostra alguns métodos de modificação química de hemoglobina. Os materiais de partida mais comumente usados são as soluções de Hb altamente purificadas, preparadas a partir de hemácias humana e bovina. A estabilização parcial do tetrâmero é normalmente realizada por ligação intramolecular entre as cadeias β usando 5-fosfato de piridoxila (PLP) que é um agente monofuncional análogo ao 2,3-DPG. O PLP reage diretamente em sítios específicos nas cadeias β e leva à formação do aduto PLP-Hb (Figura 8A). Um efetivo aumento de massa molar da Hb pode ser feito por conjugação com polietilenoglicol ou polioxietileno (PEG/POE-2000 ou 5000) com ou sem uma prévia reação com PLP ou outro análogo de 2,3-DPG (POE-PLP-Hb, PEG-Hb bovina) (Figura 8B). Hemoglobinas polimerizadas têm massas molares significativamente maiores do que um tetrâmero de hemoglobina nativa (64 kD) e são produzidas quando hemoglobinas, com tetrâmero pré-estabilizado ou não, reagem com agentes de ligação cruzada polifuncionais (glutaraldeído e o-rafinose) (Figura 8C) (KIM & GREENBURG, 2004).

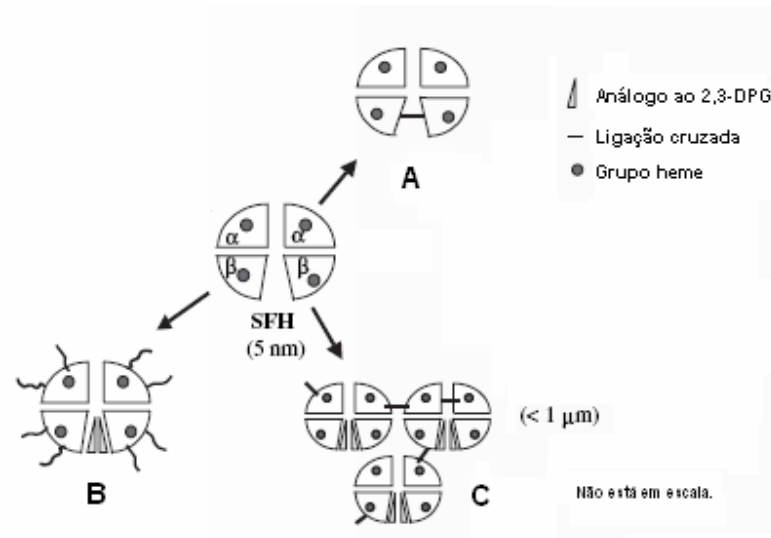


Figura 8 – Ilustração de principais modificações em hemoglobina (KIM & GREENBURG, 2004)

2.2. AMIDO

O amido é um polissacarídeo constituído por unidades repetitivas de D-glicopirranose. No amido, as unidades de D-glicose estão unidas por ligações α -1,4. O amido é formado por dois componentes: a amilose (Figura 9a) e amilopectina (Figura 9b), sendo que a amilose é essencialmente linear e amilopectina é uma cadeia ramificada (ligações α -1,6 entre a cadeia principal e as ramificações).

O amido está presente na forma de pequenos grânulos, em raízes, sementes e talos de uma variedade de plantas, incluindo arroz, batata, cevada, mandioca, milho e trigo. Estes grânulos possuem forma e tamanho característicos segundo sua fonte de procedência, sendo que o tamanho dos grânulos pode variar desde 2 μm até 100 μm de diâmetro (DOANE, SWANSON & FANTA, 1992; POUTANEN & FORSELL, 1996; VAN SOEST & VLIEGENTHART, 1997; WHISTLER & DANIEL, 1982).

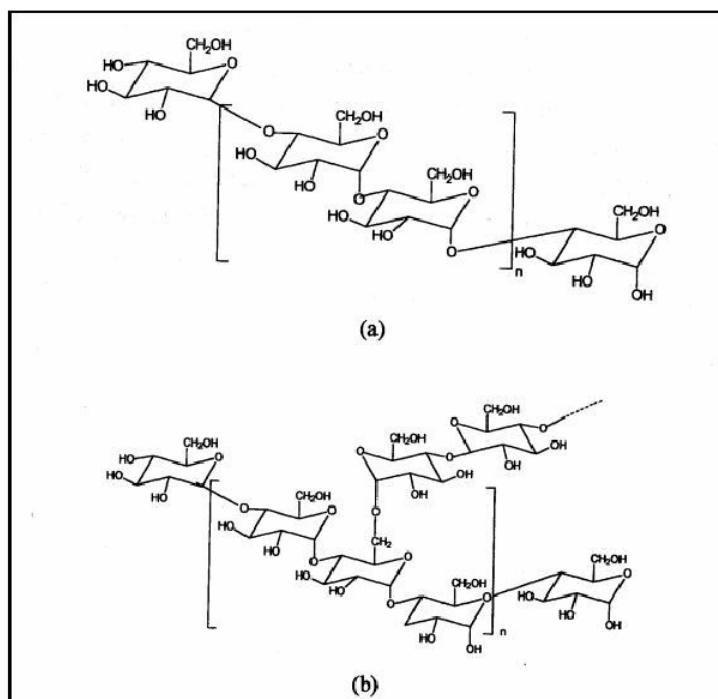


Figura 9 – Estruturas químicas da amilose (a) e amilopectina (b)

A quantidade de amilose na maioria dos grânulos está na faixa de 20 a 35% do peso total, dependendo da técnica utilizada para sua determinação (BATEY & CURTIN, 1996; JAROWENKO, 1971; MEYER, 1960). Em algumas espécies, obtidas através de mutações genéticas, os teores de amilose e amilopectina podem diferir bastante, o que favorece uma variação grande nas propriedades físicas e de processamento do amido. Para a maioria dos amidos provenientes de cereais, o teor de amilopectina se encontra entre 65 a 80%. Existem ainda espécies mutantes, geralmente provenientes do milho, arroz e cevada, que contêm teores de amilose em torno de 70%. Tais fontes podem ainda sofrer um outro tipo de mutação genética e produzir amidos com teores de amilopectina de quase 100% (WURZBURG, 1986).

2.2.1. Amilose

A amilose, que no passado foi definida como sendo uma macromolécula linear com unidades de D-glicopiranoze unidas entre si com ligações do tipo α -D(1 \rightarrow 4),

atualmente é definida como uma molécula levemente ramificada com ligações do tipo α -D(1 \rightarrow 6) (CURÁ, JANSSON & KRISMAN, 1995).

Takeda e colaboradores (1987) desenvolveram um estudo extensivo sobre a estrutura fina da amilose, baseado sobre tudo no ataque das enzimas β -amilase e isoamilase. A amilose ramificada também apresenta muitas propriedades semelhantes às apresentadas pela amilose linear, tais como capacidade de ligar-se ao iodo e massa molar, o que torna mais difícil a sua distinção. Entretanto, apesar da presença de ramificações, tal amilose se mostra bem diferente da amilopectina, o que confirma a relevância da distinção entre amilose e amilopectina.

A quantidade de moléculas ramificadas de amilose encontra-se em torno de 25 a 55% da massa molar total de amilose (TAKEDA *et al.*, 1987), e verifica-se que as ramificações da amilose apresentam pequenos cachos de cadeias curtas que podem vir a apresentar certo grau de cristalinidade (BULÉON *et al.* 1998). Diversos estudos concluem que a presença das ramificações nas moléculas de amilose não alteram significativamente o comportamento da amilose em solução (ROGER & COLONNA, 1996).

A massa molar das moléculas de amilose e sua distribuição dependem da origem biológica e da degradação molecular que ocorre durante o seu fracionamento (ONG, 1994). Os valores de massa molar citados na literatura para amilose de batata e do trigo são variados (BURCHARD & THURN, 1985; FISHMAN & HOAGLAND, 1994; THURN & BURCHARD, 1985). A determinação da viscosidade intrínseca tem-se mostrado como técnica base para a determinação da massa molar das frações de amido, utilizando-se os coeficientes de Mark-Houwink determinados para diferentes solventes (RING, l'ANSON & MORRIS, 1985).

O Hylon VII é constituído de 70% de amilose e de 30% de amilopectina. Esse amido, com alto teor de amilose, é morfologicamente semelhante ao amido convencional porém demonstra propriedades peculiares decorrentes da alta energia coesiva, o que faz a temperatura de gelatinização em presença de água ser superior por volta de 30°C ao amido normal (LE BAIL *et al.*, 1999).

2.2.2. Amilopectina

A amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada que é formada por cadeias de D-glicopirranose unidas entre si principalmente por ligações do tipo (1→4), mas com 5 a 6% de ligações do tipo (1→6) nos pontos de ramificação (BULÉON *et al.*, 1998). A aplicação de técnicas de ressonância magnética nuclear, cromatografia por exclusão de tamanho e métodos espectrofotométricos (blue value) mostram que os amidos geneticamente modificados, com altos teores de amilopectina, apresentam-se mais ramificados do que os amidos regulares (NILSSON *et al.*, 1996). A organização básica das cadeias é descrita em termos de cadeia do tipo A, B e C. As cadeias externas são denominadas como A, e são ligadas através do carbono 6 de um resíduo de glicose à cadeia interna do tipo B. Tais cadeias são definidas como cadeias portadoras de outras cadeias como ramificações.

A amilopectina possui uma das maiores massas molares relativas dentre os polissacarídeos (10^7 a 10^9); entretanto, ainda é desconhecida a sua distribuição de massa molar. Devido ao seu caráter ramificado, as amilopectinas apresentam baixa viscosidade intrínseca (BULÉON *et al.*, 1998).

2.2.3. Outros componentes

Os grânulos de amido possuem, além das macromoléculas de amilose e amilopectina, outros componentes em menor proporção que compreendem materiais particulados, componentes superficiais provenientes dos processos de extração e componentes internos. Os lipídeos são a fração mais importante associada aos grãos de amido, onde se encontram na proporção de 0,6 a 1,2% dos grânulos.

Os principais componentes superficiais são as proteínas, as enzimas, os aminoácidos e os ácidos graxos. A presença de lipídeos em contato com amido induz a formação de complexos entre a amilose e lipídeos durante a gelatinização. Eles ainda impedem o inchamento, a dispersão dos grânulos e solubilidade da amilose, assim gerando pastas opacas com viscosidade reduzida e temperaturas elevadas de obtenção de pasta (BULÉON *et al.*, 1998).

2.2.4. Cristalinidade

O amido é parcialmente cristalino apresentando valores de cristalinidade entre 20 e 45%. No amido *in natura* a amilose e os pontos de ramificações da amilopectina formam as regiões amorfas do grânulo. A amilopectina é a grande responsável pela cristalinidade do amido, sendo que estas regiões cristalinas consistem de duplas hélices (BILIADERIS, 1992; POUTANEN & FORSELL, 1996; VAN SOEST & VLIEGENTHART, 1997). Segundo dados da literatura, a estrutura tridimensional que corresponde a dupla hélice de fios paralelos é o empacotamento paralelo hexagonal levógiro (BILIADERIS, 1992; DOANE *et al.*, 1992). Acredita-se que a amilopectina está disposta em um arranjo constituído por um esqueleto de cadeias ramificadas ao qual estão ligados aglomerados de cadeias lineares (COULTATE, 1996; VAN SOEST & VLIEGENTHART, 1997). Esta estrutura está esquematizada na Figura 10.

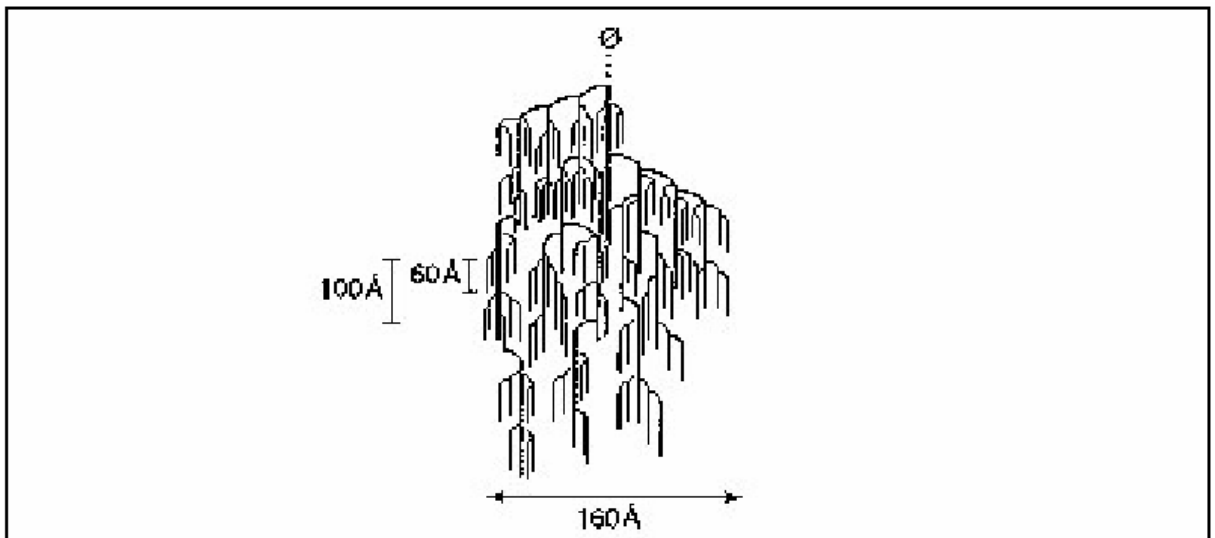


Figura 10 – Estrutura supramolecular da amilopectina

Vários padrões de estruturas cristalinas são observados por difração de raios-X, nos diversos grânulos de amido, provenientes de fontes distintas como de cereais e tubérculos. De acordo com cada padrão de comportamento, que se distinguem em suas densidades de empacotamento das simples ou duplas hélices e na quantidade de água presente, denominou-se tipo A, ao amido de cereais; tipo B, ao amido de tubérculos e

tipo C, amido de raízes e sementes. Acredita-se, que o tipo C, seja uma combinação dos tipos A e B (KERR, 1950; POUTANEN & FORSELL, 1996; RINDLAV, HULLEMAN & GATENHOLM, 1997; VAN SOESTE & VLIEGENTHART, 1997).

A cristalinidade dos diferentes tipos de amido foi estudada por Van Soest e Vliegenthart (1997), os quais apresentaram difratogramas para todos os tipos de cristalinidade, conforme mostrado na Figura 11.

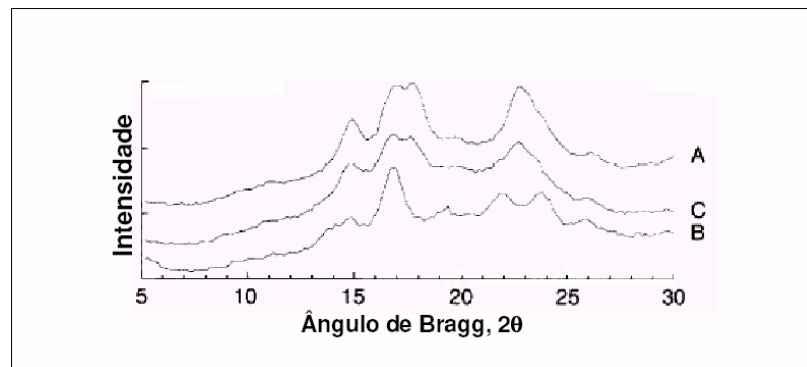


Figura 11 – Difratogramas de raios-X dos diferentes tipos de amidos (VAN SOEST & VLIEGENTHART, 1997)

Ainda de acordo com Van Soest e Vliegenthart (1997), a relativa abundância de estruturas cristalinas é influenciada pela razão amilose/amilopectina, pela massa molar, pelo grau de ramificações e pelo comprimento das cadeias de amilopectina. Estudos revelaram que a cristalinidade do amido diminui com o aumento do teor de amilose (CHEETHAM & TAO, 1997; GERNAT *et al.*, 1993).

Quando o amido é suspenso em água, os grânulos tendem a um aumento de volume devido ao processo de intumescimento, e absorvem cerca de uma vez o seu próprio peso em água. Quando a temperatura da mistura é elevada gradativamente, a absorção de água tende a aumentar drasticamente: o grânulo de amido expande de 10 a 100 vezes em volume, dependendo do tipo de amido (KRUGER & LACOURSE, 1990).

Após intumescimento dos grânulos, em uma dada temperatura, a energia do sistema é suficiente para vencer as ligações hidrogênio no interior do grânulo de amido,

com perda da cristalinidade. As regiões amorfas do grânulo são solvatadas e o grânulo incha rapidamente. Durante o intumescimento, e como conseqüência disto, devido ao rompimento dos grânulos, muitas das moléculas de amilose e amilopectina são lixiviadas para fora do grânulo e podem tornar-se completamente solúveis a temperatura de 130-150°C (DOANE *et al.*, 1992; WHISTLER & DANIEL, 1982).

Os processos de intumescimento granular e solubilização do amido são conhecidos como gelatinização. Quando este sistema amido-água é resfriado, um gel é formado (DOANE *et al.*, 1992; KERR, 1950; KRUGER & LACOURSE, 1990; POUTANEN & FORSELL, 1996; WILLET, JASBERG & SWANSON, 1994). A temperatura em que ocorre a gelatinização varia de acordo com a fonte produtora do amido. Na Tabela 2 são encontradas as temperaturas para alguns tipos de amidos (JAROWENKO *et al.*, 1997). A temperatura inferior se refere à temperatura em que o grânulo inicia seu intumescimento e a temperatura superior indica quando a totalidade dos grânulos está gelatinizado (WHISTLER & DANIEL, 1982).

Tabela 2 – Temperatura de gelatinização de diversas fontes de amido (JAROWENKO *et al.*, 1997)

Amido	Milho	Trigo	Arroz	Mandioca	Batata
Temp. Gelatinização (°C)	62 - 72	58 - 64	68 - 78	49 - 70	59 - 68

As moléculas de amilose em solução podem sofrer retrogradação, um fenômeno causado pelo alinhamento das cadeias, resultado da interação entre as cadeias de amilose através de ligações de hidrogênio formando partículas insolúveis (KENNEDY *et al.*, 1987).

Desta forma, o termo amido desestruturado tem sido empregado para designar os estados fisicamente modificado do amido, obtido por ruptura granular, resultando em menor ordem de cristalinidade (SHOGREN, FANTA & DOANE, 1993).

O amido pode ser processado por técnicas usuais de processamento de polímeros como extrusão e injeção (LOURDIN *et al.*, 1997; VAN SOEST & BORGER, 1997). Quando submetido a algum destes processos, o amido sofre desestruturação de seus grânulos, devido às altas temperaturas, cisalhamento e presença de plastificantes, promovendo o inchamento e posterior desestruturação de seus grânulos, tornando-se um material microscopicamente homogêneo (HULLEMAN, JANSSEN & FEIL, 1998).

O termo amido desestruturado é comumente usado quando o amido é convertido em material termoplástico em uma extrusora na presença de plastificantes. Neste processo ocorrem basicamente três fenômenos estruturais: fragmentação dos grânulos de amido; quebra das ligações hidrogênio entre as moléculas de amido, levando a perda da cristalinidade; e parcial despolimerização (POUTANEN & FORSELL, 1996).

No processo de desestruturação ocorre primeiramente a absorção do plastificante, devido à formação de ligações hidrogênio com as hidroxilas livres das moléculas de amido, mas ainda o amido mantém sua ordem e cristalinidade. Entretanto, quando este inchamento é realizado sob aquecimento, as ligações hidrogênio entre as moléculas do amido são rompidas. A cristalinidade é progressivamente perdida, o que caracteriza a chamada gelatinização. O processamento de amido e plastificante em extrusora, com aquecimento, torna-se, portanto, efetivo para a obtenção de amido gelatinizado (ST-PIERRE *et al.*, 1997).

2.2.5. Plastificantes

Os plastificantes são substâncias utilizadas com o objetivo primário de aumentar a flexibilidade de um polímero (plastificação) e efeito secundário de melhorar sua processabilidade (RABELO, 2000). Alteram as propriedades mecânicas de um polímero, bem como as temperaturas de transição vítrea e de fusão, pois agem neutralizando ou reduzindo as forças de interação intermoleculares, mas não alteram a natureza química do polímero (RABELO, 2000; WILLET, JASBERG & SWANSON, 1994).

O efeito do plastificante é a diminuição da energia necessária para que possibilite a movimentação molecular, aumentando, então a flexibilidade. Quando um plastificante é acrescentado ao polímero, as moléculas do plastificante começam a penetrar na fase polimérica da matriz, modificando seu arranjo. Se o plastificante é compatível com a matriz polimérica, ele se difunde entre as macromoléculas do polímero, aumentando a mobilidade entre as cadeias (RABELO, 2000). Esta plastificação é denominada interação física ou externa.

Devido à maior liberdade do movimento das macromoléculas, causado pela presença do plastificante, algumas vezes, pode haver a formação de cristalitos do material plastificado. Estes cristalitos podem atuar como reticuladores físicos, levando a modificações nas propriedades do material (RABELO, 2000).

Um plastificante comumente utilizado no processamento do amido é a água, uma vez que age como plastificante das partes amorfas dos grânulos de amido durante aquecimento, sendo as propriedades físicas do amido muito influenciadas por sua presença. Outros plastificantes, como álcoois de baixa massa molar e carboidratos têm sido estudados para a obtenção de amidos termoplásticos (POUTANEN & FORSELL, 1996).

Lourdin e colaboradores (1997) estudaram vários plastificantes como glicerina, etileno glicol, dietilenoglicol, sorbitol, entre outros. Shogren *et al.*, estudaram o uso de uréia e vários glicóis como plastificantes (POUTANEN & FORSELL, 1996).

A natureza e a quantidade do plastificante influenciaram as propriedades físicas do amido processado de duas maneiras: pelo controle do grau de desestruturação e despolimerização durante a quebra das ligações hidrogênio, e pela ação de amolecimento do material processado (POUTANEN & FORSELL, 1996). Van Soest e Vliegthart (1997) classificaram o material processado em função do conteúdo de plastificante, o comportamento vítreo a baixos conteúdos de plastificantes e um comportamento de gel a elevados conteúdos de plastificantes.

2.2.6. Retrogradação

Os amidos de diferentes fontes vegetais são todos biossintetizados em forma de grânulos semicristalinos. A análise de amidos termoplásticos é considerada difícil, pois estes materiais são complexos e heterogêneos, podendo apresentar presença de grânulos remanescentes e domínios de amilose e amilopectina (VAN SOEST & ESSERS, 1997).

Após o seu processamento, o amido ainda continua a apresentar uma cristalinidade residual, que é afetada pelas condições do processo e, também, pela composição do amido termoplástico. Após o armazenamento, ocorre a chamada retrogradação, uma reorganização em estruturas cristalinas, que depende das condições de processamento e condições de armazenamento (como temperatura e umidade).

O grau de cristalinidade do amido termoplástico é proporcional ao teor de amilose, sendo que em materiais nos quais a quantidade de amilose é pequena, a cristalização em hélices simples não é observada. Pode ocorrer, também, interações entre moléculas de amilopectina, tanto quanto entre moléculas de amilose e de amilopectina (VAN SOEST & VLIEGENTHART, 1997).

Depois do processamento, o amido recristaliza-se em vários tipos de estruturas cristalinas (VAN SOEST *et al.*, 1990). Os mesmos autores têm reportado que os amidos termoplásticos condicionados a baixas e médias umidades apresentaram um padrão cristalográfico denominado tipo V, devido a formação de simples hélices de amilose com lipídeos e proteínas. Rindlaw-Westling e colaboradores. (1998) observaram os tipos de cristalinidade V_h (hidratada) e V_a (anidra), que diferem entre si quanto ao tipo de empacotamento das hélices. A natureza e o teor dessas estruturas cristalinas, formadas após o processamento, sendo que a sua quantidade e o tipo de cristalinidade são influenciados pelo processamento e pela composição da mistura (VAN SOEST *et al.*, 1990).

O padrão cristalográfico denominado tipo V_h apresenta picos em $7,1^\circ$ (2θ), $12,6^\circ$ (2θ) ambos com intensidade forte, $19,4^\circ$ (2θ) de intensidade muito forte e $22,1^\circ$ (2θ) de

média intensidade. Os cristais denominados tipo V_h possuem célula unitária ortorrômbica, com dimensões: $a=13,65$, $b=23,70$ e $c=8,05$ Å ou a célula unitária hexagonal com $a=b=13,65$ e $c=8,05$ Å. Já o padrão cristalográfico denominado tipo V_a possui pico em $7,4^\circ$ (2θ) de intensidade forte, e picos a $13,2^\circ$ (2θ) e $20,6^\circ$ (2θ) ambos com intensidade muito forte. Sua célula unitária é ortorrômbica com dimensões $a=13,0$, $b=22,5$ e $c=7,9$ Å. O tipo V_a possui mais hélices de amilose que o tipo V_h (VAN SOESTE *et al.*, 1990).

Outro padrão relatado em amido termoplástico é representado pela recristalização das cadeias curtas externas da amilopectina, denominado como estrutura tipo B. Seu parâmetro de difração principal ocorre em 17° (2θ), com intensidade forte. O número de cristalitos do tipo B é diretamente proporcional à quantidade de água, o tempo e a temperatura de condicionamento (HULLEMAN *et al.*, 1999).

2.3. HEMOGLOBINAS MODIFICADAS QUIMICAMENTE

Dentre os principais produtos à base de Hb modificada que se encontram em fase de testes clínicos, pode-se citar o Hemolink (Hemosol Inc.), o PHP (Apex Bioscience) e o Hemopure (Biopure Corp.), que têm mostrado resultados favoráveis para o uso farmacológico.

2.3.1. Hemolink (Hemosol Inc.)

A hemoglobina altamente purificada (HbA) foi preparada a partir de bolsas de sangue humano fora do prazo de validade usando métodos descritos detalhadamente em dois trabalhos de Adamson e colaboradores (ADAMSON *et al.*, 1997; ADAMSON & MOORE, 1998). Essa HbA, com mais de 99 % de purificação, reagiu com a rafinose na forma oxidada por periodato (o-rafinose) para realizar ligação cruzada. Os múltiplos grupos aldeído da o-rafinose inicialmente formam ligações imina (base de Schiff) com grupos amino dentro e entre cada molécula de hemoglobina. Essas ligações são reversíveis, mas são estabilizadas por redução química com boro-dimetil-amina. Esta alquilação redutiva é irreversível e resulta em uma ligação cruzada covalente entre grupos amino dos dímeros α e β da hemoglobina justamente onde 2,3-DPG se liga,

assim formando um tetrâmero estável. Além disso, o-rafinose reage com grupos amino da superfície dos tetrâmeros para criar ligações intermoleculares, produzindo um oligômero estabilizado de hemoglobina. A solução de hemoglobina modificada com a o-rafinose, resultante desse procedimento, consiste predominantemente de oligômeros de hemoglobina (de 60% a 65% do total) com massa molar variando de 128 a 600 kD. Entretanto, uma proporção substancial de hemoglobina na solução de hemoglobina/o-rafinose (com aproximadamente 30%) se encontra na forma de tetrâmero estável por ligação cruzada covalente com peso molecular de 64 kD. Em uma pequena proporção, aproximadamente 3%, a hemoglobina dessa solução não sofreu a reação de formação de ligação cruzada e, portanto, se encontra sob a forma de dímeros (peso molecular 32 kD). Essa preparação foi chamada de Hemolink (ADAMSON *et al.*, 1997; ADAMSON & MOORE, 1998).

Em estudo (CHENG *et al.*, 2000) fase II, 60 pacientes submetidos à revascularização do miocárdio receberam Hemolink (até 1000 ml) ou colóide associados à doação autóloga per-operatória. O efeito colateral mais freqüente foi o aumento da pressão arterial, sendo no conjunto bem tolerada. Houve redução significativa no número de pacientes que necessitaram de transfusão sangüínea no grupo Hemolink, em relação ao grupo controle até o quinto dia de pós-operatório (10% vs 46,7%; $p < 0,0034$).

A fase III dos estudos (CARMICHAEL *et al.*, 2000) foi completada no Canadá e Reino Unido, onde 299 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca receberam 750 ml do produto. Os resultados sugerem um perfil favorável em relação à segurança e eficácia. Hemolink surge como uma importante alternativa à transfusão alogênica de sangue em razão da facilitação da doação autóloga per-operatória em cirurgias cardíacas (CHENG, 2001). A aprovação clínica do produto foi solicitada no Canadá, ainda que dois estudos em cirurgia cardíaca (uso de altas doses em cirurgias primária e doses regulares em reoperações) estejam em andamento conjunto entre Estados Unidos e Reino Unido.

2.3.2. PHP (Apex Bioscience)

O produto da Hb piridoxilada conjugada ao polietilenoglicol (PHP) fornece uma

complexa mistura de Hb modificada e outras proteínas do sangue, pois tanto ligações intra quanto intermoleculares ocorrem, bem como reações para obtenção de Hb “decorada”. A análise cromatográfica por exclusão de tamanho verificou grande heterogeneidade para o PHP. O perfil da curva é bimodal, apresentando dois máximos equivalentes às massas molares 300.000 D (30%) e 105.000 D (70%), respectivamente. A massa molar média atingiu o valor de 187.000 D. O ajuste da pressão osmótica foi realizado por meio do controle das ligações intermoleculares. Cerca de 83% de mono-Hb, 12% de di-Hb e 4% de tri-Hb compõem o produto. O PHP conjuga em média 5 a 6 cadeias de PEG e 3,3 resíduos de piridoxal por unidade de Hb, e ainda possui extenso raio hidrodinâmico, com aproximadamente 7,2 nm (PRIVALLE *et al.*, 2000).

Como já mencionado anteriormente, a Hb – uma proteína tetramérica – quando fora das hemácias, se dissocia em par de dímeros $\alpha\beta$. Os dímeros e os tetrâmeros, quando em solução, encontram-se em um equilíbrio dinâmico de sucessivas associações e dissociações. O PHP se distingue dos outros produtos obtidos por modificação química de Hb que se encontram em fase de testes, pelo fato de manter a habilidade dos dímeros e tetrâmeros de permanecerem em equilíbrio entre si, mesmo após inúmeras cadeias de PEG estarem conjugadas à Hb na complexa mistura. Este fenômeno foi comprovado por análise cromatográfica de exclusão por tamanho (SEC), e confirmada por análise de eletroforese e análise de espectrometria de massa.

Outra característica interessante do PHP é que a rota de síntese do produto permite ligar ao produto algumas enzimas antioxidantes encontradas nas hemácias – catalase, superóxido dismutase (SOD) e anidrase carbônica (CA) – e isto pode ser um fator significativo no controle da oxidação dos grupos heme e formação de MetHb. PHP foi relativamente estável e este procedimento resultou em menos de 5% de conversão em MetHb (PRIVALLE *et al.*, 2000; TALARICO, GUISE & STACEY, 1998).

O óxido nítrico (NO) é o principal mediador nas mudanças hemodinâmicas durante a septicemia. NO é uma molécula pequena que se difunde livremente através das células endoteliais e participa na regulação basal do tônus muscular dos vasos sangüíneos. A vasoconstrição tem papel importante sobre os distúrbios provocados nas micro- e macro-circulação em pacientes que sofrem septicemia (FISCHER, BONE & HARADA, 1998).

A hemoglobina modificada, quando usada como substituto para o sangue, provoca vasoconstrição por se ligar ao NO sendo este um efeito indesejável. Entretanto, em pacientes com septicemia há um aumento na produção de NO, e agora o efeito indesejável da Hb modificada se torna uma vantagem. Vale saber que a Hb tem afinidade por NO muito maior do que por CO₂, cerca de 1500 vezes (FISCHER, BONE & HARADA, 1998).

2.3.3. Hemopure (Biopure)

O glutaraldeído é um reagente altamente reativo e, portanto, reage facilmente com os grupos amino, sulfidríla, anel imidazol e outros grupamentos presentes na Hb. Ele tem sido empregado na polimerização da Hb e tanto promove ligações intra, quanto ligações intermoleculares que podem ocorrer em vários sítios. O glutaraldeído é representado de maneira simplificada por um aldeído de cinco átomos de carbono. No entanto, em soluções aquosas ele está em equilíbrio com hemiacetal cíclico e seu hidrato para formar oligômeros com extensões de cadeias variadas. Por causa da variedade de espécies reativas geradas em solução, o glutaraldeído reage inespecificamente com a Hb e fornece produtos muito heterogêneos e bastante dependentes das condições reacionais (EIKE & PALMER, 2004).

O efeito da modulação de íons cloreto, e não da concentração de 2,3-DPG, como no caso da Hb humana, rege a associação da hemoglobina bovina ao oxigênio. Como a concentração de íons cloreto no organismo humano é alta, a Hb bovina polimerizada com glutaraldeído tem sido estudada para desempenhar o papel de um carreador de O₂. Um produto da Biopure encontra-se em avançada fase dos testes clínicos. O produto obteve valores de P₅₀ em torno de 20 mmHg e grande tempo de permanência no organismo. No entanto, os valores de MetHb alcançaram 33% após 24 horas da administração do produto (RIESS, 2001).

A Figura 12 mostra a análise da eletroforese da hemoglobina bovina purificada (HbBv) e o Hemopure. A HbBv migrou com uma banda única aproximadamente na marca de peso molecular de 14 kD. Um outro componente, com uma migração na marca de 34 kD, pode estar relacionado à presença de anidrase carbônica (enzima

presente nas membranas das hemácias). Em compensação, o Hemopure revelou uma distribuição de massa molar heterogênea com bandas correspondendo ao dímero da hemoglobina (32 kD), ao trímero (42-64 kD) e ao tetrâmero (58-75 kD). Além disso, o Hemopure apresentou massas molares acima de 200 kD (ALAYASH *et al.*, 2001).

A curva de dissociação de oxigênio da HbBv e da sua versão correspondente polimerizada (Hemopure) estão representadas na Figura 13. A polimerização da HbBv induziu não somente a modificação da posição da curva mas como também da sua forma. A curva de dissociação do Hemopure é deslocada para a direita com um valor de P_{50} de 34,8 mmHg em comparação com HbBv (26,9 mmHg) (ALAYASH *et al.*, 2001).

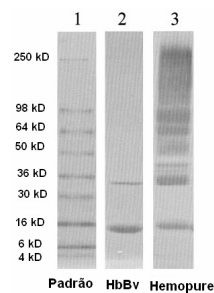


Figura 12 – Comparação entre padrão, Hemopure e HbBv na análise por eletroforese (ALAYASH *et al.*, 2001)

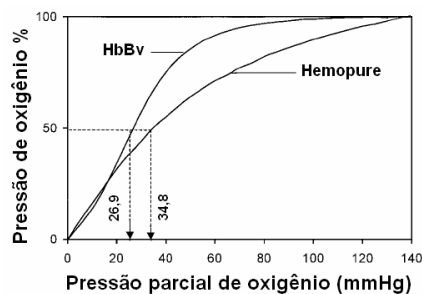


Figura 13 – Curva de dissociação de HbBv e Hemopure nas condições de pH 7,4 100 mM de Cl^- a 37°C (ALAYASH *et al.*, 2001)

LaMuraglia e colaboradores (2000) conduziram o estudo clínico em múltiplos centros, aleatoriamente, em pacientes que sofreram cirurgia na artéria aorta. Os pacientes receberam aleatoriamente Hemopure (Tabela 3) ou sangue halogênico. O estudo teve o objetivo de avaliar a eficácia e a segurança do Hemopure em pacientes que sofreram cirurgia na aorta (LAMURAGLIA *et al.*, 2000).

Tabela 3 – Características e especificações do Hemopure (LAMURAGLIA *et al.*, 2000)

Total de hemoglobina (g/dL)	13 ± 1
pH	7,6 a 7,9
P ₅₀ (mmHg)	38
Viscosidade (cp)	1,3

O grupo de tratamento recebeu uma administração inicial de 60 g de Hemopure em 500 mL (lactatado de Ringer modificado), e quando indicado, para as 3 subseqüentes transfusões, doses de 30 g cada 250 mL. O grupo-controle recebeu unidades de sangue halogênico padrão (LAMURAGLIA *et al.*, 2000).

O uso de Hemopure eliminou a necessidade de transfusão de sangue halogênico em 27% dos pacientes durante a cirurgia da aorta. Apesar de a redução do total de transfusão de sangue halogênio não ter sido significativa, a administração de Hemopure atrasou a transfusão de sangue em todos os pacientes. A administração de Hemopure foi bem tolerada ao não provocar falência renal, distúrbio hepático ou aumento significativo da pressão arterial, e assim demonstrou a habilidade de ser um substituto para o sangue (LAMURAGLIA *et al.*, 2000).

A perda de sangue associada com a cirurgia cardíaca leva a uma anemia aguda no pós-operatório, o que diminui a capacidade de oxigenação dos tecidos. A metade dos pacientes que passam por cirurgia cardíaca necessita de transfusão de sangue. Por causa dos riscos causados pela transfusão, o Hemopure é uma alternativa. Foi por esse motivo que Levy e colaboradores (2002) realizaram um estudo para avaliar o Hemopure como carreador de oxigênio, quando administrado em pacientes após cirurgia (LEVY *et*

al., 2002).

O estudo foi feito em múltiplos centros, de forma aleatória, duplo-encoberto, no qual o Hemopure foi administrado no período pós-operatório. Os pacientes foram divididos em dois grupos: o grupo-controle recebeu transfusão de sangue homologado e o grupo de tratamento recebeu Hemopure com dose inicial de 60 g em 500 mL (LEVY *et al.*, 2002).

A administração de Hemopure nas doses usadas neste estudo eliminou a necessidade de transfusão de sangue no pós-operatório em 34% dos casos. Nenhum caso clínico de pancreatite foi observado e não houve diferença na pressão arterial máxima entre os grupos. Portanto, o Hemopure se mostrou seguro e eficaz (LEVY *et al.*, 2002).

2.3.4. PolyHeme

PolyHeme é uma solução modificada da hemoglobina proveniente de sangue estocado. A hemoglobina é extraída do eritrócito e filtrada para remover as impurezas. A purificação é feita quimicamente através de um processo que visa criar a forma polimerizada da molécula, evitando com isto os efeitos indesejáveis da fração livre, entre eles a vasoconstrição e a disfunção renal. A hemoglobina modificada é então incorporada a uma solução para poder ser administrada como alternativa ao sangue. Uma unidade da solução contém 50 gramas de hemoglobina modificada, aproximadamente a mesma quantidade de uma unidade de concentrado de hemácias. (JOHNSON *et al.*, 1998).

Em estudo (GOULD *et al.*, 1998) que teve como objetivo comparar os benefícios terapêuticos do PolyHeme em relação à transfusão alogênica, foram selecionados 44 pacientes, com idades que variavam entre 19 e 75 anos, vítimas de lesão traumática. Os pacientes receberam concentrado de hemácias ou até 6 unidades de PolyHeme para reposição sangüínea após o trauma ou durante a cirurgia de emergência. Os níveis de circulantes de hemoglobina, durante e após perda volêmica, foram mantidos com PolyHeme, sendo sugerida sua utilização clínica como substituto sangüíneo nestas

condições. Os mediadores biológicos apresentam potencial para exacerbar a resposta inflamatória pós-trauma e a falência múltipla de órgãos. O volume de sangue transfundido foi postulado como um fator de risco independente (MOORE, MOORE & SAUAIA, 1996). Diante deste fato, a infusão de até 20 unidades de PolyHeme foi comparada ao sangue estocado em pacientes politraumatizados que necessitaram de transfusão (JOHNSON *et al.*, 2001). Como resultado, houve uma menor sensibilização dos neutrófilos no grupo que recebeu PolyHeme, propiciando uma explicação para a menor incidência ou gravidade da síndrome da falência múltipla de órgãos.

A polihemoglobina piridoxilada humana após completar a Fase III dos estudos clínicos aguarda a aprovação pelo órgão regulamentar americano *Federal Drug Administration* (FDA), para comercialização como substituto sangüíneo em situações de perda volêmica aguda, principalmente no trauma.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Modificar quimicamente a hemoglobina bovina em presença de oligômeros de amilose.
- 3.2. Isolar e purificar a hemoglobina a partir do sangue bovino.
- 3.3. Desestruturar o amido granular rico em amilose.
- 3.4. Obter e caracterizar oligômeros de amilose.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS

O sangue bovino foi fornecido pelo Abatedouro JN de Abreu Comércio de Carnes SIE n° 572 sob inspeção Estadual. Os animais foram abatidos e o sangue coletado diretamente da ferida de sangria em frasco já contendo a solução anticoagulante (63 mL da solução CPDA-1/450 mL de sangue). No momento da coleta, evitou-se o contato entre o frasco coletor e a pele do animal. Depois de coletado, o sangue foi mantido sob

refrigeração a aproximadamente 5°C. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau de pureza analítica.

Cada 100 mL da solução CPDA-1 é composta de: 2,63g de citrato de sódio dihidratado, 0,33g de ácido cítrico, 0,22g de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 3,19g de dextrose monohidratada e 0,027g de adenina.

O amido utilizado foi o Hylon VII (National Starch-Alemanha) que possui alto teor de amilose.

Os reagentes Citrato de sódio dihidratado, ácido cítrico, fosfato de sódio monobásico, dextrose, NaCl, MgCl₂, NaOH, H₃PO₄, ácido láctico, mono-oleato de sorbitan (Tween-80), diclorometano, glicerol, azul de bromo fenol, álcool etílico, CBR-250, metaperiodato de sódio e boroidreto de sódio foram comprados da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os reagentes Albumina bovina, Tris, acrilamida, bisacrilamida, N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (Temed), proteínas padrões (MW-SDS-70L kit), glicina, dodecil sulfato de sódio, β-mercaptoetanol, trealose e ácido araquidônico foram comprados da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA). Os reagentes ácido clorídrico, DMSO, persulfato de amônio e acetonitrila foram comprados da Tedia Company Inc. (Fairfield, OH, USA). Os reagentes Hemoglobina padrão e Reagente de cor foram comprados da Doles Reagentes LTDA (Goiânia, GO, Brasil).

A resina utilizada na cromatografia líquida em coluna foi a Q-Sepharose fast flow da Pharmacia Biotech (Wikströms, Suécia).

Os equipamentos utilizados foram Espectrofotômetro Thermolyne Turner modelo SP-870 (Dubuque, USA), Ultra-som 500 W Cole Parmer (Vernon Hills, USA), Centrífuga refrigerada Himac CR22GII da Hitachi Koki Co., Ltd. (Hitachinaka City, Japan), Eletroforese vertical P81 da Owl Scientific, Inc. (Woburn, USA) acoplada com um transformador de voltagem Electrohoresis power Supply E835 da Consort (Turnhout, Bélgica), Rotavapor Buchi, rotavapor R-114 (Suíça), Câmara de mistura modelo Rheomix 600, equipada com rotores tipo "roller", e acoplada ao reômetro de torque Rheocord 9000 (Haake, Karlsruhe, Alemanha), Analisador termogravimétrico modelo

TGA-7 da marca Perkin Elmer (Norwalk, USA), Difratorômetro de Raios-X Rigaku modelo RU200R (Osaca, Japão), Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho da Varian, modelo Excalibur 3100 FT-IR (Mugrave, Victoria, Austrália), ¹H NMR Espectrômetro Varian Mercury 300 (Palo Alto, CA, USA), UV-VIS espectrofotômetro da Varian CARY100 (Mulgrave, Victoria, Austrália), Sistema de GPC equipado com uma bomba da Waters 600E (Milford, MA, USA), usando uma válvula de injeção Rheodyne 7125 (Cotati, USA), e detector Waters 2996 photodiode (Milford, MA, USA).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Isolamento de hemácias

No laboratório, o sangue bruto foi submetido à carbonilação, pelo borbulhamento de CO durante 180 segundos, sob leve agitação. Esta etapa é realizada para estabilizar a hemoglobina sob a forma de Hb-CO.

Leucócitos, plaquetas e proteínas diferentes da Hb foram devem ser eliminados. Para tal, 1600 mL de sangue bovino foram centrifugados a 1000x g durante 20 minutos, e a solução sobrenadante foi descartada. A centrífuga utilizada foi Himac CR22GII da Hitachi Koki Co., Ltd. (Hitachinaka City, Japan). O concentrado de hemácias foi lavado com igual quantidade de solução isotônica (0,9% NaCl). A mistura do concentrado de hemácias com a solução isotônica foi homogeneizada lentamente, e centrifugada a 1000x g durante 20 minutos. Em seguida, a solução sobrenadante foi coletada e submetida à análise por espectrofotometria no visível para determinar-se a concentração de albumina, que avalia a eficiência da lavagem. O procedimento de lavagem foi repetido até que a análise revelasse a ausência de albumina.

4.2.2. Determinação da concentração de albumina

Para a determinação de albumina, o espectrofotômetro Thermolyne Turner modelo SP-870 (Dubuque, USA) foi usado. Uma solução cromogênica foi preparada com 50 mg de verde de bromocresol, 6,5 mL de NaOH 1 N, 3,0 mL de ácido láctico a 90%, 1,0 mL de mono-oleato de sorbitan (Tween-80) e 50 mL de água deionizada (CISTERNAS, 2001). O pH foi levado a 4,0 com ácido láctico e o volume completado a 100 mL com

água deionizada. Desta solução foram coletados 10 mL e adicionados 50 mL de água deionizada. Essa solução recebeu a denominação de solução cromogênica.

Para a determinação da curva-padrão, foi preparada uma solução de albumina a 4%. A partir desta solução foram preparadas por diluição outras soluções de concentrações (3%, 2%, 1%, 0,5% e 0,1%). As soluções de leitura no espectrofotômetro foram preparadas pela adição de 0,025 mL de cada amostra de solução de concentração conhecida, e o como branco foi utilizado água. Cada 0,025 mL, tanto de solução como de água foi adicionado a 5,0 mL de solução cromogênica, agitado e então foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 626 nm. Para cada amostra foram feitas cinco leituras e a média foi colocada na curva de absorbância *versus* concentração de albumina e foi então obtida a equação da reta para a determinação de albumina nos sobrenadantes. A medida de absorbância nas amostras sobrenadantes foi realizada pela adição de 0,025 mL de solução sobrenadante a 5,0 mL de solução cromogênica, agitação e leitura no espectrofotômetro. Com as amostras também foram realizadas cinco leituras.

4.2.3. Hemólise

Experimentos realizados nos laboratórios do IMA-UFRJ com sangue humano mostraram que o método usado para a lise de hemácia tem um papel importante não só sobre o rendimento, como também sobre o processo posterior de purificação da Hb (ANDRADE *et al.*, 2004).

A hemólise foi realizada também por ultra-som em um Processador Ultra-sônico 500W Cole Parmer (Vernon Hills, USA) com sonda padrão de 13 mm de diâmetro e amplitude ajustada em 40% durante 5 minutos em banho de gelo.

Após a lise, as amostras sofreram tratamento térmico a 60°C em banho d'água, na ausência de luz, durante 1h, para desnaturar todas as proteínas hidrossolúveis, excetuando-se a Hb-CO. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000x g durante 40 min. Os sobrenadantes foram coletados e os precipitados descartados. As amostras foram filtradas primeiramente em carvão ativo sob vácuo e, posteriormente,

em membrana Milipore de 0,22 μm , dando origem a soluções de hemoglobina para a purificação adicional.

4.2.4. Purificação adicional da Hb

4.2.4.1. Lavagem da resina de troca iônica

Na purificação da solução de hemoglobina foi usada a resina comercial Q Sepharose Fast Flow (Q-SFF) da Pharmacia Biotech (Wilkström, Suécia).

A resina utilizada é aniônica forte e possui grupo amino funcional composto de uma amina quaternária. A resina Q-SFF possui uma matriz de agarose altamente reticulada. A Figura 14 mostra a estrutura do grupo de troca iônica da resina.

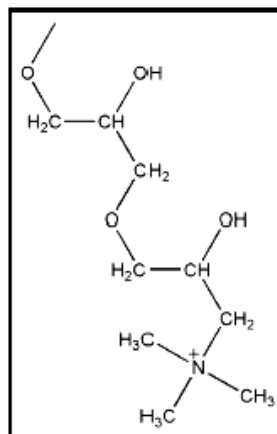


Figura 14 – Estrutura do grupo de troca iônica da resina Q Sepharose Fast Flow

A resina foi lavada durante 30 minutos com álcool etílico e filtrada em funil sinterizado. Este procedimento foi repetido até o álcool ficar límpido. Em seguida, a resina foi lavada com água deionizada e filtrada novamente. Esta etapa foi repetida até a retirada total do álcool etílico.

4.2.4.2. Dinamização da resina

Soluções de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M foram preparadas. A resina foi lavada com NaOH 0,1 M durante 15 minutos sob agitação, filtração e neutralizada com água

destilada e deionizada. Em seguida, a resina foi lavada com HCl 0,1 M durante 15 minutos sob agitação, filtrada e neutralizada com água destilada e deionizada. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Em seguida, a resina foi lavada em solução-tampão Tris.HCl pH 7,4 até pH constante e igual ao pH da solução-tampão.

4.2.4.3. Cromatografia líquida em coluna

Na técnica de cromatografia líquida em coluna foi usada uma coluna de vidro com diâmetro de 5,5 cm e 20,0 cm de altura. Esta metodologia foi utilizada para obtermos uma grande quantidade de sangue purificada, pois pelo sistema de cromatografia em Flash 12i, para cada 1 mL de amostra injetada apenas 2 mL de solução de Hb eram coletados, porém diluídos. Por esta técnica foram usados 23 mL de resina para purificar 100 mL de solução de Hb. A coluna foi empacotada manualmente por gravidade e foi deixada passar solução-tampão de Tris.HCl pH 7,4 durante um dia para verificar-se a eficiência do fluxo. Sempre antes da injeção da solução de Hb, o pH era medido. Para esta metodologia foi usada a resina Q-SFF.

4.2.5. Caracterização da matéria-prima

4.2.5.1. Amido

4.2.5.1.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

O Hylon VII em pó foi caracterizado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, em espectrofotômetro Excalibur 3100 FT-IR da marca Varian (Mulgrave, Victoria, Austrália). A análise foi realizada em pastilha de KBr.

4.2.5.1.2. Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (^1H NMR)

Foi feita uma solução de 15 mg de amostra em 0,7 mL de DMSO deuterado, deixou-se sob agitação por 6 horas. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Varian Mercury 300 (Palo Alto, Ca, USA), na frequência de 300 MHz para ^1H , sob temperatura de 30°C.

4.2.5.1.3. Análise termogravimétrica (TGA)

O Hylon VII em pó foi analisado por termogravimetria em analisador termogravimétrico, TGA-7 da Perkin Elmer (Norwalk, USA). Cerca de 10 mg de amostra foi analisada. A corrida foi obtida por aquecimento da amostra de 50 a 700°C, aplicando-se uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

4.2.5.1.4. Difração de raios-X

O Hylon VII em pó foi analisado em um difratômetro de Raio-X da marca Rigaku RU200R (Osaca, JP), em velocidade de 2° (2 θ)/min com um passo de 0,1° (2 θ) e equipado com uma fonte de radiação do tipo CuK $_{\alpha}$ ($\lambda = 0,15418$ nm) gerada a 40 kV e 50 mA. A radiação foi detectada por meio de um detector proporcional. O difratograma foi obtido no modo de reflexão numa faixa de 2 a 40° (2 θ).

4.2.5.2. Hemoglobina Bovina

4.2.5.2.1. Concentração

A concentração de Hb na solução hemolisada e nas frações coletadas após passagem pela coluna de cromatografia foi determinada pelo método da cianomete-hemoglobina, utilizando-se o mesmo espectrofotômetro que foi usado na determinação da concentração de albumina. O reagente de cor concentrado da Doles Reagentes (10 mL) foi diluído a 1000 mL com água deionizada. O reagente é composto de fosfato de potássio monobásico a 0,1 M, ferricianeto de potássio a 0,06 M, cianeto de potássio a 0,77 M e Triton X-100 a 0,082 M. Foram pipetados 20 μ L de cada amostra de solução de Hb e adicionados 5 mL do reagente de cor diluído. A solução foi homogeneizada e deixada em repouso por três minutos. A leitura da absorbância foi efetuada no comprimento de onda de 540 nm. Como branco foi utilizada a água deionizada.

A curva-padrão de Hb foi obtida usando como padrão cianeto de hemoglobina da Doles Reagentes, pois esta solução de hemoglobina possui concentração conhecida de 14%. A partir desta solução, foram feitas diluições para obter concentrações de (10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25% e 0,1%) de hemoglobina. Para cada solução, foi lida a

absorbância na proporção de 0,02 mL de solução de Hb em 5 mL de reagente de cor. Foram realizadas cinco leituras para cada concentração e o gráfico de absorbância *versus* concentração de hemoglobina foi obtido. Através da equação da reta, foi possível determinar a concentração de Hb nas amostras após a purificação por resina de troca iônica.

4.2.5.2.2. Eletroforese

4.2.5.2.2.1. Preparação das soluções para a eletroforese (Silva Júnior, 2001)

Solução-tampão Tris.HCl 1M, pH 6,8

Foram pesadas 60,56 g de Tris base e dissolvidas em água bidestilada até aproximadamente 450 ml. Conduziu-se o pH até 6,8 com ácido clorídrico em potenciômetro calibrado. O volume foi completado com água bidestilada a 500 mL. A solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 μ m e armazenada entre 2 e 8 °C.

Solução-tampão Tris.HCl 1,5M, pH 8,8

Foram pesadas 90,84 g de Tris base e procedeu-se como no item anterior, conduzindo o pH até 8,8. A solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 μ m e armazenada entre 2 e 8 °C.

Solução de acrilamida/bis-acrilamida (T=30%, C=3%)

Foram pesadas 58,2 g de acrilamida e 1,8 g de bis-acrilamida, e dissolvidas em água bidestilada, a quente, até um volume final de 200 mL. A solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 μ m e armazenada entre 2 e 8 °C em frasco âmbar.

Solução de persulfato de amônio 10%

Foi pesado 0,1 g de persulfato de amônio e dissolvido em 1 mL de água bidestilada. Esta solução foi preparada na hora do uso.

Solução-tampão estoque de Tris.glicina (Tris 250 mM e Gly 1,92 mM), pH 8,3, das câmaras anódica e catódica

Foram dissolvidas 30,28 g de Tris e 144,0 g de Gly, ambos a quente, com água bidestilada até o volume final de 1 L. Este tampão não precisou ser ajustado. A solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 μ m e armazenada em câmara fria. Na hora do uso este tampão foi diluído 10 vezes com água bidestilada.

Solução de incubação

A solução de incubação foi composta de 1,6 mL de solução SDS a 10% (10 g de SDS foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada), 0,8 mL de glicerol 87%, 0,4 mL de β -mercaptoetanol, 0,2 mL de solução de azul de bromo fenol (ABF) 0,05% (5 mg de ABF foram dissolvidos em 10 mL de água deionizada), 1,0 mL de solução-tampão Tris.HCl a pH 6,8 e 4 mL de água deionizada.

4.2.5.2.2.2. Preparação dos Géis

Eletroforese desnaturante descontínua na presença de SDS

As Tabelas 4 e 5 mostram as quantidades de reagentes necessárias para preparar os géis de acrilamidas-bisacrilamidas, usados na eletroforese desnaturante.

Tabela 4 – Reagentes utilizados na preparação do Gel Fracionador (T=7,5%)

Reagente	Volume (mL)
Solução de Acrilamida/Bis T=30%, C=3%	1,25
Solução-tampão Tris.HCl 1,5 M, pH 8,8	1,25
SDS 10%	0,50
Água bidestilada	2,00
Temed	0,07
Persulfato de amônio (10 g%)	0,07

Tabela 5 – Reagentes utilizados na preparação do Gel Concentrador (T=3,5%)

Reagente	Volume (mL)
Solução de Acrilamida/Bis T=30%, C=3%	0,60
Solução-tampão Tris.HCl 1,0 M, pH 6,8	0,63
SDS 10%	0,50
Água bidestilada	3,30
Temed	0,10
Persulfato de amônio (10%)	0,10

As placas de vidro sobrepostas foram pinçadas e vedadas com gel de agar-agar. A solução de gel fracionador foi colocada até uma altura de 1 cm abaixo da altura onde deve ser colocado o pente para a preparação dos poços de amostragem. Após a polimerização do gel, o volume restante foi completado com a solução de gel concentrador e o pente foi colocado. Esperou-se a polimerização.

4.2.5.2.2.3. Preparação das amostras para eletroforese

As amostras foram preparadas pela mistura da solução de incubação em composição apropriada para interagir com 15 µg de proteína, por poço de gel. O volume de amostra injetado em cada poço foi de 10 µL.

4.2.5.2.2.4. Corrida eletroforética

A análise de eletroforese em gel de acrilamida foi realizada numa cuba vertical P81 da Owl Scientific, Inc. (Woburn, USA) acoplada com uma fonte da Consort Electroforesis Power Supply E835 (Turnhout, Bélgica).

As placas de vidro foram colocadas no suporte do aparelho e o volume das câmaras catódica e anódica foi completado com solução-tampão de corrida. As amostras foram aplicadas nos poços com o auxílio de uma microsseringa (10 µL) e a corrida eletroforética foi iniciada mantendo-se as condições entre 60 mA e 120 V. Após tempo (~ 2 h) necessário para a separação das bandas, interrompeu-se a corrida.

4.2.5.2.2.5. Coloração e descoloração do gel

Para a coloração do gel, a solução de CBR-250 a 1% diluída em solução acética/etanólica (10%/45%) foi utilizada. O gel ficou mergulhado na solução corante durante 12 horas. O gel foi descorado com solução acética/etanólica (10%/45%) até o gel ficar incolor apenas com as bandas protéicas coradas durante um período de aproximadamente 12 horas. O gel foi seco em papel celofane com solução acética a 7% e glicerol e armazenado na geladeira.

4.2.5.2.2.6. Preparação dos padrões de proteínas para eletroforese

Foi usado um kit de proteínas padrões da Sigma (MW-SDS-70L kit), composto das seguintes proteínas: α -Lactoalbumina (14,2 kDa); Tripsinogeno (24,0 kDa); Anidrase carbônica (29,0 kDa); Gliceraldeído-3-fosfato (36,0 kDa) e Albumina bovina (66,00 kDa).

O padrão foi preparado pela mistura de todas as proteínas acima citadas, numa concentração de 0,1% de cada proteína na solução de incubação para SDS-PAGE.

4.2.5.2.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A técnica de GPC foi utilizada para determinar a massa molar da hemoglobina purificada. Foi preparada uma solução de HbBv a 0,1% em meio tamponante Tris.HCl 0,1M pH 7,5 com 0,1M de KCl. As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45 μ m de porosidade.

Em seguida, a amostra foi analisada por GPC em comparação aos padrões de proteínas de massas molares conhecidas. Nesse experimento, foi utilizada uma coluna Bioep Sec S 300 da Phenomenex com 300 mm x 7,0 mm (diâmetro interno) (Montgomeryville, USA). A fase móvel consistiu de uma solução de Tris.HCl pH 7,5 e 0,1 M de KCl. Utilizou-se uma bomba da Waters 600E (Milford, MA, USA), equipada com válvula de injeção Rheodyne 7125 de 50 μ L (Cotati, USA) e detector da Waters 2996 photodiode (Milford, MA, USA). O fluxo foi mantido a 1,0 mL/min durante todo o experimento. Os solutos foram detectados a 210 nm.

4.2.5.2.3.1. Preparação dos padrões

Foi utilizado o kit de marcação de massa molar da Sigma MW-HF-1000. As proteínas foram dissolvidas na fase móvel nas concentrações estabelecidas pelo fabricante e encontram-se resumidas na Tabela 6. As soluções foram filtradas em membrana 0,45 µm antes de serem feitas as injeções.

Tabela 6 – Concentração e massa molar dos padrões utilizados

Padrão	Massa molar	Concentração
Anidrase carbônica	29000	3 mg/mL
Albumina	66000	10 mg/mL
Desidrogenase alcoólica	150000	5 mg/mL
Amilase	200000	4 mg/mL
Apoferritina	443000	10 mg/mL
Tireoglobulina	669000	8 mg/mL
Azul de dextrana	2000000	2mg/mL

4.2.5.2.4. Determinação de Mete-hemoglobina

A concentração de mete-hemoglobina (MetHb) da solução de hemoglobina purificada foi determinada usando uma adaptação do método de cianomete-hemoglobina (BONSON, 1977; OSER, 1965), descrito por Palmer e Patton (2005). As leituras foram realizadas na faixa de 500 a 700 nm utilizando um espectrofotômetro Varian CARY100 (Mulgrave-Victoria, Austrália). Foi preparada uma solução de HbBv na concentração de hemoglobina de 0,067 g/dL, e a absorvância nesta concentração ficou em torno de 0,1. Após esta leitura foi adicionada uma gota de uma solução composta de (10% de KCN + 50 mM solução-tampão de fosfato a pH 7,6, na proporção 1:1). Em seguida, após agitação, foi realizada uma nova leitura de Abs, onde se observou que a banda a 630 nm, atribuída a uma mistura de oxi, desoxi e MetHb, desapareceu na presença de KCN. Isso significa que as formas oxi- e desoxi-hemoglobina não mais

apareceram, e a visualização será somente de MetHb. Por diferença dos valores de absorvância, foi determinada a concentração de MetHb nas amostras. Aplicando a equação de Lambert-Beer (PALMER & PATTON, 2005), $[\text{MetHb}] = (L_1 - L_2) / 3,7$, onde L_1 é a absorvância da solução de HbBv, L_2 é a absorvância da solução de HbBv mais a solução com KCN, e o 3,7 é a absortividade molar da MetHb.

4.2.6. Processamento do amido

Foram preparadas misturas do amido (Hylon VII), água e glicerol, nas proporções que estão mostradas nas Tabelas 7 e 8. Todas as misturas foram condicionadas na geladeira por 48h a fim de permitir a absorção dos plastificantes (água e/ou glicerol). Na Tabela 7 foi utilizada a densidade do amido fornecida pelo fabricante, que é 0,508 g/cm³, e na Tabela 8 foi usado a densidade do amido de milho (70% de amilopectina e 30% de amilose) que é 1,2 g/cm³.

As diferentes misturas foram processadas em câmara de mistura modelo Rheomix 600, equipada com rotores tipo “roller”, e acoplada ao reômetro de torque Rheocord 9000 (Haake, Karlsruhe, Alemanha). Foram montadas várias condições de processamento e muitas vezes foi necessário fazer alteração na metodologia a fim de alcançar a condição ideal de processamento. Nas Tabelas 7 e 8 encontram-se as condições de processamento utilizadas.

Tabela 7 – Misturas relacionadas com a densidade do amido de 0,508 g/cm³

Amostra	Mistura (amido; água; glicerol)	Tempo (min)	Temperatura (C°)	Rotação (rpm)
FFL-001	55%; 35%; 10%	20	170	70
FFL-002	55%; 35%; 10%	20	170	90
FFL-003	55%; 35%; 10%	20	180	70
FFL-004	55%; 35%; 10%	20	180	90
FFL-005	55%; 35%; 10%	20	180	110
FFL-006	30%; 20%; 50%	15	180	90
FFL-007	30%; 20%; 50%	15	180	100

Tabela 8 – Misturas relacionadas com a densidade do amido de 1,2 g/cm³

Amostra	Mistura (amido; água; glicerol)	Tempo (min)	Temperatura (C°)	Rotação (rpm)
FFL-008	60%; 0%; 40%	15	180	70
FFL-009	60%; 0%; 40%	15	180	90
FFL-010	70%; 0%; 30%	15	180	70
FFL-011	70%; 0%; 30%	15	180	80
FFL-012	60%; 0%; 40%	10	150	50
FFL-013	60%; 0%; 40%	10	150	60
FFL-014	60%; 0%; 40%	10	120	50
FFL-015	60%; 0%; 40%	10	120	40
FFL-016	60%; 0%; 40%	10	100	50
FFL-017	60%; 0%; 40%	10	100	40
FFL-018	90%; 0%; 10%	10	100	50
FFL-019	70%; 0%; 30%	10	100	40

Curvas de torque e de temperatura em função do tempo foram registradas para cada amostra ao longo do processamento a fim de avaliar-se o comportamento de fluxo das misturas. O torque medido está relacionado à viscosidade do material durante o processamento, ou seja, corresponde à resistência do material ao fluxo.

4.2.6.1. Caracterização da amostra processada

4.2.6.1.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

A amostra processada foi solubilizada em água, vertida em placa de Petri e posta para secar em estufa a uma temperatura de 50°C durante 24 horas. O filme vazado foi então caracterizado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, em espectrofotômetro Excalibur 3100 FTIR da marca Varian (Mugrave, Victoria, Austrália).

4.2.6.1.2. Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (¹H NMR)

Foi feita uma solução de 15 mg de amostra em 0,7 mL de DMSO deuterado, deixou-se sob agitação por 6 horas. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Varian Mercury 300 (Palo Alto, Ca, USA), na frequência de 300 MHz para ¹H, sob temperatura de 30°C.

4.2.6.1.3. Análise termogravimétrica (TGA)

A pasta de amido processado foi cortada e analisada por termogravimetria em analisador termogravimétrico, TGA-7 da Perkin Elmer (Norwalk, USA). Cerca de 10 mg de amostra foi analisada. A corrida foi obtida por aquecimento da amostra de 50 a 700 °C, aplicando-se uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

4.2.6.1.4. Difração de raios-X

A análise de difração de raios-X da amostra processada, FFL-017, foi feita a partir de filme prensado e o instrumento para análise foi o mesmo citado anteriormente. A Tabela 9 mostra as condições para a obtenção do filme e o filme analisado foi prensado 120 °C durante 40 minutos. Foi realizada também a análise de difração de raios-X da amostra processada a partir de filme vazado. A amostra FFL-017 foi dissolvida em DMSO a uma concentração de 2%. A solução foi vertida em placa de Petri e seca em estufa por 24 horas.

Tabela 9 – Condições para a formação de filme

Tempo (min)	Temperatura (°C)
40	110
40	120
60	120
90	125

4.2.6.1.5. Análise da massa molecular por viscosimetria

O amido após seco em estufa foi dissolvido em KOH 1M a uma concentração de 2% durante 3 horas sob agitação magnética, filtrado em papel de filtro e as medidas de viscosidade intrínseca realizadas utilizando um viscosímetro de Ubbelohde de capilar 0,58 mm. A cada etapa de 30 minutos de ultra-som, foi retirada uma alíquota para determinar o massa molar da amostra.

A massa molecular viscosimétrica média (M_v) foi determinada utilizando a equação de Mark-Houwink-Sakurada, $[\eta] = KM_v^a$, onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, K e a são constantes fornecidos pela literatura específicos às condições durante as medidas e sobre a relação polímero-solvente (BURCHARD, 1963) e M_v é a massa molar viscosimétrica média. O autor Burchard determinou para amido com alto teor de amilose que K é equivalente a $1,18 \times 10^{-3}$ mL/g e a vale 0,89 quando o solvente empregado é a solução aquosa de KOH a 1M e as medidas são realizadas a 25°C.

4.2.6.1.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A técnica de cromatografia permeação em gel (GPC) foi usada para a análise da massa molar da amilose hidrolisada. Foi preparada uma amostra a 1% em água milliQ, sob agitação durante 24 horas a temperatura ambiente e filtrada em membrana 0,45 μm .

Em seguida, as amostras foram analisadas por GPC em comparação a padrões de dextrana de masa molar conhecida. Nesse experimento, foram utilizadas duas colunas Poli Sep com limite de exclusão de 3000 e 6000 da Phenomenex. A fase móvel consistiu de uma solução de 0,1N de nitrato de potássio. Utilizou-se uma bomba da Waters 600E (Milford, MA, USA), equipada com válvula de injeção Rheodyne 7125 de 50 μL (Cotati, USA) e detector da Waters 2996 (Milford, MA, USA). O fluxo foi mantido a 1,0 mL/min durante todo o experimento.

4.2.6.1.6.1. Preparo das soluções dos padrões de Dextrana

Foi utilizado padrões de dextrana da Phenomenex (Torrance, CA, USA) com massa molar na faixa de 21.400 - 1580.000. Os padrões de dextrana foram dissolvidos na fase móvel nas concentrações estabelecidas pelo fabricante e encontram-se resumidas na Tabela 10. As soluções foram filtradas em membrana 0,45 μm antes de serem injetadas.

Tabela 10 – Concentração e massa molar dos padrões utilizados

Massa molar	Concentração (mg/L)
1580000	0,5
515000	0,5
129000	0,5
66300	0,5
48600	0,5
39900	1,0
21400	2,5

4.2.7. Hidrólise do amido processado com auxílio de ultra-som

Como a amostra FFL-017 foi a que apresentou melhor processamento, foi dissolvida em NaOH 1M a uma concentração de 2% por 3 horas sob agitação magnética. Essa solução foi separada em duas alíquotas sendo uma delas submetida a ultra-som por 30 minutos (amostra FFL-017-1) em um Processador Ultra-sônico 500W Cole Parmer (Vernon Hills, USA) com sonda padrão de 13 mm de diâmetro e amplitude ajustada em 40% em banho de gelo e a outra não passou pela etapa de ultra-som (amostra FFL-017-0).

As duas alíquotas foram precipitadas em álcool etílico na proporção 1:3 (solução de amido:etanol), filtradas e após filtração o precipitado foi lavado com álcool etílico até pH \cong 7,0. Para cada amostra que passou 30 minutos pelo ultra-som, esse procedimento (solubilização em NaOH e precipitação em etanol) foi repetido até conseguir chegar numa amilose de baixa massa molar. A Tabela 11 mostra a legenda das amostras formadas devido às diferentes condições de hidrólise. Após essas etapas, o amido precipitado foi seco em estufa por 24 horas a uma temperatura de 50°C. Em seguida, o amido foi dissolvido em KOH 1M a uma concentração de 2% durante 3 horas sob

agitação magnética, filtrado em papel de filtro e as medidas de viscosidade intrínseca realizadas utilizando-se um viscosímetro de Ubbelohde.

Tabela 11 – Mostra o tempo e a quantidade de vezes que foi necessário o uso do ultra-som

Amostras	Tempo de Ultra-som (min)	Número de vezes que a amostra foi ao ultra-som
FFL-017-0	0	0
FFL-017-1	30''	1
FFL-017-2	30''	2
FFL-017-3	30''	3
FFL-017-4	30''	4
FFL-017-5	30''	6

4.2.8. Caracterização do produto hidrolisado

4.2.8.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

O produto hidrolisado em pó foi caracterizado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho utilizando o mesmo espectrofotômetro citado anteriormente. A análise foi realizada em pastilha de KBr.

4.2.8.2. Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (¹H NMR)

Foi feita uma solução de 15 mg de amostra em 0,7 mL de DMSO deuterado, deixou-se sob agitação por 6 horas. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Varian Mercury 300 (Palo Alto, Ca, USA), na frequência de 300 MHz para ¹H, sob temperatura de 30°C.

4.2.8.3. Análise termogravimétrica (TGA)

O produto hidrolisado foi analisado em pó por termogravimetria em analisador termogravimétrico, TGA-7 da Perkin Elmer (Norwalk, USA). Cerca de 10 mg de amostra foram analisados. A corrida foi obtida por aquecimento da amostra de 50 a 700°C, aplicando-se uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

4.2.8.4. Difração de raios-X

O produto hidrolisado em pó foi caracterizado por difração de raios-X no mesmo equipamento e procedimentos citados anteriormente.

4.2.8.5. Análise da massa molar por viscosimetria

O produto hidrolisado foi dissolvido em KOH 1M a uma concentração de 2% durante 3 horas sob agitação magnética, filtrado em papel de filtro e as medidas de viscosidade intrínseca realizadas utilizando-se um viscosímetro de Ubbelohde.

4.2.8.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A técnica de cromatografia permeação em gel (GPC) foi utilizada para a análise da massa molar do amido hidrolisado. Foi preparada uma amostra a 1% em água milliQ, sob agitação durante 24 horas a temperatura ambiente e filtrada em membrana 0,45 µm.

Em seguida, as amostras foram analisadas por GPC em comparação a padrões de dextrana de massa molar conhecida. Esse experimento foi realizado no mesmo equipamento e sob as mesmas condições utilizadas para o amido processado.

4.2.9. Modificação química do oligômero de amilose

A Figura 15 mostra a reação do oligômero obtido por hidrólise do amido processado (FFL-017) com o metaperiodato de sódio (NaIO_4) para a obtenção da amilose oxidada (*o*-amilose). A reação foi realizada na ausência de luz e a temperatura ambiente durante 48 horas, sob agitação. Foram usadas duas condições para a reação de

abertura dos anéis de glicose. Primeiro, foi considerada uma razão reacional de mol de amilose para mol de metaperiodato de sódio. Outra condição foi mol de unidade de glicose para mol de metaperiodato de sódio. A reação foi terminada com glicol etilênico na razão molar de 1:1 com a relação ao NaIO_4 , sob agitação durante 30 minutos.

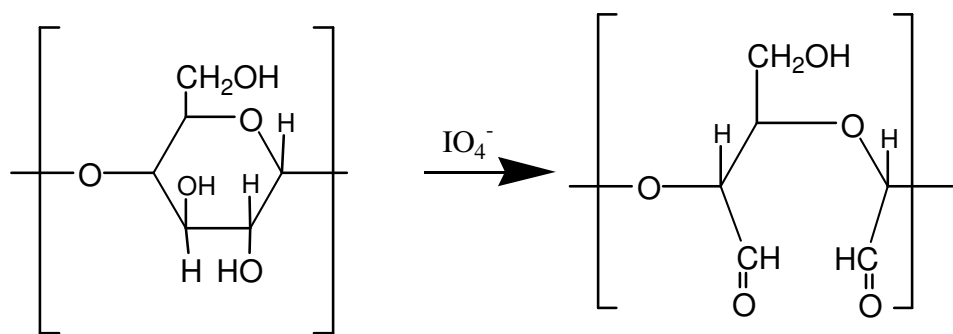


Figura 15 – Reação de oxidação da amilose

4.2.10. Caracterização do oligômero de amilose oxidado (*o*-amilose)

4.2.10.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

O oligômero da amilose usado como agente de formação de ligação cruzada na HbBv foi caracterizado por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho, em espectrofotômetro Varian, modelo Excalibur 3100 (Mulgrave, Victoria, Australia). Para tal caracterização, após a reação de oxidação, a solução foi precipitada em álcool etílico, filtrada em papel de filtro e o filtrado seco em estufa por 24 horas a 50°C. O sólido foi macerado e analisado por espectroscopia na região do infravermelho através de pastilha de KBr.

4.2.11. Modificação química da hemoglobina bovina com oligômeros de amilose oxidados

As reações foram realizadas com oligômeros de amilose em diferentes razões molares (*o*-amilose:HbBv). As soluções de HbBv e *o*-amilose foram desoxigenadas sob N₂ por 30 minutos antes de iniciar a reação. Eles foram colocados para reagir sob borbulhamento de N₂ e agitação magnética e na ausência de luz. O agente redutor borodreto de sódio (NaBH₄) foi adicionado com o objetivo de estabilizar a ligação imina entre o oligossacarídeo oxidado e a HbBv por meio da sua transformação em grupo amina. Essa reação de redução foi realizada durante 30 minutos. O ácido ascórbico foi adicionado na concentração de 0,02% no início da reação a fim de evitar a oxidação da HbBv. Após a reação, as amostras foram colocadas em diálise utilizando membrana da Spectrum Mw 12-14000 (Rancho Dominguez, USA) em solução tampão Tris.HCl pH 7,4 por 24 horas a 4°C, sob agitação e na ausência da luz. A solução tampão foi trocada a cada 12 horas, e o volume de tampão foi de 2,5 L.

As reações foram realizadas em diferentes razões molares de oligômeros de amilose oxidados (*o*-amilose)/HbBv, tempo reacional e a razão molar agente redutor (NaBH₄)/oligômeros de *o*-amilose. As condições encontram-se listadas na Tabela 12. As amostras foram denominadas da seguinte maneira:

Grupo 1: mol de *o*-amilose: mol de HbBv/tempo de reação/ mol de NaBH₄: mol de *o*-amilose

Grupo 2: mol de unidade de *o*-glicose: mol de HbBv/tempo de reação/ mol de NaBH₄: mol de unidade de *o*-glicose

Tabela 12 – Condições reacionais para amilose oxidada

	Amostras	Condições reacionais
	mHbBv-01	1:1/4h/300:1
	mHbBv-02	1:1/6h/300:1
Grupo 1	mHbBv-03	1:1/4h/450:1
	mHbBv-04	5:1/4h/300:1
	mHbBv-05	5:1/6h/300:1
	mHbBv-06	1,3:1/4h/5:1
Grupo 2	mHbBv-07	1,95:1/4h/5:1
	mHbBv-08	2,6:1/4h/5:1

4.2.12. Caracterização dos produtos resultantes da modificação química da hemoglobina bovina com o oligômero de amilose oxidado

4.2.12.1. Determinação de Mete-hemoglobina (MetHb)

O teor de mete-hemoglobina (MetHb) para os produtos de HbBv modificada foi calculado semelhante ao da amostra de hemoglobina purificada.

4.2.12.2. Eletroforese

A técnica de eletroforese foi realizada da mesma forma citada anteriormente.

4.2.12.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A técnica de cromatografia permeação em gel (GPC) foi usada para a análise da massa molar dos produtos de hemoglobina modificada, a metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente para a HbBv purificada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PROCESSAMENTO DO AMIDO

As Figuras 16 a 20 mostram as curvas de torque e de temperatura obtidas durante o processamento da mistura de amido com água e glicerol, na razão 55%:35%:10% e sob diferentes velocidades de rotação, temperatura e tempo de processamento. O amido em todos os processamentos só sofreu ação da temperatura já que o torque foi nulo durante todo o procedimento. O produto final foi um pó, portanto não houve fusão do amido.

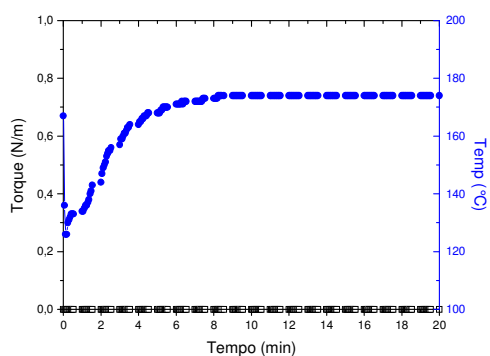


Figura 16 – Amostra FFL-001 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20min; 170 °C; 70 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$)

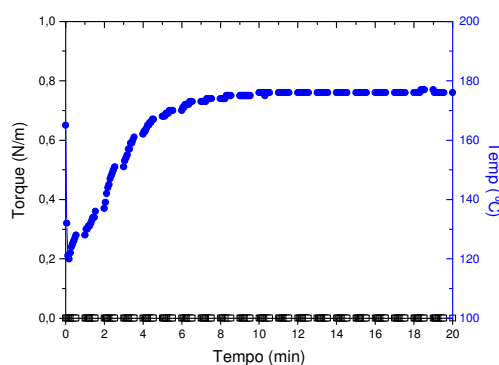


Figura 17– Amostra FFL-002 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20 min; 170 °C; 90 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$)

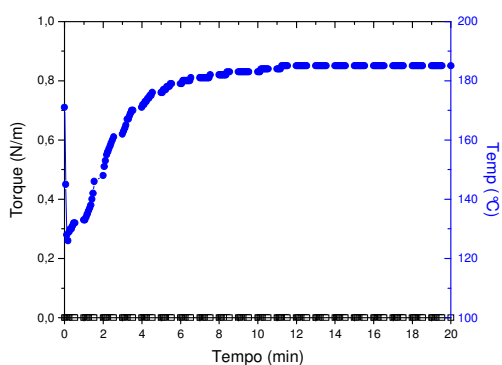


Figura 18 – Amostra FFL-003 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20 min; 180 °C; 70 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$)

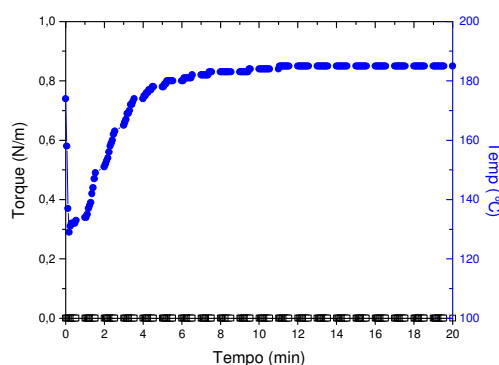


Figura 19 – Amostra FFL-004 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20 min; 180 °C; 90 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$)

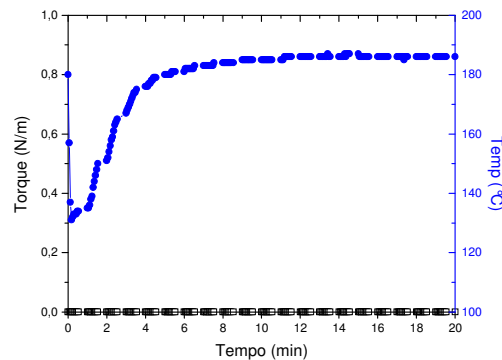


Figura 20 – Amostra FFL-005 com 35% de umidade e 10% de glicerol (20 min; 180 °C; 110 rpm; ρ_{amido} 0,508 g/cm³)

As Figuras 21 e 22 mostram as curvas de torque e temperatura obtidas da mistura de amido com água e glicerol, na razão 30%: 20%: 50%. As duas amostras foram processadas durante 15 minutos a 180 °C e a 90 ou 100 rpm, Figuras 21 e 22 respectivamente. A amostra FFL-006 teve um torque máximo no início e antes de completar 2 minutos o torque voltou a zero. Esse torque elevado pode ter sido causado por aglomerado formado dentro da câmara de mistura e que logo se desfez. A amostra FFL-007 não apresentou torque e também apenas sofreu a ação da temperatura. Ambas as amostras não sofreram fusão, a amostra FFL-006 teve grânulos como produto final e a FFL-007 apenas pó.

A justificativa para que todas as amostras até aqui não apresentassem torque pode ter sido o valor da densidade informado pelo fabricante. E com isso é provável que o material não tenha preenchido a câmara de mistura não sofrendo ação do cisalhamento. As amostras mencionadas a seguir tiveram o valor da densidade alterado para 1,2 g/cm³ que é o valor da densidade do amido comum.

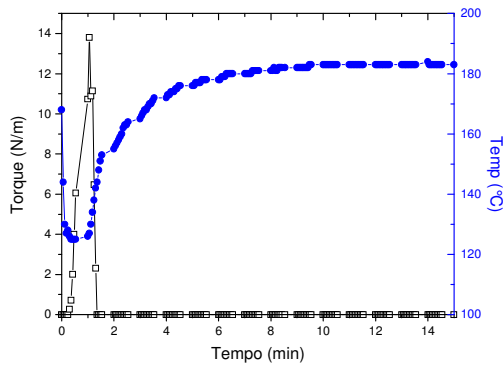


Figura 21 – Amostra FFL-006 com 20% de umidade e 50% de glicerol (15 min; 180 °C; 90 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$)

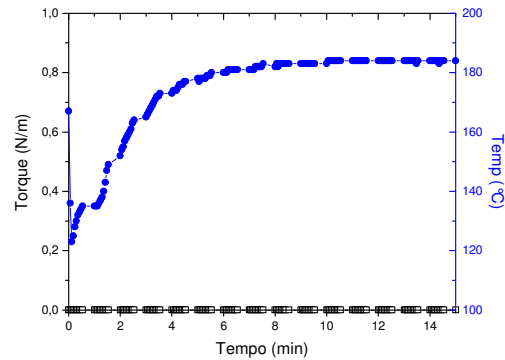


Figura 22 – Amostra FFL-007 com 20% de umidade e 50% de glicerol (15 min; 180 °C; 100 rpm; $\rho_{\text{amido}} 0,508 \text{ g/cm}^3$)

As curvas das Figuras a seguir podem ser analisadas com base nas considerações de BYRNE, que descreveu uma curva típica em reômetro de torque, na qual dois máximos podem ser observados. O primeiro máximo de torque pode estar associado à compactação do material e ao início do processamento. Um segundo máximo, quando ocorre, pode indicar a degradação do material.

As Figuras 23 e 24 mostram as curvas de torque e temperatura obtidos durante o processamento de mistura de amido com glicerol, na razão 60%: 40% a 180 °C com rotação de 70 e 90 rpm. Ambos os processamentos provocaram a fusão e a degradação do amido. Os picos indicativos de degradação do amido foram acompanhados por elevação da temperatura da mistura (Figura 24) e sofreram um deslocamento para tempos em função do aumento da velocidade de rotação.

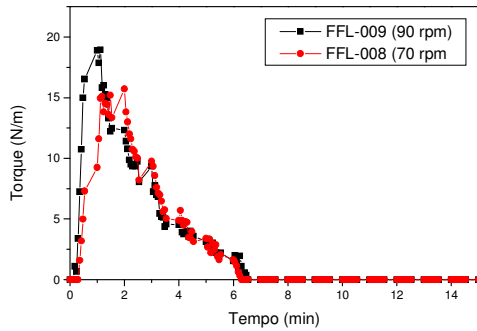


Figura 23 – Curva de torque das amostras FFL-008 e FFL-009 (15min; 180 °C)

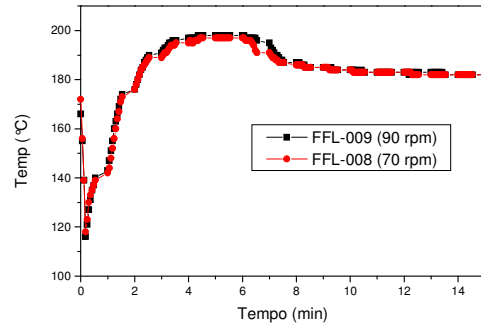


Figura 24 – Curva de temperatura das amostras FFL-008 e FFL-009 (15min; 180 °C)

Figuras 25 e 26 mostram as curvas de torque e temperatura obtidas durante o processamento de mistura de amido com glicerol, na razão 70%: 30% a 180 °C com rotação de 70 e 80 rpm. Ambos os processamentos provocaram a fusão e a degradação do amido. Os picos indicativos de degradação do amido foram acompanhados por elevação da temperatura da mistura e também sofreram um deslocamento para tempos em função do aumento da velocidade de rotação.

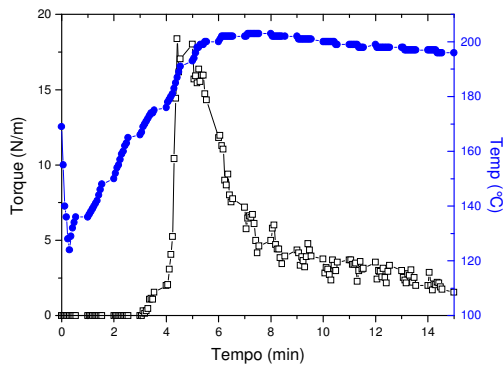


Figura 25 – Amostra FFL-010 com 30% de glicerol (15 min; 180 °C; 70 rpm; $\rho_{\text{amido}} 1,2 \text{ g/cm}^3$)

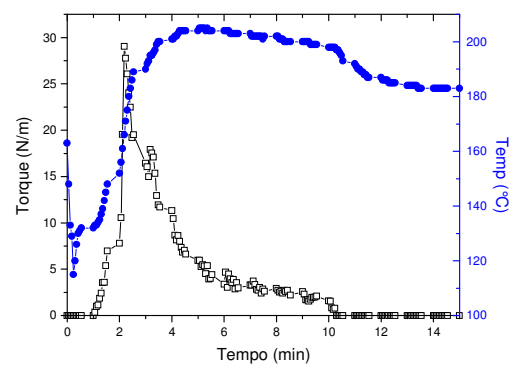


Figura 26 – Amostra FFL-011 com 30% de glicerol (15 min; 180 °C; 80 rpm; $\rho_{\text{amido}} 1,2 \text{ g/cm}^3$)

As curvas de torque e de temperatura obtidas durante o processamento da mistura de amido com maior teor de glicerol, na razão 60%: 40% a 150°C e com rotação de 50 e 60 rpm podem ser visualizadas nas Figuras 27 e 28. O gráfico apresenta o primeiro máximo de torque associando à compactação do material e início do processamento. As curvas de torque apresentam o primeiro máximo e o segundo e variações que tendem ao valor zero de torque. Os dois produtos obtidos estavam fundidos e degradados.

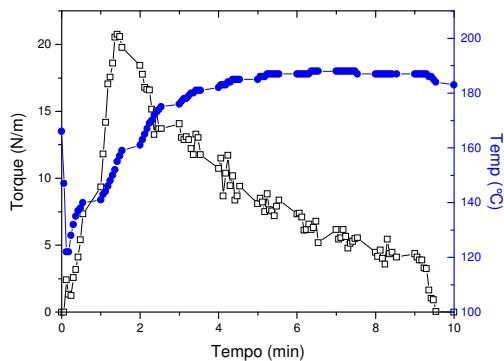


Figura 27 – Amostra FFL-012 com 40% de glicerol (10 min; 150°C; 50 rpm)

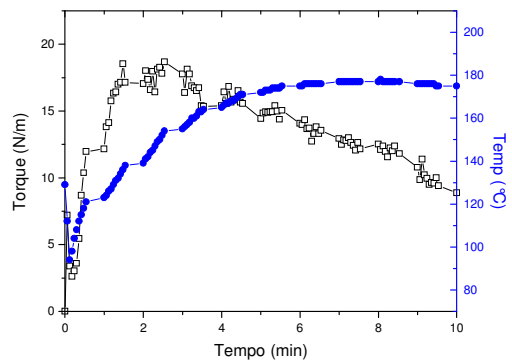
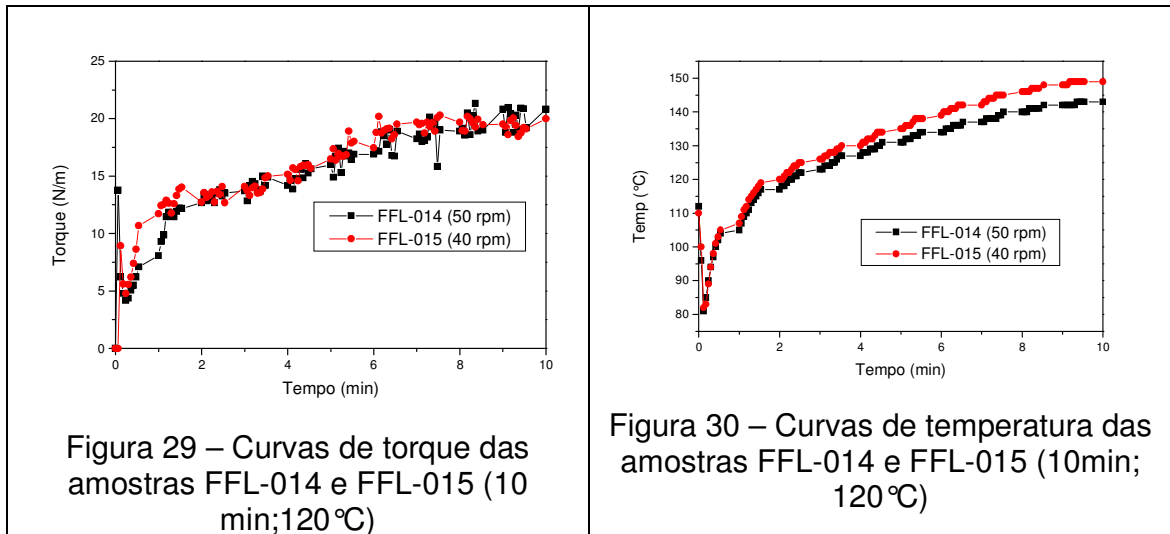
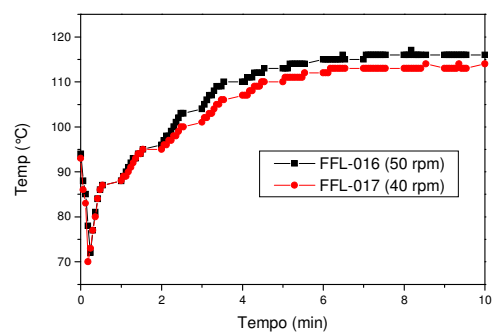
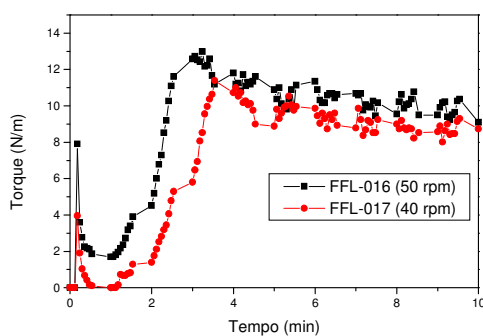


Figura 28 – Amostra FFL-013 com 40% de glicerol (10 min; 150°C; 60 rpm)

As Figuras 29 e 30 mostram a comparação entre as curvas de torque e temperatura obtidas durante o processamento da mistura e glicerol, na razão de 60%: 40% a 120°C com rotações de 50 e 40 rpm. As curvas de torque das duas amostras apresentaram comportamento semelhante. Os valores de temperatura da amostra FFL-015 foram ligeiramente superiores. As duas curvas de torque aumentam à medida que a temperatura se eleva, revelando que o material fundido é mais resistente aos rotores. O amido fundiu nos dois processamentos e apenas o produto da amostra FFL-014 continha sinais de degradação.



As Figuras 31 e 32 mostram a comparação entre as curvas de torque e temperatura obtidas durante o processamento da mistura e glicerol, na razão de 60%: 40% a 100 °C com variações na rotação. A Figura 31 mostra que os picos foram mais elevados para velocidade de rotação maior e sofreram deslocamento para tempos menores. As curvas de torque tendem a formar um patamar, apesar de flutuações, ao mesmo tempo em que a temperatura também tende a um patamar. O amido fundiu nos dois processamentos e ambos os produtos não apresentaram sinais de degradação.



As Figuras 33 e 34 mostram a comparação entre as curvas de torque e temperatura obtidas durante o processamento da mistura de amido e glicerol, na razão de 60%: 40%

com rotação de 50 rpm e variações na temperatura. A Figura 33 mostra a influência da temperatura na curva de torque onde a temperatura mais elevada de processamento promoveu valores de torque mais elevados. Este comportamento se repetiu nas amostras FFL-015 e FFL-017 processadas a uma rotação de 40 rpm.

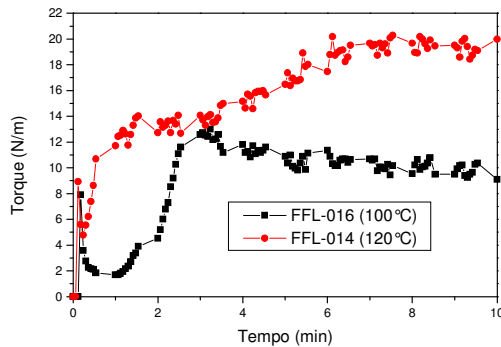


Figura 33 – Curvas de torque das amostras FFL-014 e FFL-016 (10 min; 50 rpm)

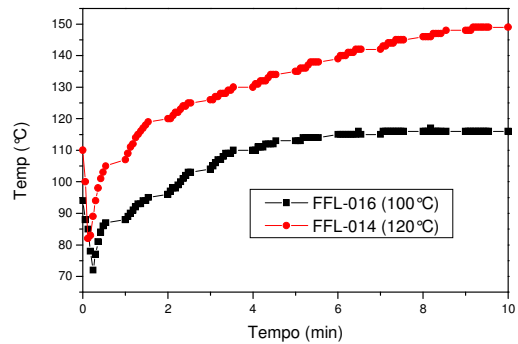


Figura 34 – Curvas de temperatura das amostras FFL-014 e FFL-016 (10 min; 50 rpm)

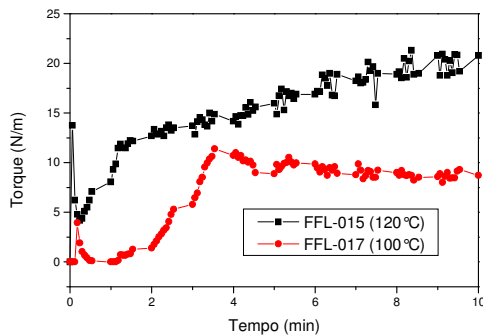


Figura 35 – Curvas de torque das amostras FFL-015 e FFL-017 (10 min; 40 rpm)

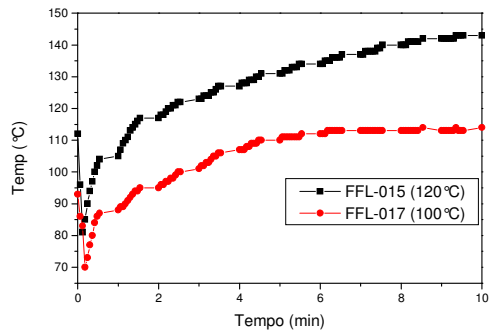


Figura 36 – Curvas de temperatura das amostras FFL-015 e FFL-017 (10 min; 40 rpm)

As curvas de torque e de temperatura obtidas durante o processamento da mistura de amido com menor teor de glicerol, na razão 90%: 10% a 100°C e com rotação de 50 rpm podem ser visualizadas na Figura 37. O gráfico apresenta o primeiro máximo de torque associando a compactação do material e início do processamento. Comparando com a amostra FFL-016 na Figura 38, a amostra FFL-018 deveria apresentar valores de

torque mais elevados já que possui em sua composição uma quantidade menor de plastificante. Uma menor quantidade de plastificante dificulta o processamento e aumenta o torque. A resposta para essa inversão de comportamentos pode ser explicada pela aparência do produto final dos dois procedimentos. O processamento da amostra FFL-018 resultou num pó granulado e da FFL-016 em uma massa fundida, que aumenta a resistência ao cisalhamento.

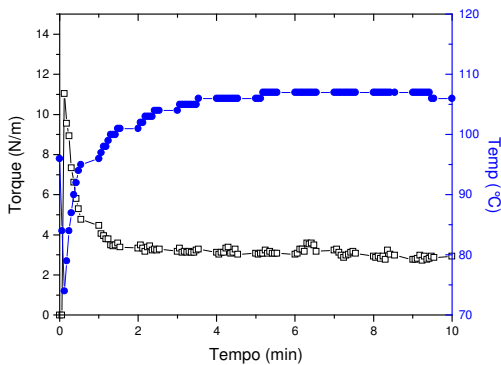


Figura 37– Amostra FFL-018 com 10% de glicerol (10 min; 100°C; 50 rpm; $\rho_{\text{amido}} 1,2 \text{ g/cm}^3$)

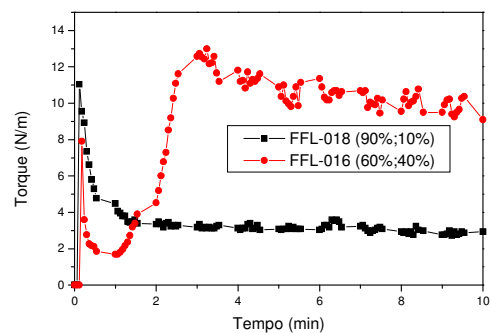


Figura 38 – Curva de torque das amostras FFL-018 e FFL-016 (10 min; 100°C; 50 rpm; $\rho_{\text{amido}} 1,2 \text{ g/cm}^3$)

A Figura 39 mostra as curvas de torque e de temperatura, obtidas durante o processamento de mistura de amido com glicerol, na razão 70%: 30% a 100°C e com rotação de 40 rpm. O processamento teve que ser abortado, pois por volta de 5 minutos o torque aumentou exageradamente pondo em risco o equipamento.

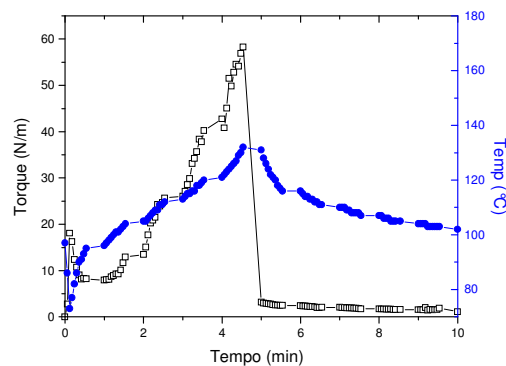


Figura 39 – Amostra FFL-019 com 30% de glicerol (10 min; 100°C; 40 rpm; $\rho_{\text{amido}} 1,2 \text{ g/cm}^3$)

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO *IN NATURA*, AMIDO PROCESSADO E AMILOSE HIDROLISADA

5.2.1. Difração de Raios-X

A Figura 40a mostra o difratograma de raios-X do amido *in natura*. Como podemos observar, ele apresenta uma cristalinidade tipo B. Após o processamento, o amido rico em amilose apresenta um aspecto borrachoso, possivelmente devido à quantidade de glicerol usada como plastificante para o processamento. A cristalinidade desse amido processado foi avaliada de duas maneiras; com a amostra moldada por compressão e com amostra sob forma de filme vazado. Primeiramente, foi feito um filme prensado, o qual originou o difratograma da Figura 40b. Nessa Figura 40b, dois tipos de cristalinidade podem ser identificados. O primeiro, do tipo B, é identificado por meio do pico de baixa intensidade, a $16,6^\circ$ (2θ). O segundo tipo de cristalinidade pode ser identificado por meio do pico $19,7^\circ$ (2θ), característico de cristalinidade V_h . Esse tipo de cristalinidade é formado em amostras de amido, processadas como citado por Van Soest e colaboradores (1990). Para a obtenção do filme vazado, o sulfóxido de dimetila foi usado como solvente. A Figura 40c mostra o difratograma obtido para esse filme vazado. Como pode ser observado, a cristalinidade dessa amostra é reduzida, muito provavelmente devido à presença residual do solvente, de alto ponto de ebulição.

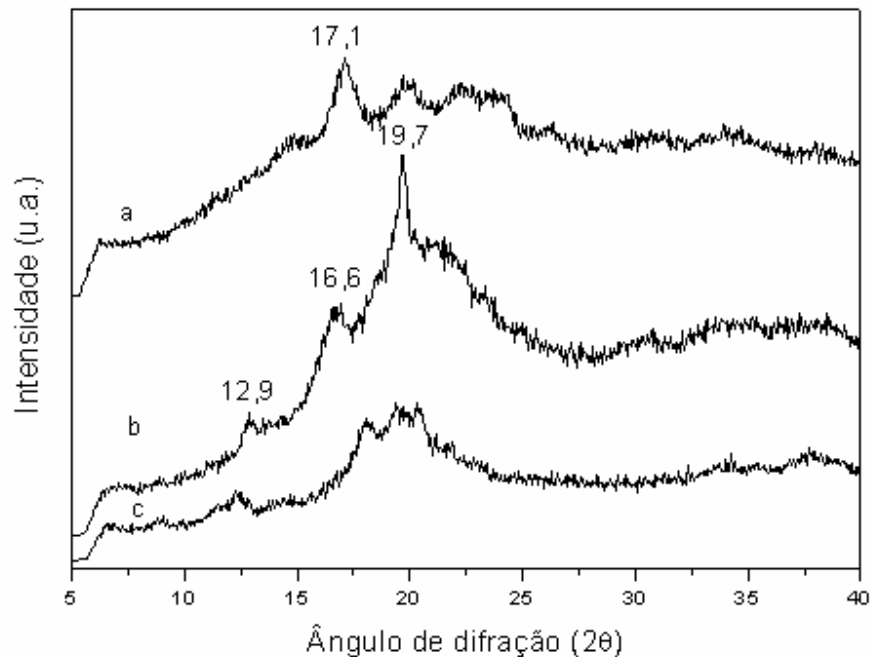


Figura 40 – Difração de raios-X do amido *in natura* (a), da amostra processada FFL-017 prensada em filme (b), e da amostra processada FFL-017 em filme vazado (c)

5.2.2. Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (^1H NMR)

A Figura 41 mostra o espectro de ^1H NMR da amostra de Hylon VII, um amido rico em amilose, em sulfóxido de dimetila deuterado (DMSO-d_6). As Figuras 42 e 43 mostram, respectivamente, espectros obtidos no mesmo solvente para o produto resultante do processamento, e para aquele que, após o processamento foi submetido à quebra da cadeia principal por ultra-som.

Em primeiro lugar, faz-se necessário identificar os picos que não pertencem às macromoléculas em questão. A água, freqüentemente absorvida por solventes deuterados, aparece nos espectros obtidos em DMSO-d_6 a 3,35 ppm (SILVERSTEIN, BASSLER & MORRILL, 1994a). Nos espectros das Figuras 41, 42 e 43, a água também foi usada como solvente e o pico largo a 3,2 ppm pode ser atribuído à água. O álcool etílico, usado na recuperação dos produtos por precipitação, apresenta em DMSO-d_6 um triplete centrado a 4,4 ppm, um multiplete centrado a 3,5 ppm e um triplete centrado

a 1,1 ppm (SILVERSTEIN et al, 1994b). Em todos os casos, o singlete a 2,5 ppm é atribuído ao DMSO-d₆.

A análise dos picos correspondentes aos átomos de hidrogênio do amido pode ser realizada com base em dados da literatura (ELOMAA *et al.*, 2004). Nesse trabalho, são apresentados espectros de ¹H NMR a 500 MHz, de acetatos de amido de batata hidrolisado, em DMSO-d₆. Os picos dos átomos de hidrogênio do grupamento metila aparecem afastados dos demais picos das cadeias de amido. Além de assinalar as absorções correspondentes a H-3, H-1, H-2, H-6,6', H-5 e H-4, multipletes de baixa intensidade foram observados na região 5 a 4,8 ppm, previamente atribuídos a átomos de hidrogênio ligados a C1, de unidades terminais (LAIGNEL *et al.*, 1997).

No presente caso, no espectro do amido granular e no amido processado, rico em amilose, estão presentes os picos correspondentes aos átomos H-3, H-1, H-2, e H-6,6'.

No espectro da Figura 43, obtido para o amido processado e posteriormente degradado com ultra-som, os picos atribuídos a H-3 e a H-2 não mais puderam ser observados. Esse resultado não era esperado e parece indicar a quebra da ligação entre C2 e C3.

No espectro da Figura 42, a região do multiplete correspondente a H-5 e H-4 está encoberta pela absorção da água.

Na região de campo mais baixo, entre 5,45 e 5,22 ppm, um singlete (que algumas vezes aparece como um multiplete) pode ser atribuído a H-3. A absorção a 5,09 ppm pode ser atribuída a H-1.

A absorção a 4,55 (4,53) ppm pode ser atribuída à absorção de H-2 (no caso, seriam átomos de hidrogênio ligados ao C2 de unidades repetitivas de D-glicose que não sofreram a quebra da ligação C2-C3). A absorção na região entre ~3,7 a ~3,4 ppm pode ser atribuída aos dois átomos de hidrogênio metilênicos H-6 e H-6'.

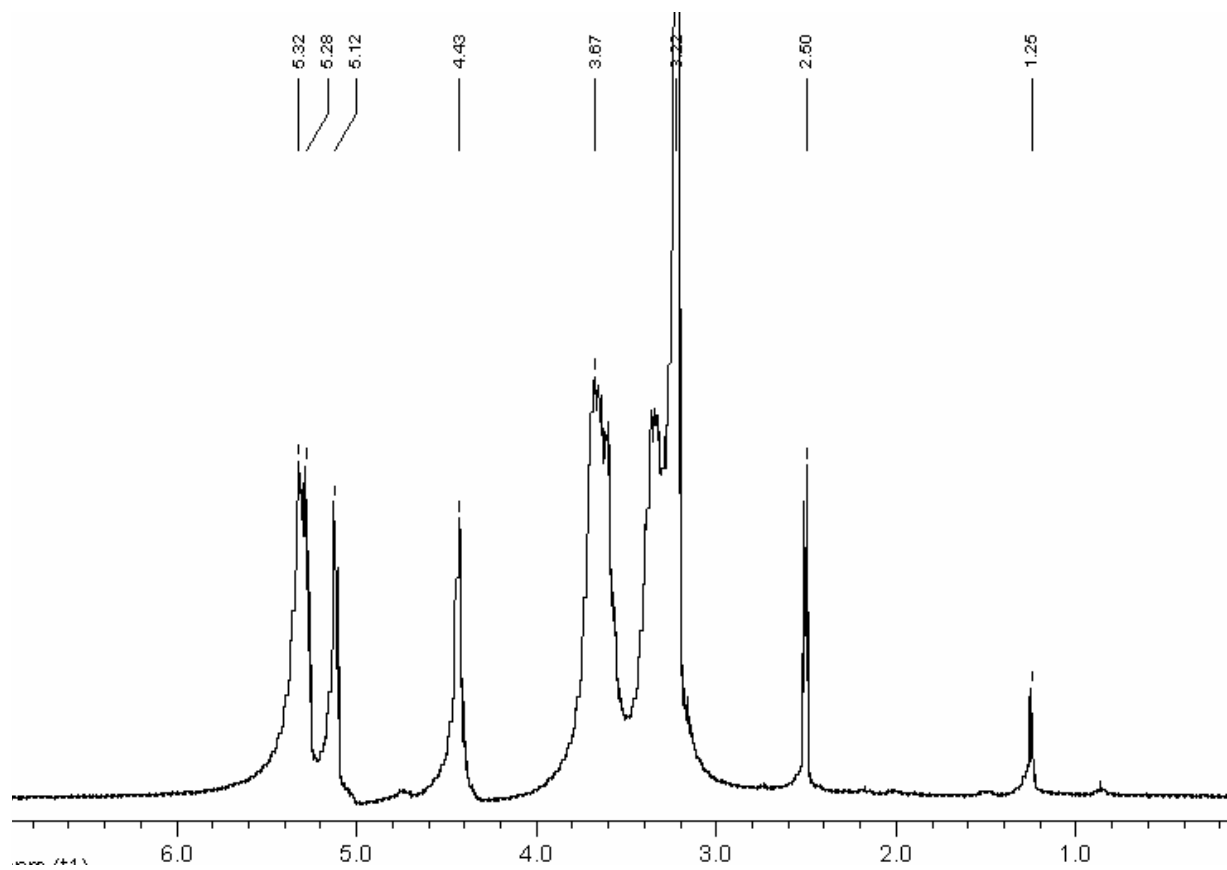


Figura 41 – Espectro ^1H NMR do Hylon VII *in natura* solubilizado em DMSO-d_6 a $30\text{ }^\circ\text{C}$

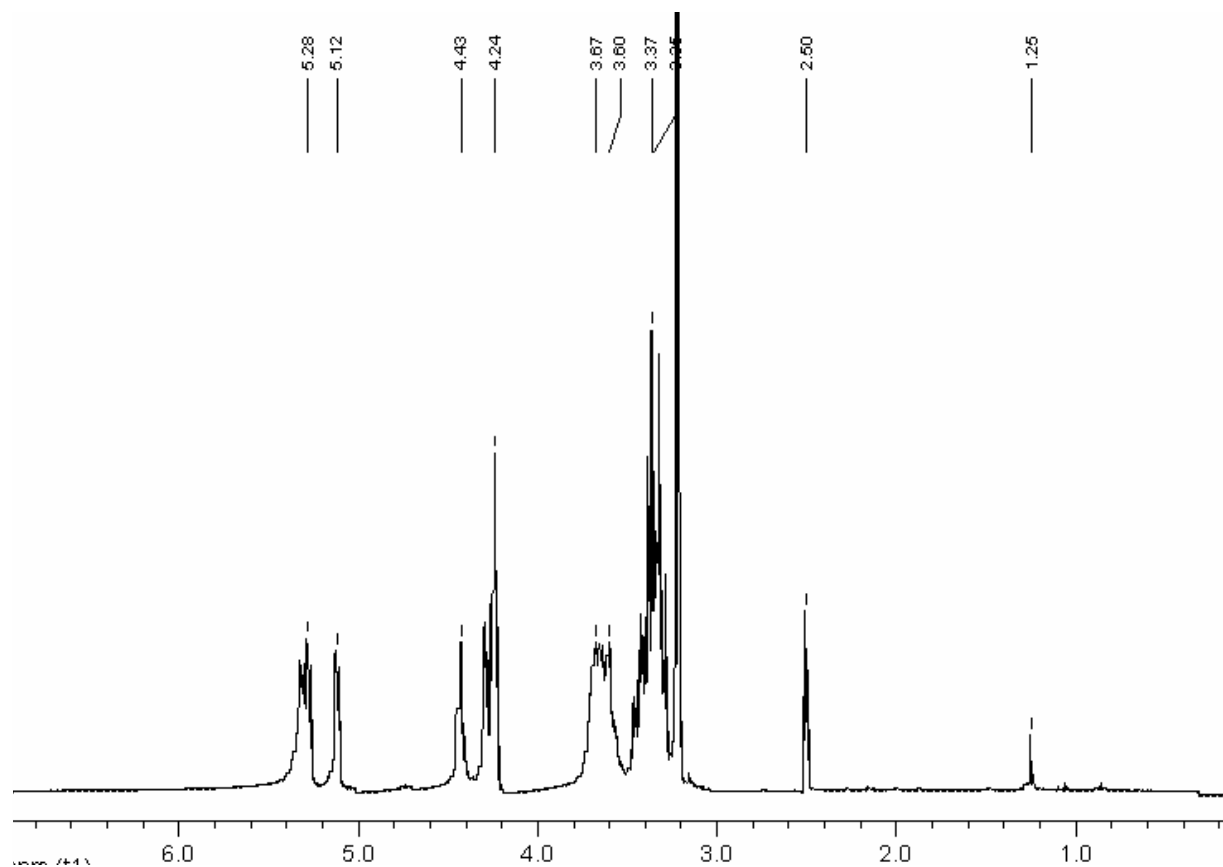


Figura 42 – Espectro ^1H NMR da amostra FFL-017 solubilizada em DMSO-d_6 a 30°C

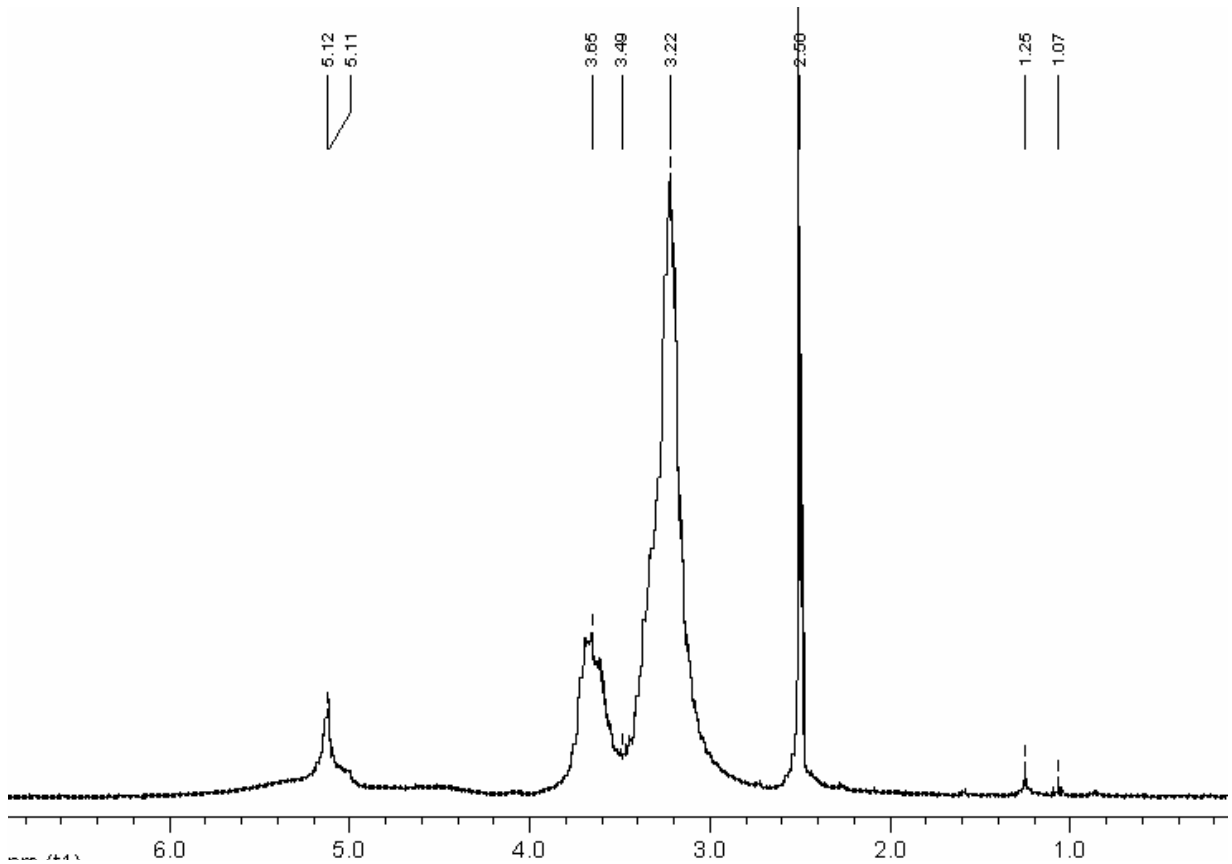
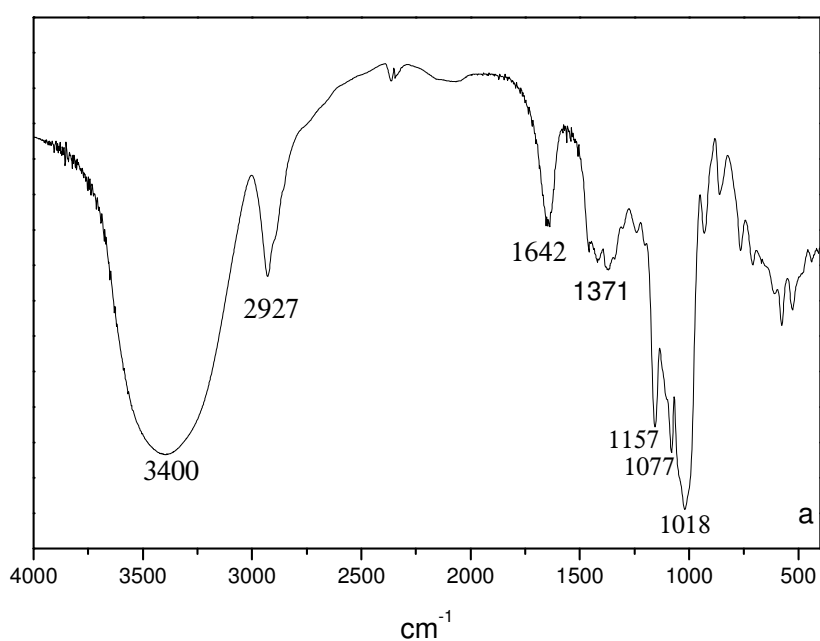


Figura 43 – Espectro ^1H NMR da amostra hidrolisada solubilizada em DMSO-d_6 a $30\text{ }^\circ\text{C}$

5.2.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) foi usada para a caracterização do amido *in natura*, do amido processado e da amilose hidrolisada. O espectro do amido *in natura* (Figura 44a) mostra as bandas de absorção características do amido em 3400 e 1650 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento e a deformação angular de ligações $-\text{OH}$. Além dessas absorções, pode ser observada a banda a 2926 cm^{-1} , atribuída à deformação axial de ligações C-H . As bandas na região 1200 a 1000 cm^{-1} , características do amido, são atribuídas a vibrações de deformação axial de C-O em álcoois e a vibrações de deformação axial do sistema O-C-O . A Figura 44b mostra o espectro do amido processado, que apresenta o mesmo perfil de bandas que o amido *in natura*. Para a amilose hidrolisada (Figura 44c) aparecem as bandas características

de ligações -OH, porém de menor intensidade. Uma banda intensa em 1453 cm^{-1} presente no espectro da amilose hidrolisada pode ser atribuída ao grupamento -CH de aldeído, formado devido à quebra da ligação entre os átomos de carbono C2 e C3 do anel de glicose, durante a hidrólise em meio básico. Esse resultado torna-se mais evidente comparando-se com o espectro de ^1H NMR (Figura 43), no qual os picos atribuídos aos átomos de H-2 e H-3 não aparecem.



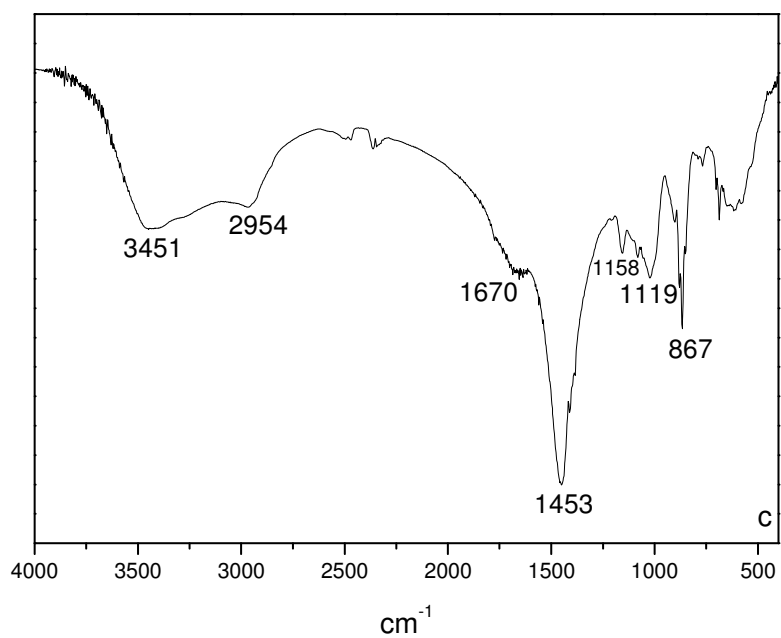
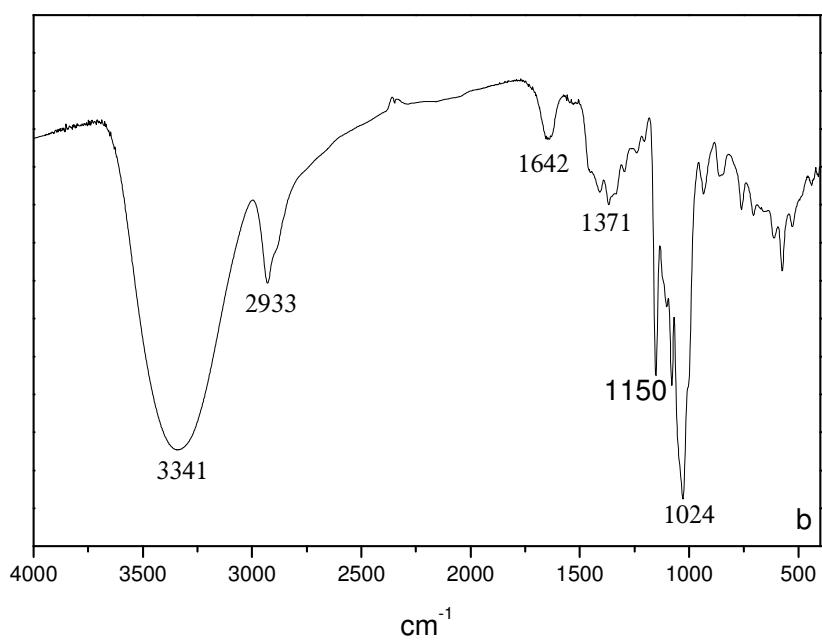


Figura 44 – Espectros de absorção na região do infravermelho do amido *in natura* (a), do amido processado (b) e da amilose hidrolisada (c)

5.2.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) é considerada um método simples e preciso para avaliar estabilidade térmica e a decomposição de polímeros (ATHAWALE & LELE, 2000). A Tabela 13 mostra as temperaturas de degradação obtidas para amido *in natura*, amido processado e amilose hidrolisada, e o teor de água perdido durante a análise de cada material. No termograma do amido *in natura*, duas etapas de perda de massa podem ser observadas (Figura 45a). A primeira etapa de perda de massa é devido à evaporação de umidade absorvida pelo amido. A rápida decomposição ocorre no segundo estágio, e resulta em uma perda de massa de 88,48%. A decomposição máxima para esse estágio ocorre em 310,65°C. O amido processado (Figura 45b) apresenta apenas uma etapa de perda de massa (92,59%) e a decomposição máxima ocorre em 317,83°C. O amido processado não apresentou perda no teor de água, pois esse já havia perdido água durante a fusão na câmara de mistura. A amilose hidrolisada (Figura 45c) apresentou duas etapas de perda de massa. A primeira etapa da perda de massa é devido à umidade. A decomposição ocorre no segundo estágio, e resulta em uma perda de massa de 90,17%. A decomposição máxima ocorre em 232,98°C.

Os resultados revelam que a fusão do amido não alterou significativamente a temperatura de início de degradação, T_{onset} , e da temperatura máxima de degradação, T_{deg} . Esse fato mostra que não houve despolimerização durante o processamento do amido. A amostra hidrolisada apresenta valores de T_{onset} e T_{deg} mais baixos tanto em relação ao Hylon VII quanto para o amido processado, o que evidencia a redução da massa molar através da hidrólise por ultra-som.

Tabela 13 – Temperatura de início da degradação, T_{onset} , temperatura de taxa máxima de degradação, T_{deg} , e teor de água perdido durante os ensaios de degradação térmica do material

Produtos	T_{onset} (°C)	T_{deg} (°C)	H ₂ O perdida (%)
Amido <i>in natura</i>	295,70	310,65	12,31
Amido processado	293,77	317,83	-
Amilose hidrolisada	220,39	232,98	9,8

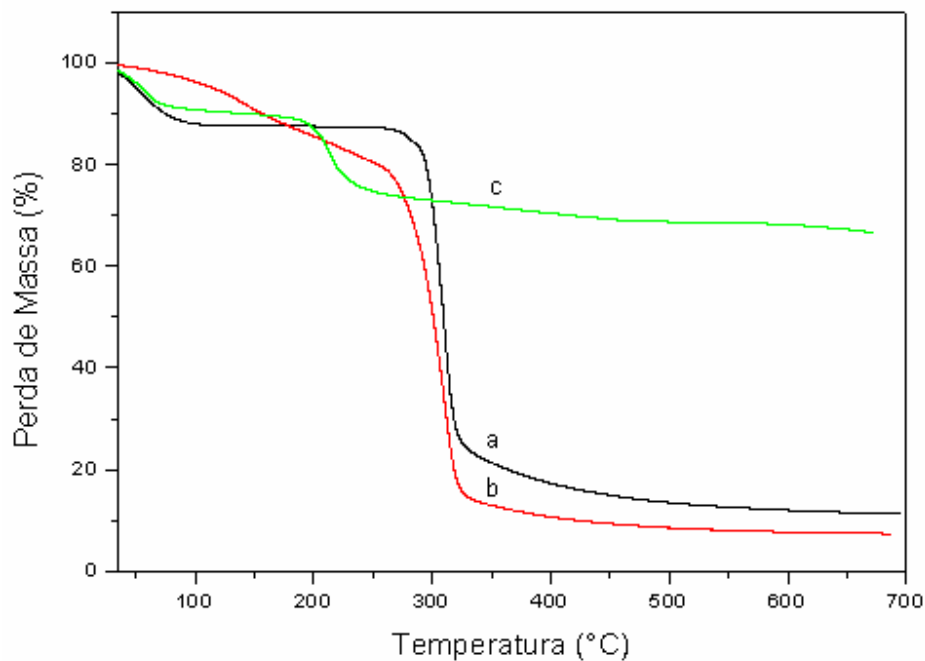


Figura 45 –Termogramas do amido *in natura* (a), do amido processado (b) e amilose hidrolisada (c)

5.2.5. Viscosidade da amilose hidrolisada

O coeficiente de Huggins é aceito como uma medida das interações entre polímero e solvente. Resultados experimentais indicam que quanto maior a afinidade entre polímero e solvente, menor o valor de k_H . Experimentalmente, valores de k_H entre 0,25 e 0,50 são encontrados quando os polímeros estão em bons solventes (ELIAS, 1977; KRIGBAUM & WALL, 1949; BRANDUP, 1977). A amostra FFL-017-1 apresentou valor de k_H dentro do intervalo citado (Tabela 14). As amostras FFL-017-2, FFL-017-3 e FFL-017-4 apresentaram valores de k_H (Tabela 14) muito baixos indicando boa afinidade entre a amilose e o solvente empregado, KOH a 1M. As amostras FFL-017-0 e FFL-017-5, apresentam valores de k_H acima de 0,50 (Tabela 14), o que indica uma possível formação de agregados moleculares. Essa diferença entre os valores de k_H das amostras analisadas corrobora o decréscimo esperado na massa molar, devido ao tratamento por ultra-som. A amostra FFL-017-5 também apresentou valor de k_H acima de 0,50 (Tabela 14) indicando novamente a uma provável formação de agregados moleculares.

Pode-se observar que a inclinação das retas de Kraemer (Figuras 46 a 51) forneceram valores da constante de Kraemer, k_K , negativos. Este fato aponta para soluções poliméricas e não para suspensões de partículas esféricas rígidas (VAN OENE & CRAGG, 1962).

A Tabela 14 mostra que os valores M_v reduziram com o número de vezes que as amostras foram expostas ao ultra-som. A amostra FFL-017-0 e a amostra FFL-017-5 apresentaram valores de k_H muito elevados; portanto, para o cálculo da viscosidade intrínseca foi utilizado o valor de k_K .

Tabela 14 – Dados viscosimétricos obtidos para a amilose em solução de KOH 1M a 25°C

Amostra	$[\eta]_H$ (dL/g)	R^2	k_H	$[\eta]_K$ (dL/g)	R^2	k_K	M_v
FFL-017-0	1,60	0,99	1,12	1,63	0,99	-0,31	$6,00 \times 10^5$
FFL-017-1	0,92	0,99	0,35	0,92	0,98	-0,10	$3,14 \times 10^5$
FFL-017-2	0,59	0,99	0,09	0,58	0,99	-0,06	$1,9 \times 10^5$
FFL-017-3	0,62	0,99	0,09	0,61	0,99	-0,08	$2,00 \times 10^5$
FFL-017-4	0,25	0,89	0,01	0,24	0,92	-0,01	$6,9 \times 10^4$
FFL-017-5	0,14	0,62	2,75	0,13	0,89	-5,12	$3,5 \times 10^4$

Os valores determinados na Tabela 15 estão representados graficamente nas Figuras 46 e 51.

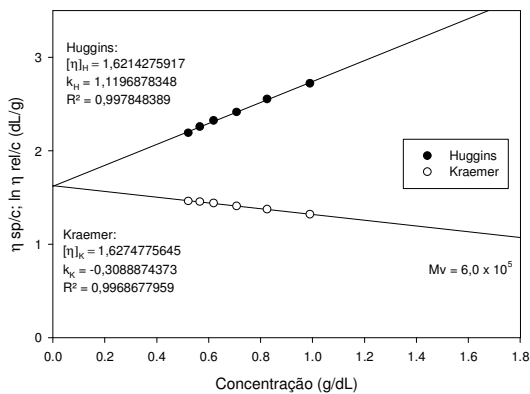


Figura 46 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-0

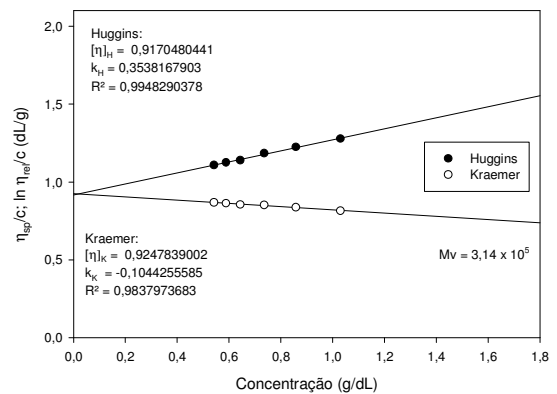


Figura 47 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-1

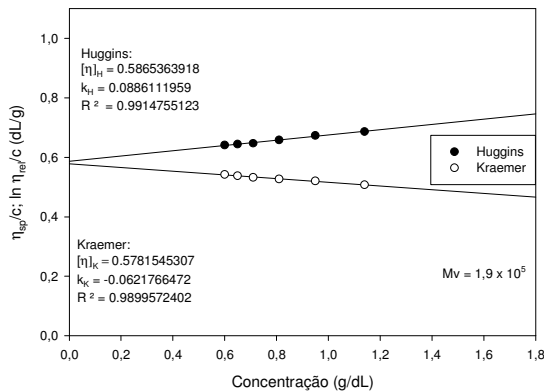


Figura 48 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-17-2

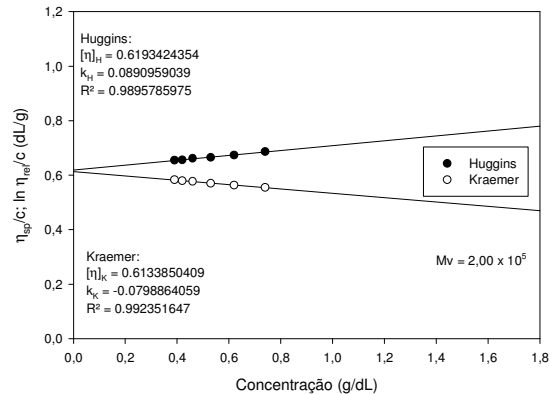


Figura 49 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-3

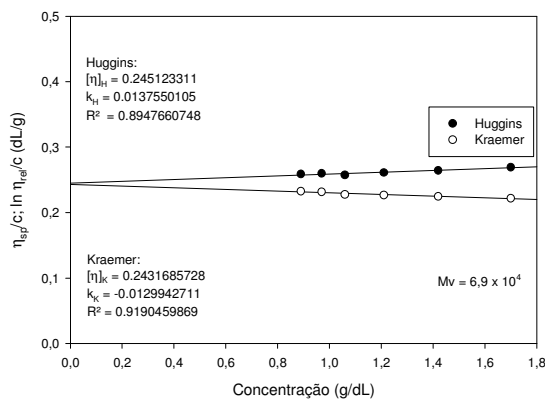


Figura 50 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-4

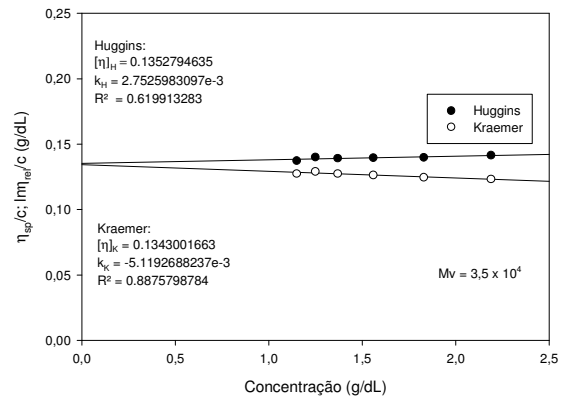


Figura 51 – Curvas de viscosidade da amostra FFL-017-5

5.2.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC) da amilose hidrolisada

O Hylon VII apresenta alto teor de amilose. Segundo Blaszczyk *et al* (2005), o pico de amilopectina possui tempo de eluição menor que a amilose. A Figura 52 apresenta os cromatogramas das amostras de amilose hidrolisadas, nos quais pode-se perceber o pico de amilose maior do que o de amilopectina. Apareceu um terceiro pico em ambos os cromatogramas em uma região de menor massa molar, o qual pode ser atribuído à amilose de menor massa molecular que se formou durante a hidrólise básica. A amostra de Hylon VII sem ultra-som não foi analisada devido a sua baixa solubilidade em água.

A Tabela 15 mostra uma comparação entre massa molar obtida por viscosimetria e por GPC. Os valores obtidos por GPC apresentam-se maiores do que os de viscosimetria, possivelmente devido à agregação, pois segundo Chen e colaboradores (1997), após um longo tempo de armazenamento, a solução passa por um processo de agregação e/ou retrogradação. Como as amostras passaram duas semanas em solução antes de serem injetadas, pode ter ocorrido agregação com aumento de massa molar. Por outro lado, para a análise por viscosimetria, as amostras foram preparadas três horas antes da análise. Outra consideração importante refere-se à fase móvel, solução aquosa de KNO_3 1M. De acordo com Chen e colaboradores (1997), a melhor fase móvel para análise de amido são soluções aquosas de NaOH e KOH 0,01M, as quais minimizam a agregação.

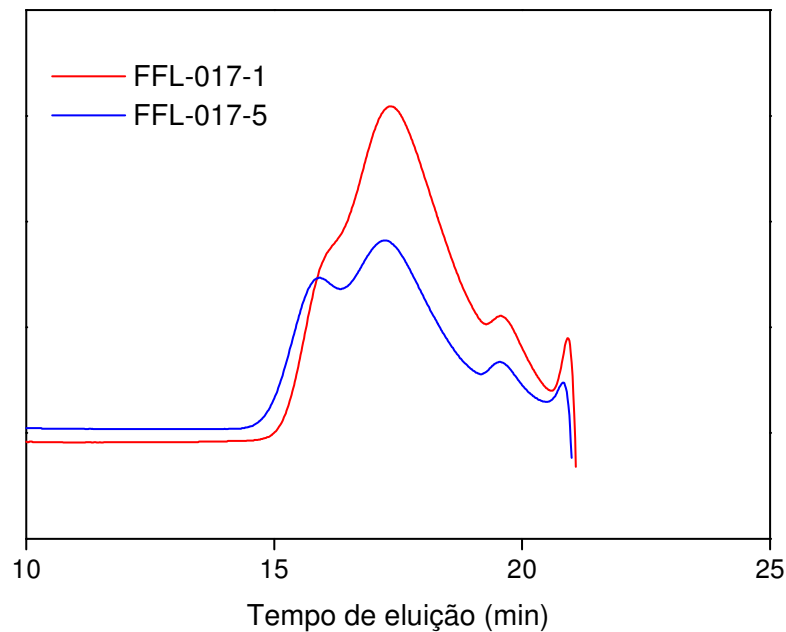


Figura 52 – Cromatogramas das amostras de amilose hidrolisadas em diferentes condições

Tabela 15 – Diferenças entre as análises de viscosidade e GPC

Amostra	Viscosidade		GPC		
	Viscosidade Intrínseca (g/dL)	Mv	Mn	Mw	PD
FFL-017-1	0,92	$3,14 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	3,52
FFL-017-5	0,14	$3,5 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	3,94

5.3. OBTENÇÃO DO REAGENTE FORMADOR DE LIGAÇÕES CRUZADAS (AMILOSE HIDROLISADA OXIDADA)

Sacarídeos e polissacarídeos são estudados como agentes promotores de ligações cruzadas com a Hb, pois os produtos assim modificados fornecem valores de $P_{50} \approx 8$ mmHg, os quais estão de acordo com o paradigma atual proposto por Winslow (1999) e Palmer e Eike (2004). Valores de P_{50} baixos facilitam a oxigenação dos órgãos e tecidos. Também, para aumentar o tempo de meia-vida na circulação, deve-se trabalhar com produtos com baixa concentração de Hb e elevada massa molecular.

Neste trabalho, a amilose oxidada (*o*-amilose) foi usada como reagente promotor de ligações cruzadas intra e intermoleculares da HbBv (Figura 53). Como já visto, a amilose foi oxidada com o meta-periodato de sódio (NaIO_4), o qual promove a quebra da ligação C-C com grupos hidroxila vicinais, e leva à formação de di-aldeídos nas unidades de glicose presentes na amilose. Os aldeídos reagem com resíduos de aminoácidos disponíveis na HbBv, formando grupamentos imina instáveis, que são reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4) e formam grupos amina estáveis (reação de formação de base de Schiff) (PALMER & EIKE, 2004).

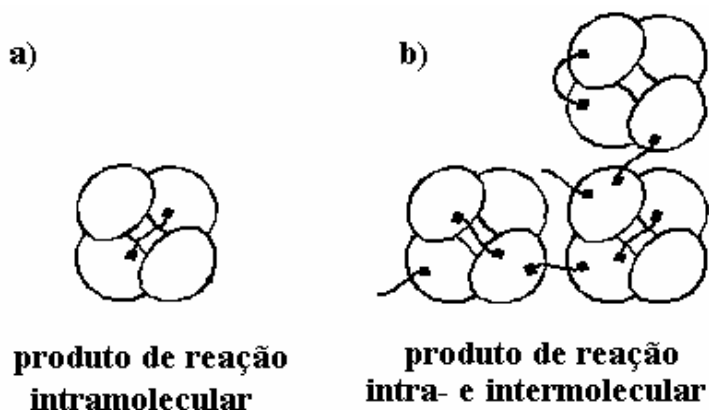


Figura 53 – Estruturas propostas para as espécies formadas a partir de reação da HbBv com a *o*-amilose

A Figura 54 mostra o espectro de absorção na região do infravermelho para a amilose oxidada. A presença do pico a 1720 cm^{-1} , característico de estiramento da ligação C=O de aldeído, e do pico em 1384 cm^{-1} , característico de deformação angular da ligação C-H de aldeído, indica que ocorreu a formação desse grupo funcional (-CHO) na amilose.

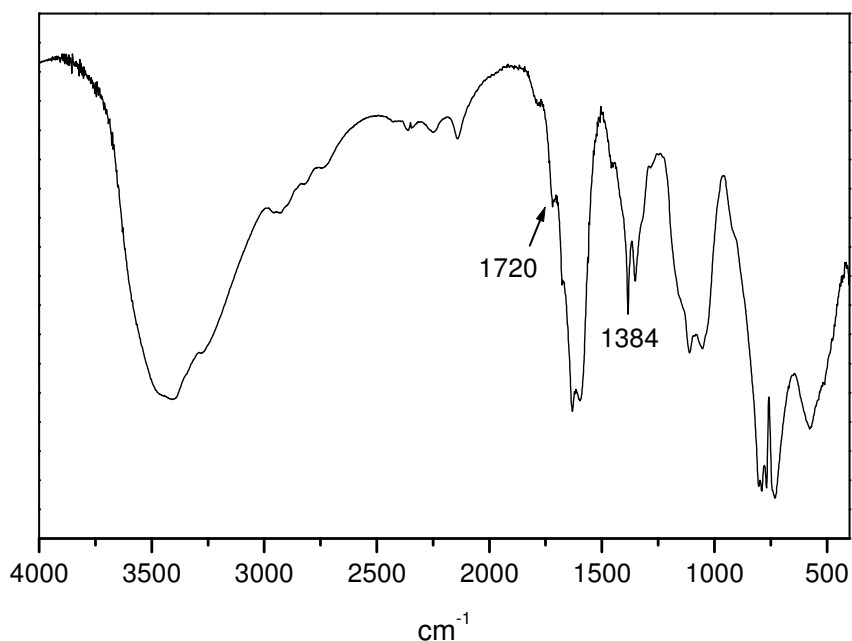


Figura 54 – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a amilose após a reação com NaIO_4 (*o*-amilose)

5.4. OBTENÇÃO DA HbBv A PARTIR DO SANGUE BOVINO

Duas a três lavagens são suficientes para a eliminação dos leucócitos, plaquetas e proteínas hidrossolúveis no concentrado de células vermelhas do sangue humano (RIESS, 2001). A Figura 55 mostra a curva-padrão de albumina que foi construída para que se obtivesse a equação da reta $\{[albumina]=(absorbância+0,06)/14,18\}$, a partir da qual foi possível o cálculo da concentração de albumina nos sobrenadantes, para avaliar-se a eficiência das lavagens. A Figura 56 mostra a concentração de albumina após cada lavagem do concentrado de hemácias com solução isotônica de NaCl. Como pode ser observado, foram necessárias quatro lavagens para a eliminação total da albumina do concentrado de células vermelhas bovinas.

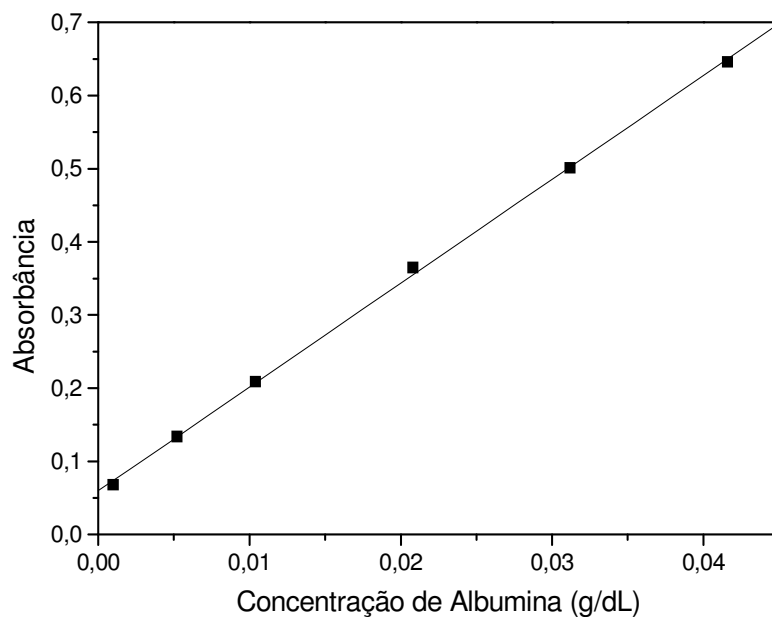


Figura 55 – Curva de calibração da concentração de albumina *versus* absorbância

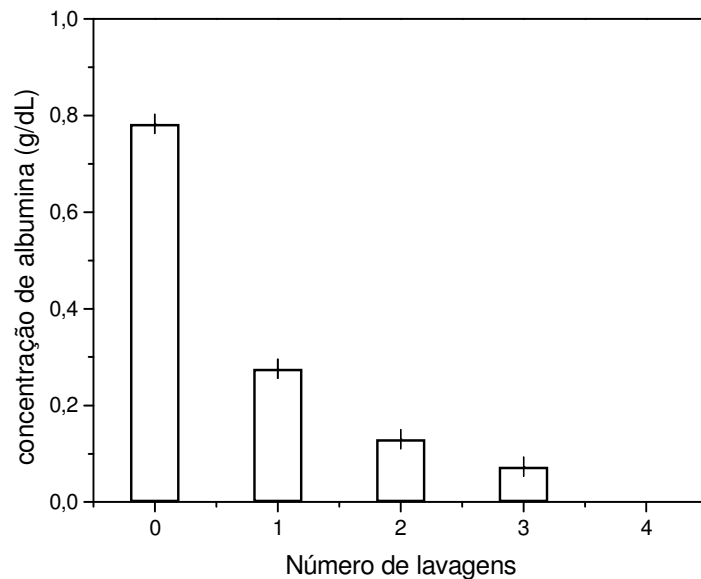


Figura 56 – Efeito do número de lavagens no procedimento de extração de albumina do concentrado de células vermelhas

Após as etapas de lavagem, para ter as hemácias isoladas, foi realizada a hemólise para a liberação da hemoglobina em solução. Tanto o procedimento de hemólise como o de purificação da hemoglobina já foi realizado pelo grupo do Laboratório de Biomateriais, onde está sendo realizada esta pesquisa, tanto para sangue humano e bovino, e foram publicados. A hemólise como descrito na parte experimental foi realizada por ultra-som conforme mencionado por Andrade e colaboradores (2004). Após a hemólise, foi realizado o procedimento de purificação da HbBv por desnaturação das proteínas hidrossolúveis diferentes da hemoglobina seguida por cromatografia líquida em coluna. Então a HbBv apresenta-se pronta para sofrer as reações de modificação química.

5.5. OBTENÇÃO DA HbBv MODIFICADA COM O-AMILOSE ANALISADA POR GPC E ELETROFORESE

A literatura apresenta uma gama de substitutos para o sangue obtidos com base na reação de sacarídeos e polissacarídeos oxidados com a hemoglobina (PLIURA, WONG & ER, 1996; HSIA, 1989; PALMER & EIKE, 2004; ANDRADE, LIMA & PINTO, 2006).

A amostra de HbBv purificada e as amostras de HbBv modificadas por meio de reações com a *o*-amilose foram analisadas por GPC e por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).

Pela técnica de GPC, com uma coluna de exclusão por tamanho é possível verificar-se a formação de produtos com diferentes massas moleculares (Figura 57). O cromatograma de GPC na Figura 57 apresenta um pico a 10,8 min, referente ao tetrâmero de HbBv. Para evitar agregação, KCl foi adicionado ao eluente.

Segundo Palmer e Eike (2004), deve ser adicionado 0,5 M de $MgCl_2$ ao tampão eluente, para dissociar o tetrâmero de HbBv que se mantém unido por interações de hidrogênio, em dímeros α - β , pois eles aparecerão em tempo de eluição maior do que a HbBv modificada. As unidades do tetrâmero, após a modificação química, mantêm-se unidas por ligações covalentes; portanto, não ocorrerá dissociação e os picos relativos às ligações intra e intermoleculares terão menores tempo de retenção. Esse procedimento possibilita a separação dos picos correspondentes à HbBv não modificada e modificada. Porém, nas análises realizadas no presente trabalho, foi usado somente KCl a 0,1 M, devido à recomendação do fabricante das proteínas usadas como padrões.

Na técnica de análise SDS-PAGE, o emulsificante dodecil-sulfato de sódio (SDS) é usado para quebrar as interações físicas responsáveis pela estabilização do tetrâmero (64 kDa). Logo, o tratamento térmico com SDS dissocia o tetrâmero em quatro subunidades (14,2 kDa). Assim, a HbBv purificada exibe uma banda correspondente a 14,2 kDa como pode ser visto na Figura 60 (linha 2). Nas Figuras 58 e 60, a linha 1 corresponde ao padrão de proteínas usado, e encontra-se descrito na metodologia.

Como pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 16 e na Figura 58, as amostras mHbBv-01 e mHbBv-02 apresentam uma maior massa molar, indicando a ocorrência de reação. Pelo valor da massa molar da HbBv purificada não ocorreu a formação de dímeros $\alpha\beta$, logo as ligações intramoleculares ocorreram no mesmo volume de eluição da molécula de HbBv, que possui massa molar de 64000. A

Tabela 16 apresenta valor de Mw para a HbBv acima desse valor. Possivelmente, deve ter ocorrido agregação. Para todas as outras reações, de acordo com os resultados da eletroforese (Figuras 58 e 60), a HbBv não sofreu reação de polimerização, visto que não foram observadas bandas em regiões de maiores massas molares.

Tabela 16 – Valores da massa molecular numérica média (Mn), massa molecular ponderal média (Mw) e polidispersão (PD)

Amostras	[HbBv] (g/dL)	Mn	Mw	PD
mHbBv-01	0,78	$1,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	1,40
mHbBv-02	0,82	$1,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	1,63
mHbBv-03	1,08	$8,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	1,22
mHbBv-04	0,32	$8,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	1,38
mHbBv-05	0,25	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	1,18
mHbBv-06	15,58	$9,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	1,08
mHbBv-07	14,98	$1,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	1,12
mHbBv-08	13,77	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	1,15
mHbBv	24,44	$8,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	1,17

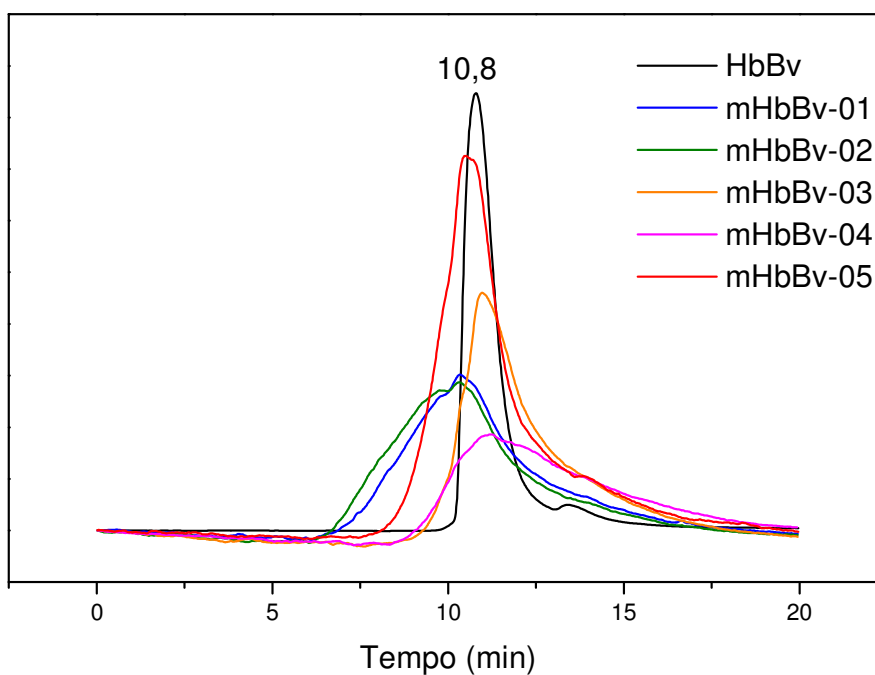


Figura 57 – Cromatogramas de HbBv purificada e dos produtos de HbBv modificados (mHbBv) pertencentes ao grupo 1

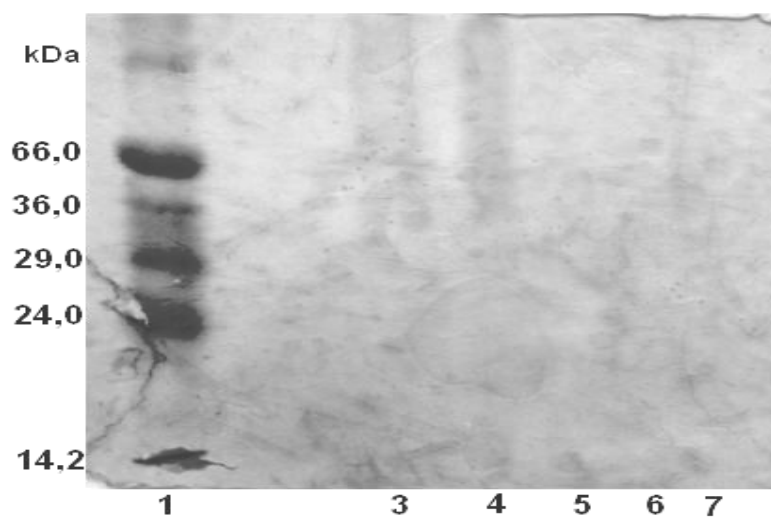


Figura 58 – Eletroforese SDS-PAGE da HbBv modificada com a α -amilose; padrão (linha 1), mHbBv-01 (linha 3), mHbBv-02 (linha 4), mHbBv-03 (linha 5), mHbBv-04 (linha 6) e mHbBv-05 (linha 7)

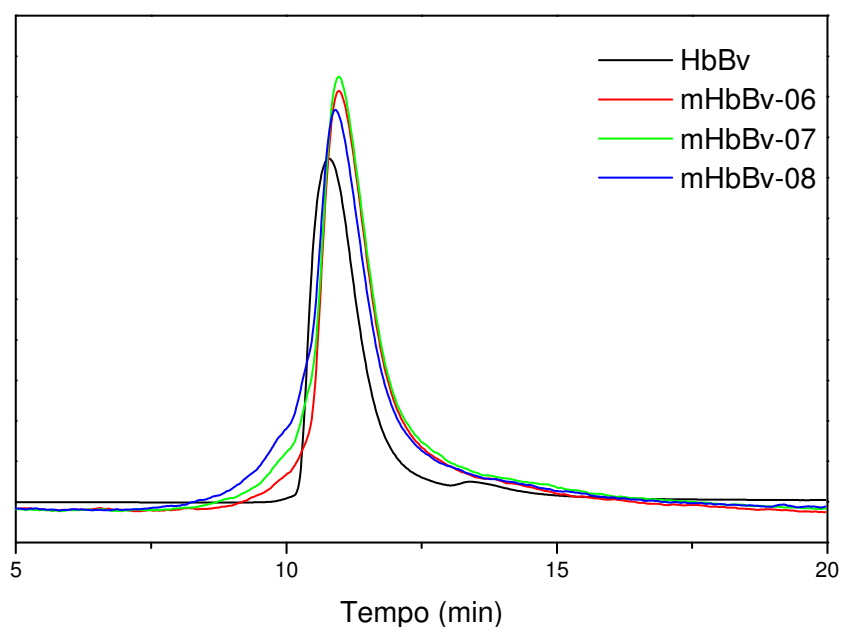


Figura 59 – Cromatogramas de HbBv purificada e dos produtos de HbBv modificados (mHbBv) pertencentes ao grupo 2

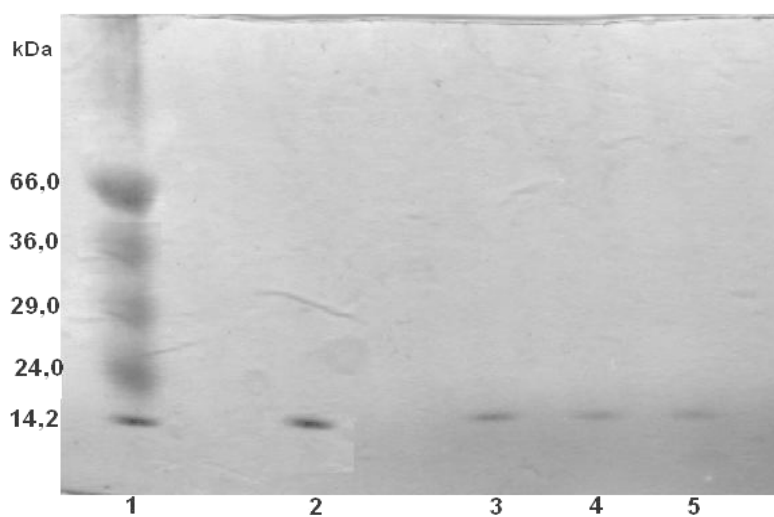


Figura 60 – Eletroforese SDS-PAGE da HbBv modificada com a σ -amilose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), mHbBv-06 (linha 3), mHbBv-07 (linha 4) e mHbBv-08 (linha 5)

5.6. METE-HEMOGLOBINA (MetHb)

A Figura 61 mostra o cromatograma de absorvância da HbBv modificada, a banda a 540 nm é referente à hemoglobina oxigenada (HbO₂), a banda a 570 nm é referente a desoxi-hemoglobina (Desoxi-Hb), já a banda em 630 nm é uma mistura de HbO₂ + Deoxi-Hb e MetHb. Após a adição da solução que contém KCN, a banda em 630 nm diminui de intensidade ou desaparece por completo caso não apresente MetHb (KIKUGAWA, SASAHARA & SASAKI, 1981).

Como se pode observar na Tabela 17, os produtos obtidos apresentam valores de MetHb entre 11,54 – 36,3%. Os níveis de MetHb estão no limite da viabilidade, considerando-se que esses níveis não deveriam ultrapassar significativamente os 10%, valor limite de MetHb para o transporte O₂ (LINDBERG *et al.*, 1998).

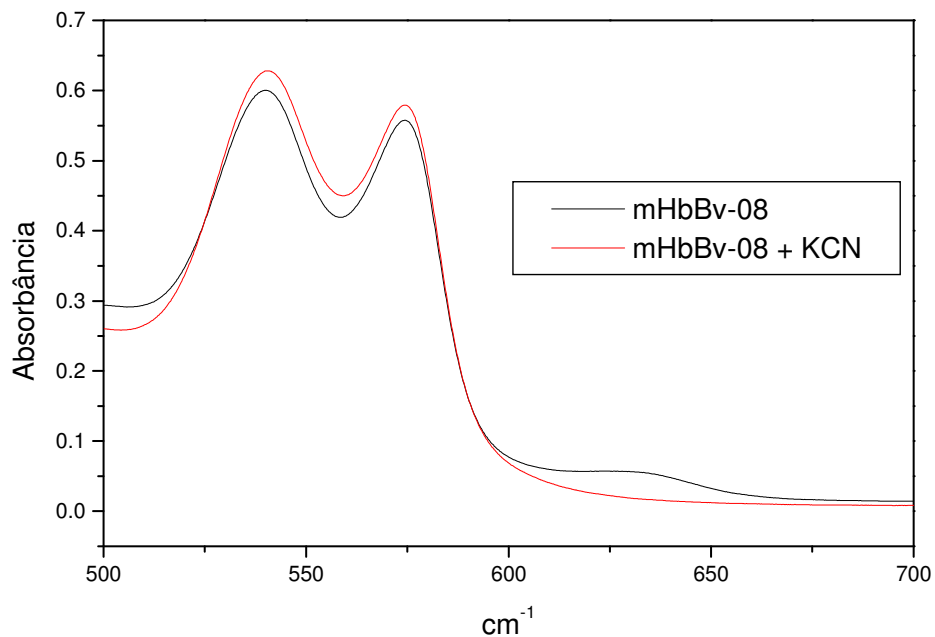


Figura 61 – Gráfico de absorvância versus comprimento de onda para a amostra de HbBv modificada por *o*-amilose (mHbBv-08)

Tabela 17 – Teor de MetHb nos produtos de HbBv modificada

Amostra	Concentração de HbBv (g/dL)	MetHb (%)
mHbBv-01	0,78	36,30 ± 0
mHbBv-02	0,82	28,24 ± 0
mHbBv-03	1,08	26,22 ± 2,85
mHbBv-04	0,32	22,19 ± 2,85
mHbBv-05	0,25	24,20 ± 0
mHbBv-06	15,58	16,77 ± 2,63
mHbBv-07	14,98	13,66 ± 0,85
mHbBv-08	13,77	11,54 ± 1,37

6. CONCLUSÕES

1. O processamento do Hylon VII e sua conseqüente fusão em câmara de mistura apresentaram influências por parte da rotação dos rotores, temperatura e quantidade de plastificantes empregado. A melhor condição, que resultou em uma pasta fundida e sem degradação, foi processada a 100°C, 40 rpm durante 10 minutos com 40 % de glicerol em relação a massa total da mistura.
2. A análise por difração de raios-X da amostra processada em filme vazado demonstrou a desestruturação dos grânulos de amido provocada pela fusão.
3. As análises realizadas por FTIR, ¹H NMR e TGA das amostras de Hylon VII *in natura* e do amido processado indicaram que não houve despolimerização ou degradação e que apenas ocorreu a desestruturação granular.
4. As análises realizadas por FTIR, ¹H NMR da amostra da amilose hidrolisada revelaram que a hidrólise por ultra-som provocou alterações na estrutura molecular da amilose.
5. A hidrólise por ultra-som em meio básico foi eficiente na redução da massa molecular da amilose e esta redução foi caracterizada por GPC e viscosimetria.
6. As análises por GPC e eletroforese mostraram que houve modificação da HbBv (poli-HbBv) em dois produtos do grupo 1 nas condições reacionais de 1:1/4h/300:1 e 1:1/6h/300:1.

7. Os produtos foram analisados quanto à oxidação da HbV durante as reações de modificação. O teor de MetHb se mostrou um pouco elevado em comparação ao nível máximo relatado na literatura.

7. REFERÊNCIAS

ADAMSON, J. G., BONAVENTURA, B. J., ER, S. S., JONES, R. T., LANGLOIS, S.F., MACDONALD, I.D. Production, characterization and clinical evaluation of Hemolink, an oxidized raffinose cross-linked hemoglobin-based blood substitute. Red blood cell substitutes. New York: Marcel Dekker; p. 335-52, 1997.

ADAMSON, J. G., MOORE, C. Hemolink, an O-raffinose crosslinked hemoglobin-based oxygen carrier. Blood substitutes; principles, methods, products and clinical trials. New York: Kargee Landes; p. 61-84, 1998.

ALAYASH, A. I., SUMMERS, A. G., WOOD, F., JIA, Y. Effects of glutaraldehyde polymerization on oxygen transport and redox properties of bovine hemoglobin. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 391, p. 225-234, 2001.

Alexander-von-Humboldt, F. Rapid isocrat method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high-performance liquid chromatography. **Jornal of Chromatography**, v. 567, p. 29-37, 1991

ANDRADE, C.T., BARROS, L.A.M., LIMA, M.P.C., AZERO, E.G. Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions. **Internatioanl Journal of Biological Macromolecules**,v. 34, p. 233-240, 2004.

Andrade, 2006

ANDREWS, N. J., FARRINGTON, C. P., COUSENS, S. N. Incidence of variant Creutzfeldt-Jacob disease in the UK. **Lancet**, v. 356, p. 481-482, 2000.

ATHAWALE, V.D., LELE, V. Syntheses and Characterization of graft copolymers of maize starch and methacrylonitrile. **Carbohydrate Polymers**, v.41, p. 407-416, 2000.

BARROS, L. A. M. Purificação e caracterização hemoglobina humana: efeitos dos métodos usados para lise de hemácias. Tese de Mestrado, Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

BATEY, I. L., CURTIN, B. M. Measurement of amylose/amylopectin ratio high-performance liquid chromatography. **Starch/ Stärke**, v. 48, p. 338-344 1996.

BILIADERIS, C. G. Structure and phase transitions of starch in food systems. **Food Technology**, v. , p.98-145, 1992.

BLASZCZAK, W., FORMAL, J., VALVERDE, S., GARRIDO, L. Pressure-induced changes in the structure of corn starches with different amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 132-140, 2005.

BUCCI, E., FRONTICELLI, C., ORTH, C., MARTORANA, M.C., ACBISCHER, L., ANGELONI, P. Bovine hemoglobin as a basis for artificial oxygen carriers. **Biomaterials Artificial Cells, Artificial Organs**, v. 16 (1-3), p. 197-204, 1988.

BONSON, P., LAVE, M.B., MORRIS, K. C. Novel polymerized, crosslinked, stromal-ree hemoglobin. **Patent** 4, 001, 00, Jan 1977.

BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.

BUNN, H. F. The role of hemoglobin based substitutes in transfusion medicine. **Transfusion Clinique et Bioloque**, v. 2, p. 433-439, 1995.

Burchard, W. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 64, p. 110, 1963.

BURCHARD, W., THURN, A. Heterogeneity in branching – mathematical treatment of the amylopectin structure. **Macromolecules**, v. 18, p. 2072-2082, 1985.

BYRNE, R. What is a torque rheometer? Technical Bulletin. Haake Buchler Instruments, New Jersey, p. 1-6, 1984.

CALLEJA, F. J. B., RUEDA, D. R., SECALL, T., BAYER, R. K., SCHILMER, M. Influence of processing methods on starch properties. **Journals of Macromolecular Science Physics B38**, n. 4, p. 461-469, 1999.

CARMICHAEL, F. J. L. , BIRO, G. P. , AGENSKY, L. Use of the blood substitute Hemolink in CABG surgery. **Anesthesia and Analgesia** ,v. 90, SCA11, 2000.

CHEETHAM, N. W. H., TAO, L. P. The effects of amylose content on the molecular size of amylose, and on the distribution of amylopectin chain length in maize starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, 251-261, 1997.

CHEN, Y., FRIGANT, C., RINAUDO, M. Molecular characterization of starch by SEC: dependance of the performances on the amylopectin content. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 73-78, 1997.

CHENG, D. C. H. Safety and efficacy of o-raffinose cross-linked human hemoglobin (Hemolink) in cardiac surgery. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 48, S41-S48, 2001.

CHENG, D. C. H., MAZER, R. E., CARMICHAEL, F. J.L. The hemodynamic effects of the red cell substitute Hemolink (o-raffinose cross-linked human hemoglobin) on vital signs in patients undergoing CABG surgery. **Anesthesiology**, v.93, A180, 2000.

CISTERNAS, J. R., VARGA, J., MONTE, O. Fundamentos de Bioquímica Experimental, 2ª ed., Atheneu, São Paulo-SP, 2001.

COULTATE, T. P. Food – The Chemistry of its components. 3 Ed. London, Royal Society of Chemistry Paperbacks, p. 30-53, 1996.

CURÁ, J. A., JANSSON, P. E., KRISMAN, C. R. Amylose is not strictly linear. **Starch/Stärke** v. 47, p. 207-209, 1995.

D'AGNILLO, F., ALAYASH, A. I. Site-specific modifications and toxicity substitutes. The case of diaspirin cross-linked hemoglobin. **Advanced Drug Delivery**, v. 40, p. 199-212, 2000.

DOANE, W. M., SWANSON, C., FANTA, G. Emerging polymeric materials based on starch. In: Rowell, R. M., Schietz, T. P., Narayan, R. Emerging technologies for materials and chemicals from biomass. Washington, American Chemical Society, 1992. p.469. (ACS Symposium Series 476).

EIKE, J. H., PALMER, A. F. Effect of NaBH₄ concentration and reaction time on physical properties of glutaraldehyde-polymerized hemoglobin. **Biotechnology Program**, v. 20, p. 946-952, 2004.

ELIAS, H. Macromolecules 1-Structure and properties, Plenum Press, New York, p. 343-352, 1977.

Elomaa, M; Asplund, T.; Soininen, P.; Laatikainen, R.; Peltonen, S.; Hyvärinen, S.; Urtti, A. Determination of the degree of substitution of acetylated starch by hydrolysis, ¹H NMR and TGA/IR. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 261-267, 2004.

FEOLA, M., SIMONI, J., CANIZARO, P. C. Quality Control Of Hemoglobin Solutions. 1. The Purity of Hemoglobin Before Modification. 1991.

FISCHER, S. R., BONE, H. G. HARADA, M., Jourdain, M., Traber, D. L. Nitric oxide scavengers in sepsis. **Sepsis**, v. 1, p. 135-143, 1998.

FISHMAN, M. L., HOAGLANG, P. D. Characterization of starches dissolved in water by microwave-heating in a high-pressure vessel. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, p. 441-460, 1985.

FRONTICELLI, C., SATO, T., ORTH, C., BUCCI E. Bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin-based oxygen carriers: crosslinking with bis (2,3-dibromosalicyl) fumarate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 874 p. 76-81, 1986.

GERNAT, C., RADOSTA, S., ANGER, H., DAMASCHUN, G. Crystalline parts of three different conformations detected in native and enzymatically degraded starches. **Starch**, v. 45, 309-314, 1993.

GOODNOUGH, L. T., SCOTT, M. G., MONK, T. G. Oxygen carriers as blood substitutes: past, present and futures. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v. 357, p. 89-100, 1998.

GOULD, S. A., MOORE, E. E., HOYT, D. B., BURCH, J. M., HAENEL, J. B., GARCIA, J., DEWOSKIN, R., MOSS, G. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. **Journal of The American College of Surgeons**, v. 187, p. 113-120, 1998.

GOULD, S. A., SEHGAL, L. R., SEHGAL, H. L., MOSS, G. S. The development of hemoglobin solutions as red cell substitutes: hemoglobin solutions. **Transfusion Science**, v. 16, p. 5-17, 1995.

HOUSTON, F., FOSTER, J. D., CHONG, A. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. **Lancet**, v. 356, p. 999-1000, 2000.

HSIA, J.C. "Pasteurizable, freeze-driable hemoglobin-based blood substitute". **US Patent** No. 4.857.636, 1989.

HU, T., SU, Z. A solid phase adsorption method for preparation of bovine serum albumin-bovine hemoglobin conjugate. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 267-275, 2002.

HU, T., SU, Z. Preparation of well-defined bovine polyhemoglobin based on dimethyl adipimidate and glutaraldehyde cross-linkage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 293, p. 958-961, 2003.

HULLEMAN, S. H. D., JANSSEN, F. H. P., FEIL, H. The rule of water during plasticization of native starches. **Polymer**, v. 39, n. 10, p. 2043-2048, 1998.

HULLEMAN, S. H. D., KABISVAART, M. G., JANSSEN, F. H. P., FEIL, H., VLIEGENTHART, J. F. G. Origins of B-type crystallinity in glycerol plasticized, compression-molded potato starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 351-360, 1999.

JAROWENKO, W. STARCH, IN: MARK H. F., GAYLORD, N. G. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**, John Willey & Sons, Inc., New York, 1971, v. 2, p. 767-862.

JOHNSON JL, MOORE EE, OFFNER P. J., PARTRICK, D. A., TAMURA., D. Y., ZALLEN, G., SILLIMAN, C. C. Resuscitation with a blood substitute abrogates pathologic postinjury neutrophil cytotoxic function. **Journal of Trauma**, v. 50, p. 449-456, 2001.

JOHNSON, J. L., MOORE, E. E., OFFNER, P. J., HAENEL, J. B., HIDES, G. A., TAMURA, D.Y. Resuscitation of the injured patient with polymerized stroma-free hemoglobin does not produce systemic or pulmonary hypertension. **The American Journal of Surgery**,v. 176, p. 612-617, 1998.

KENNEDY, J. F., CABRAL, J. M. S., SÁ-CORREIA, J., WHITE, C. A. Starch biomass: a chemical feedstock for enzyme and fermentation processes. In: GALLIARD, T. Critical Reports on Applied Chemistry. v. 13: Starch: Properties and Potentials. Great Britain, Jonh Wiley & Sons, 1987.

KERR, R. W. Chemistry and industry os starch. 2^o ed. New York, Academic Pess Inc., p. 718, 1950.

KIKUGAWA, K., SASAHARA, T., SASAKI, T., Factors influencing the autooxidation of hemoglobin A, **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, 1382-1389, 1981.

KIM, H. W., GREENBURG, A. G. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: A select review and current status. **Artificial Organs**, v. 28, p. 813-828, 2004.

KRIGBAUM, W.; WALL, F. Viscosity of binary polymer mixtures. **Journal of Polymer Science**, v. 5, p. 505-514, 1949.

KRUGER, L., LACOURSE, N. Starch based adhesives. In: Skeist, I. Handbook of adhesives. 3^o ed. New York, Reinhold V. N., 1990. v.8, p. 153.

LAIGNEL, B.; BLIARD, C.; MASSIOT, G.; NUZILLARD, J.M. Proton NMR spectroscopy assignment of D-glucose residues in highly acetylated starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 298, p. 251-260, 1997.

LAMURAGLIA, G. M., O'HARA, P. J., BAKER, W. H. NASLUND, T. C., NORRIS, E.J., LI, J., VANDERMEERSCH, E. The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution. **Journal of Vascular Surgery**, v. 31, p. 299-308, 2000.

LE BAIL, P., BIZOT, H., PONTOIRE, B., BULÉON, A. Polymorphic transitions of amylose-ethanol crystalline complexes induced by moisture exchanges. **Starch/ Stärke**, v. 47, p. 229-232, 1995.

LEHNINGER, A. L. Princípios de Bioquímica, traduzido por W.R. Lodi & A.A. Simões, Savier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, 1993.

LEVY, J. H., GOODNOUGH, L. T., GREILICH, P. E., PARR, G. V .S., STEWART, R. W.; GRATZ, I., WAHR, J., WILLIAMS, J., COMUNALE, M. E., DOBLAR, D., SILVARY, G., COHEN, M., JAHR, J. S., VLAHAKES, G. J. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for hallogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: Result of a randomized, double-blind trial. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 124, p. 35-42, 2002.

LINBERG, R., CONOVER, C. D., SHUM, K. L., SHORR, R. G. L. Hemoglobin based oxygen carriers: How much methemoglobin is too much?. **Artificial Cells, Blood Substitutes, Immobilization Biotechnology**, v. 26, p. 133-148, 1998.

LOURDIN, D., COIGNARD, L., BIZOT, H., COLONNA, P. Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. **Polymer**, v. 38, n. 21, p. 5401-5406, 1997.

Lundblad, R. L. Chemical reagents for protein modification, CRC Press, Boca Ration, 1991.

MEYER, L. H. **Food chemistry**. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1960. Cap. 3: Carbohydrates.

MOORE, E. E. Blood substitutes: The future is now. **Journal of American College of Surgeons**, v. 196, p. 1-17, 2003.

MOORE, F.A., MOORE, E. E., SAUAIA, A. Blood transfusion: an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. **Archives of Surgery**, v. 132, p. 620-625, 1996

NAKAI, K., MATSUDA, N., OHTA, T., AMANO, M., TAKAHASHI, T. A., SAKUMA, I., KITABATAKE, A., ITO, S., NAKAZATO, Y., SEKIGUCHI, S. Lysophosphatidylcholine, a Component of Stromal Phospholipids, as a Candidate Vasoconstrictive Factor in Stroma-Free Hemoglobin. *Artificial Organs*. Blackwell Scientific Publications, Inc., Boston, 18 (3): 198-205, 1994.

NILSSON, G. S., BERGQUIST, K. E., NILSSON, U., GORTON, L. Determination of the degree of branching in normal and amylopectin type potato starch with ¹H-NMR spectroscopy. **Starch/ Stärke**, v. 48, p. 352-357, 1996.

ONG, M. H., HJUMEOL, K., TOKARCZUC, P. F., BLANSHARD, J. M. V., HARDING, S. E. **Carbohydrate Research**, v. 260, p. 99-107, 1994.

OSER, BL., **Hawk's Physiological Chemistry**, McGraw-Hill Book Company, New York 1965.

PALAPARTHY, R., WANG, H. S., GULATI, A. Current aspects in pharmacology of modified hemoglobins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 40, p. 185-198, 2000.

PALMER, A. F., EIKE, J.H., Oxidized mono-, di, tri, and polysaccharides as potential hemoglobin cross-linking reagents for the synthesis of high oxygen affinity artificial blood substitutes, **Biotechnology Progress**, v. 20, 953-962, 2004.

PALMER, A. F., PATTON, J. N., Photopolymerization of bovine hemoglobin entrapped nanoscale hydrogel particles within liposomal reactors for use as an artificial blood substitute, **Biomacromolecules**, v.6, 414 - 424, 2005.

PLIURA, D., WONG, L.T., ER, S.S. "Selective crosslinking of hemoglobin by oxidized, ring-opened saccharides". **US Patent** No. 5.532.353, 1996.

POUTANEN, K.; FORSSEL, P. Modification of starch properties with plasticizers. **Trend in Polymer Science**, v. 4, p. 128-132, 1996.

PRIVALLE, C., TALARICO, T., KENG, T., DEANGELO, J. Pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene: a nitric oxide scavenger with antioxidant activity for the treatment of nitric oxide-induced shock. **Free Radical Biology & Medicine** v. 28, 1507-1517, 2000.

RABELO, M. Aditivação de polímeros, p. 242, São Paulo, Artliber Editora Ltda., 2000.

RAW, I., FREEDMAN, A., MENUCCI, L., BIOQUÍMICA: Fundamentos para as Ciências Biomédicas, v. 1, editora McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, 1981.

RIESS, J. G. Oxygen carriers ("Blood substitutes") – raison d'être, chemistry, and some physiology. **Chemistry Reviews**, v. 10, p. 2797-2919, 2001.

RINDLAV, A., HULLEMAN, S. H. D., GATENHOLM, P. Formation of starch films with varying crystallinity. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 25-30, 1997.

RINDLAV-WESTLING, A., SATADIND, M., HERMANSSON, A. M., GATENHOLM, P. Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 217-224, 1998.

RING, S. G., I'ANSON, K. J., MORRIS, V. J. Static and dynamic light scattering studies of amylose. **Macromolecules**, v. 18, p. 182-188, 1985.

ROGER, P., COLONNA, P. **International journal of Biological macromolecules**, v. 9, p. 51-57, 1996.

SANDERS, K. E., ACKERS, G. S., LIGOR, S. Engineering and design of blood substitutes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, p. 534-540, 1996.

SHOEMARKER, S. A., GERBER, M. J., EVANS, G. L. Artificial Cells Blood Substitutes Immobil. **Biotechnology**, 22, 457-465, 1994.

SHOGREN, R. L., FANTA, G. F., DOANE, W.M. Development of starch based plastics – a reexamination of selected polymer systems in historical perspective. **Starch**, v. 45, p. 276-280, 1993.

SILVA JÚNIOR, J. G. Eletroforese de proteínas: guia teórico e prático. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2001.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C., tradução de Alencastro, R.B., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, 1994a, pp. 205.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C., tradução de Alencastro, R.B., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, 1994b, pp. 169.

SOUZA, M. H. L., ELIAS, D. O. Fundamentos da circulação extracorpórea v. 1. Centro Editorial Alta Rio, Rio de Janeiro – RJ, 1995.

ST-PIERRE, B. D., FAVIS, B. B., RAMSAY, B. A., RAMSAY Y. J. A., VERHOOGT, H. Processing and characterization of thermoplastic starch/polyethylene blends. **Polymer**, v. 38, n. 3, p. 647-655, 1997.

STRYER, L. Bioquímica 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

TAKEDA, Y., HIZURI, S., TAKEDA, C., SUZUKI, A. Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules. **Carbohydrate Research**, v. 165, p. 139-145, 1987.

TALARICO, T. L., GUISE, K. J., STACEY, C. J. Chemical characterization of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1476, p. 53-65, 1998.

THURN, A., BURCHARD, W. Heterogeneity in branching of amylopectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, p. 441-460, 1985.

- VAMVAKAS E. C., TASWELL H. F. Epidemiology of blood transfusion. **Transfusion**, v. 34, p. 464-470, 1994.
- VAN OENE, K., CRAGG, H. Shear dependence of reduced viscosity-concentration slope constant. **Journal of Polymer Science**, v. 57, p. 209-225. 1962.
- VAN SOEST, J. J. G., HULLEMAN, S. H. D., WIT, D., VLIEGENTHART, J. F. G. Crystallinity in starch bioplastics. **Industrial Crops and Products**, v. 5, p. 11-22, 1990.
- VAN SOEST, J. J. G. Essers, P. Influence of amylose-amylopectin ratio on properties of extruded starch plastics sheets. **J. M. S. Pure Appl. Chem.**, A34-39, p. 1665-1689, 1997.
- VAN SOEST, J. J. G., BORGER, D. B. Structure and properties of compression-molded thermoplastic starch materials from normal and high-amylose maize starches. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 64, n. 4, p. 631-644, 1997.
- VAN SOEST, J. J. G., VLIEGENTHART, J. F. G. Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties. **Tibtech**, v. 15, p. 208-213, 1997.
- VUYLSTEKE, A. Artificial blood substitutes - benefits and risks. SCA Annual Meeting, p.144-147, 2001.
- WALL, M. H., PRIELIPP, R. C. Transfusion in the operating room and the intensive care unit: current practice and future directions. **International Anesthesiology Clinic**, v. 38, p. 149-169, 2000.
- WHISTLER, R. L., DANIEL, J.R. STARCH. IN: KIRK, R. E. Encyclopedia of chemical technology. New York, John Wiley, v. 21, p. 492-507, 1982.
- WILLET, J. L., JASBERG, B. K., SWANSON, C. L. Melt rheology of thermoplastic starch. In: FISHMAN, M. L., FRIEDMAN, R. B., HUANG, S. J. Polymers from agricultural co products. Washington, American Chemical Society, p. 51-68, 1994.

WILSON, R., CODE, C., RICKETTS, M. N. Risk of acquiring Creutzfeldt-Jacob disease from blood transfusions: systematic review of case-control studies. **British Medicine Journal**, v. 321, p. 17-19, 2000.

WINSLOW, R. M. Blood substitutes. **Advanced Drug Delivey Review**, v. 40, 131-142, 2000.

Wong, S.S. Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press, Boca Raton, 1991.

WURZBURG, O. B. **Modified starches: properties and uses**. New Jersey, 1986. p. 17-40.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)