



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Ana Angélica Mathias Macêdo**

**FILMES DE COLÁGENO – POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO MATRIZES  
COM PROPRIEDADES ANTITROMBOGÊNICAS:  
Preparação e Caracterização**

**Fortaleza – Ce  
2006**

**Ana Angélica Mathias Macêdo**

**FILMES DE COLÁGENO – POLISSACARÍDEO SULFATADO  
COMO MATRIZES COM PROPRIEDADES ANTITROMBOGÊNICAS:  
Preparação e Caracterização**

**Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências.**

**Orientador: Dr. Renato de Azevedo Moreira**

**Co-Orientadora: Dra. Sônia Duarte Figueiró**

**Fortaleza – CE  
2006**

M 119f

Macêdo, Ana Angélica Mathias

Filmes de colágeno-polissacarídeo sulfatado como matrizes com propriedades antitrombogênicas: Preparação e Caracterização / Ana Angélica Mathias Macêdo.

77f.,il.color.enc.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

Co-Orientadora: Dra. Sônia Duarte Figueiró

Área de concentração: Bioquímica

1.Colágeno 2. Polissacarídeo sulfatado 3. Próteses vasculares 4. Matrizes heparinizadas I. Moreira, Renato de Azevedo; Figueiró, Sônia Duarte II. Universidade Federal do Ceará, Pós-graduação em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

CDU 574.962.9

**Ana Angélica Mathias Macêdo**

**FILMES DE COLÁGENO – POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO MATRIZES  
COM PROPRIEDADES ANTITROMBOGÊNICAS:  
Preparação e Caracterização**

**Fortaleza, 03 de março de 2006**

---

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira (Orientador)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC

---

Dra. Sônia Duarte Figueiró (Co-Orientadora)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC

---

Dr. André Coelho Silva  
Pesquisador CNPq

---

Prof. Dr. António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente  
Departamento de Engenharia Biológica  
Universidade do Minho – Braga, Portugal

**Ao meu esposo,**

**Laécio Macêdo**

## **AGRADECIMENTOS**

**Esta dissertação foi possível devido à amizade, ao apoio, ao auxílio, ao carinho, à colaboração, à compreensão, ao estímulo e à solicitude dos que abaixo cito; somente cada um individualmente sabe a forma, bem especial, com que se dispôs para fazer com este trabalho ficasse o melhor possível.**

Ao Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira,

À Profa. Dra. Sônia Duarte Figueiró,

Ao Prof. Dr. Júlio César Góes Ferreira,

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Bezerra Sombra,

Ao Prof. Dr. Frederico José Beserra,

À Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas,

À Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo,

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente,

Ao Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos,

À Profa. Dra. Olga Nunes da Costa Medeiros,

À Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães ,

Ao Dr. Gentil Claudino Galiza Neto,

À Dra. Eunice Bôbo de Carvalho,

Ao Dr. Marcos Antônio Martins da Silva,

À Tereza Lima Rocha,

Ao Erivaldo Cesídio de Holanda,

A Luis Alves Pitu,

A Rozelúcia Barroso de Almeida,

Aos Coordenadores do curso de pós-graduação em bioquímica: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos e Prof. Dr. Joaquim Albenísio da Silveira,

Aos Profs. Drs. Benildo, Denise, Dirce, Enéas, Fernando, Francisco Campos, Joaquim Enéas, Márcio, Norma, Raquel, Tadeu,

Aos Amigos: Edilberto, Gil, Márcio, Maria, Marisa,

À Amiga Renata Chastinet Braga,

Ao Amigo Ricardo Sávio Teixeira Moretzsohn,

Ao Doador de sangue desconhecido,

Aos Amigos da Pós-Graduação em Bioquímica, em especial, Carlos Eduardo, Darcy, Eduardo, Fabíola, Glaís, Hélio, Jandenilson, João Paulo, Juan Carlos, Karoline, Luciana, Márcio, Sérgio ,

Aos Amigos da Física: Aíla, Ana Fabíola, Aretha, Cauby, Cléber, Francisca, Henrique, Marcelo, Nivaldo, Pierre, Rinaldo, Roberval, José Luis,

Aos Amigos que fazem parte do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados: Profa. Dra. Ana Cecília, Alexandre, Álvaro, André, Alexsandra, Cláudia, Clébia, Daniele, Ed Carlos, Fábila, Gabriele, Gil, Glenda, Kelton, Lia, Marcus, Marcelo, Mônica do Valle, Morgana, Paulo Egildo, Ossian, Patrícia, Renata, Rogildo, Rosa e Wagner,

Aos Meus Tios: Ilnah Matias, Rebeca Mathias, Lucivanda Matias, Vera Monteiro, Paulo Monteiro, Vera Braga,

Ao Meu ESPOSO, Laécio Nobre de Macêdo,

À minha MÃE, Maria Vimá Fernandes Matias e

À DEUS

**A cada um de vocês individualmente, o meu MUITO OBRIGADA, principalmente por saber que são amigos fiéis e leais.**

**E também, contei com o apoio das seguintes instituições:**

Laboratório de Telecomunicações e Engenharia e Ciência de Materiais (LOCEM) do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará,

Laboratório de Carnes do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará,

Laboratório de Análise Estrutural Pós-Graduação de Ciências e Engenharia de materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Ceará,

Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP),

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará,

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e

Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

“Num mundo como o nosso, em que progredem ciência e suas aplicações tecnológicas, cada dia mais, não se pode admitir que o homem se satisfaça durante toda a vida com o que aprendeu durante poucos anos, numa época em que estava profundamente imaturo. Deve informar-se, documentar-se, aperfeiçoar a sua destreza, de maneira a se tornar mestre da sua práxis. O domínio de uma profissão não exclui o seu aperfeiçoamento. Ao contrário, será mestre quem continuar aprendendo.”

Pierre Furter



## RESUMO

Este trabalho aborda sobre o preparo e a caracterização de filmes de colágeno-polissacarídeo sulfatado e sua aplicação para revestimento de próteses vasculares. Os filmes foram obtidos a partir da mistura de solução de colágeno e polissacarídeo sulfatado, nas concentrações 0, 5, 10, 20 e 25 % do polissacarídeo. As soluções de colágeno-polissacarídeo sulfatado foram formatadas em moldes de acrílico em condições de baixa umidade e temperatura. A caracterização físico-química dos filmes de colágeno-polissacarídeo sulfatado foi estudada por espectrometria no infravermelho que mostraram bandas típicas do colágeno e bandas típicas do polissacarídeo sulfatado; a análise térmica por DSC mostra que a integridade estrutural do colágeno foi preservada no processo de extração e que a adição do polissacarídeo nas amostras não diminuiu a estabilidade térmica do colágeno tendo sido maior na concentração de 20 %. Na análise térmica por DTG, a adição do polissacarídeo causa um pequeno decréscimo da estabilidade de degradação térmica e ao adicionarmos 5 % do polissacarídeo sulfatado ao colágeno, ocorre uma redução em sua estabilidade, porém, a partir daí, nas concentrações 10, 20 e 25 %, a estabilidade de degradação térmica do filme vai aumentando. Na espectroscopia de impedância, os resultados estão associados, possivelmente, a interações entre as macromoléculas. A compatibilidade sangüínea foi analisada por adesão de plaquetas e os resultados mostraram que os filmes possuem hemocompatibilidade e propriedades antitrombogênicas.

## **ABSTRACT**

This work reports the preparation and characterization of collagen-sulfated polysaccharide films and applications in coating of cardiovascular prostheses. The films were prepared by adding the sulfated polysaccharide solution on soluble collagen (0, 5, 10, 20 and 25 %). The blends of collagen-sulfated polysaccharide were casted in acrylic molds, and dried at low temperature. The physico-chemical properties of collagen-sulfated polysaccharide films, were studied using infrared spectroscopy that showed absorptions typical of collagen and sulphated polysaccharide; the thermal analysis (DSC) showed that the structural integrity of collagen was unmodified during the extraction process and the polysaccharide present in the samples did not decrease the thermal stability of the collagen, which was higher for the concentrations of 20 %. In the thermal analysis (DTG), the addition of the polysaccharide caused a small decrease of the stability of thermal degradation and when was adding 5 % of the sulfated polysaccharide to the collagen, a reduction in its stability occurs, however, in the concentrations of 10, 20 and 25 %, the stability of thermal degradation of the film increased. In the impedance spectroscopy, the results are associated possibly, to the interactions between the macromolecules. The blood compatibility was analyzed by platelet adhesion and the results showed that the films possess hemocompatibility and antitrombogenic properties.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xiv
<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b>	xv
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA	2
1.2 COLÁGENO	6
1.3 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	11
1.4 SUPERFÍCIES HEMOCOMPATÍVEIS	16
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	19
<b>3 OBJETIVOS</b>	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	21
4.1 MATERIAIS	21
4.1.1 Colágeno	21
4.1.2 Polissacarídeo em solução	21
4.1.3 Polissacarídeo sulfatado de <i>Gracilaria cornea</i>	21
4.2 MÉTODOS	21
4.2.1 Preparação do colágeno solúvel	21
4.2.2 Polissacarídeo em solução	22
4.2.3 Filmes de colágeno-polissacarídeo sulfatado (COLGC)	22
4.2.4 Plasma rico em plaquetas	22
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	23
4.3.1 Espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR)	23
4.3.2 Análise térmica	23
4.3.3 Espectroscopia de impedância	23
4.3.4 Ensaio de adesão de plaquetas	24
4.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	24
4.3.6 Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA)	24
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	25
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO (GC)	25
5.1.1 Espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR)	25
5.1.2 Compatibilidade sanguínea (Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA))	26
5.1.3 Análise térmica	28

5.2	CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO (COL)	30
5.2.1	Caracterização do Colágeno Solúvel em pH 3	30
5.2.1.1.	Viscosidade	30
5.2.2	Caracterização do filme de colágeno (COL)	32
5.2.2.1	Espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR)	32
5.2.2.2	Análise térmica	33
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO FILME DE COLÁGENO-POLISSACARÍDEO SULFATADO (COLGC)	35
5.3.1	Espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR)	35
5.3.2	Análise térmica	38
5.3.3	Espectroscopia de impedância	44
5.3.4	Adesão de plaquetas	50
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÀGINA
1	Vaso sangüíneo	2
2	Formação do coágulo	3
3	Cascata da coagulação	4
4	Estrutura química do colágeno	9
5	Estrutura química da Agarana e da Carragenana	13
6	Estrutura química do dissacarídeo obtido da <i>Gracilaria cornea</i>	14
7	Estrutura do dissacarídeo obtido da Heparina	16
8	Espectro no infravermelho (ATR FTIR) do polissacarídeo sulfatado de <i>Gracilaria cornea</i>	25
9	Ensaio de TTPA para o polissacarídeo sulfatado em comparação com a heparina, em função da concentração	27
10	Termograma do polissacarídeo sulfatado <i>Gracilaria cornea</i>	28
11	Curva de estabilidade térmica por DTG do polissacarídeo de <i>Gracilaria cornea</i> (GC)	29
12	Efeito do gradiente de velocidade sobre a viscosidade do colágeno solúvel em pH 3	31
13	Espectro no infravermelho por reflectância total atenuada do filme de colágeno aniônico	32
14	Termograma por DSC do filme de colágeno aniônico	34
15	Curva de estabilidade térmica por DTG do filme de colágeno aniônico	34
16	Espectro no infravermelho do filme colágeno - polissacarídeo sulfatado (COLGC 5)	36
17	Espectro no infravermelho do filme COLGC 10	36
18	Espectro no infravermelho do filme COLGC 20	37
19	Espectro no infravermelho do filme COLGC 25	37
20	Termogramas por DSC dos filmes de colágeno e colágeno – polissacarídeo sulfatado	38

21	Energia de transição térmica dos filmes de COL e COLGC 5, 10, 20 e 25 em função da concentração do polissacarídeo	39
22	Curva de estabilidade térmica por DTG do COLGC 20	41
23	Curva de estabilidade térmica por DTG do COLGC 20	41
24	Curva de estabilidade térmica por DTG do COLGC 20	42
25	Curva de estabilidade térmica por DTG do COLGC 25	42
26	Curva de estabilidade térmica por TG do polissacarídeo sulfatado e dos filmes de colágeno e de colágeno – polissacarídeo sulfatado	44
27	Circuito RC em paralelo	46
28	Diagrama de impedância ou gráfico de Cole-Cole	47
29	Diagrama de impedância dos filmes de colágeno e de colágeno – polissacarídeo sulfatado	48
30	Circuito equivalente a um dielétrico	49
31	Diagrama de impedância	49
32	Micrografia do filme de COL	51
33	Micrografia do filme de COLGC 5	52
34	Micrografia do filme de COLGC 10	52
35	Micrografia do filme de COLGC 20	53
36	Micrografia do filme de COLGC 25	53

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Fatores da coagulação e nomenclatura	5
<b>2</b>	Composição e distribuição dos principais tipos de colágeno	7
<b>3</b>	Bandas de absorção no espectro de infravermelho com as vibrações correspondentes para polissacarídeos sulfatados de <i>Gracilaria cornea</i>	26
<b>4</b>	Principais bandas no espectro de infravermelho com as vibrações correspondentes para o colágeno	33
<b>5</b>	Temperaturas referentes às transições térmicas por DSC do filme de colágeno e de colágeno – polissacarídeo sulfatado	39
<b>6</b>	Temperaturas referentes às energias de transições térmicas por DSC.	40
<b>7</b>	Temperaturas referentes inflexão de degradação máxima das curvas de estabilidade térmica por DTG do polissacarídeo sulfatado e dos filmes de colágeno e de colágeno – polissacarídeo sulfatado	43
<b>8</b>	Parâmetros dielétricos dos filmes de colágeno e colágeno – polissacarídeo sulfatado	50

**LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES**

ATR	Reflectância total atenuada
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho por reflectância total atenuada com transformada de Fourier
COL	Colágeno
COLGC	Filmes de colágeno – polissacarídeo sulfatado
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Derivada da termogravimetria
GC	Polissacarídeo sulfatado de <i>Gracilaria cornea</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PRP	Plasma rico em plaquetas
TG	Termogravimetria
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativado



## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de óbito no mundo e o implante vascular é um dos maiores desafios terapêuticos dentro da cirurgia vascular, pois tem sido usado para solucionar diversos problemas, desde a simples sutura na interconexão de dois vasos, à restauração de vaso no aneurisma ou substituição total de grandes artérias.

Em próteses para vasos de pequeno diâmetro há a complicação da formação de trombos, visto que quando uma superfície artificial entra em contato com o sangue, ocorre a formação de trombos. Numerosos estudos mostram que o sucesso dos implantes vasculares depende da modificação adequada na superfície do polímero, porque as superfícies indutoras de trombose estão entre os principais problemas no desenvolvimento desses biomateriais. O crescimento de células endoteliais tem sido proposto para melhorar a compatibilidade sangüínea em válvulas de pequeno calibre, em razão das características antitrombogênicas da monocamada dos vasos sangüíneos (WISSINK *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de materiais hemocompatíveis tem sido lento devido à complicada interação do sangue com a superfície do material. O tipo de superfície de uma prótese é um fator que afeta a biocompatibilidade sangüínea.

Atualmente, o maior problema das próteses vasculares está relacionado à formação de trombos, aderentes, ou geradores de embolia, na superfície artificial do vaso, em contato com o sangue. Todavia, a modificação de superfície é um meio efetivo para melhorar a hemocompatibilidade, mantendo as propriedades do biomaterial (JIANG *et al.*, 2004).

## 1. 1. COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA

Os vasos sangüíneos são constituídos por três camadas distintas: a **túnica íntima**, que apresenta uma camada de células endoteliais, que revestem a superfície interna do vaso, e está em contato direto com o sangue; a **túnica média** formada por fibras colagênicas, células musculares lisas e fibroblastos e a **túnica adventícia**, que consiste, principalmente, de tecido conjuntivo com fibras colagênicas (colágeno tipo I e elastina) (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; VERRASTRO *et al.*, 2002).

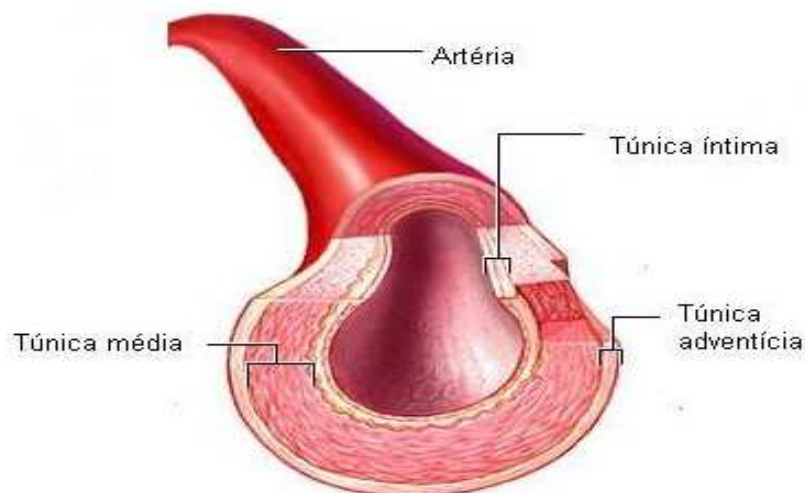


FIGURA 1. Vaso sangüíneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995)

A coagulação sangüínea (VERRASTRO *et al.*, 2002) é um fenômeno natural que ocorre quando um vaso sangüíneo sofre lesão em sua estrutura e envolve proteínas plasmáticas, lipídeos e íons presentes no sangue e nos tecidos circundantes, como o colágeno.

Ao se romper um vaso, ocorre a contração da musculatura lisa estimulada pela serotonina liberada pelas plaquetas. Inicialmente, acontece a agregação primária, quando as plaquetas aderem ao colágeno subjacente formando o tampão

plaquetário. Ocorre, a seguir, o processo de agregação secundária quando as plaquetas do tampão liberam adenosina difosfato (ADP), induzindo a agregação plaquetária. No processo de coagulação, as proteínas do plasma promovem interação dos fatores de coagulação (cascata de coagulação) finalizando com a formação da fibrina (Figura 2).

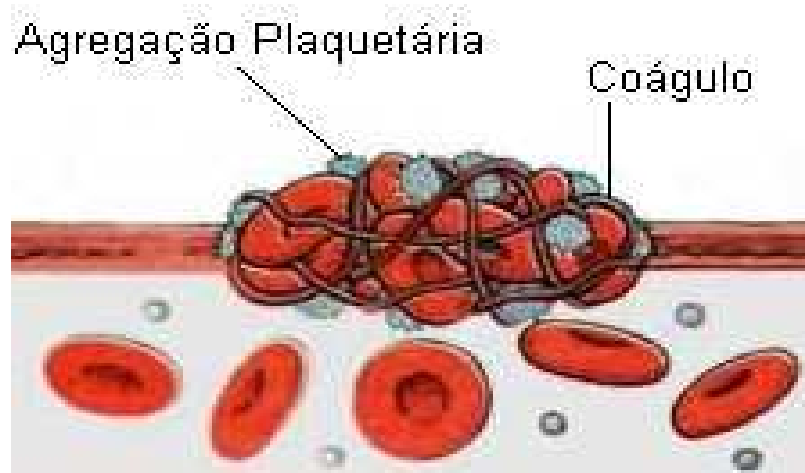


FIGURA 2. Formação do coágulo ([www.manualmerk.msd.brazil.com](http://www.manualmerk.msd.brazil.com))

A cascata de coagulação (Figura 3) inicia por duas vias diferentes: a intrínseca, onde atuam os fatores circulantes da coagulação (Tabela 1) e a extrínseca, desencadeada por ação de um fator não circulante, um fator tecidual. Posteriormente, as duas vias seguem uma etapa comum culminando com a formação da fibrina contando com a participação de vários fatores de coagulação. As vias intrínseca e extrínseca se complementam. Ambas são importantes para a coagulação *in vivo*.

A via intrínseca dá início à ativação do fator plasmático XII. Este se une à fibrila de colágeno subendotelial, que fica exposta após lesão do vaso sangüíneo. Ao se unir à fibrila de colágeno, o fator XII forma um complexo com o cininogênio e com a pré-caliceína. O fator XIIa ativa o fator XI e este, a seguir, o fator IX. O fator IXa,

atua em combinação com o fator VIII C, cálcio e fosfolídeos plaquetários, que ativam o fator X. O fator Xa combina-se com o fator V, cálcio e fosfolídeos plaquetários, formando o ativador de protrombina que ativa o fator II, o qual converte o fibrinogênio em fibrina, que é o produto final da coagulação. A fibrina formada é instável e pela ação do fator XIII, ocorre a transformação da fibrina estável e insolúvel, que mantém o coágulo resistente.

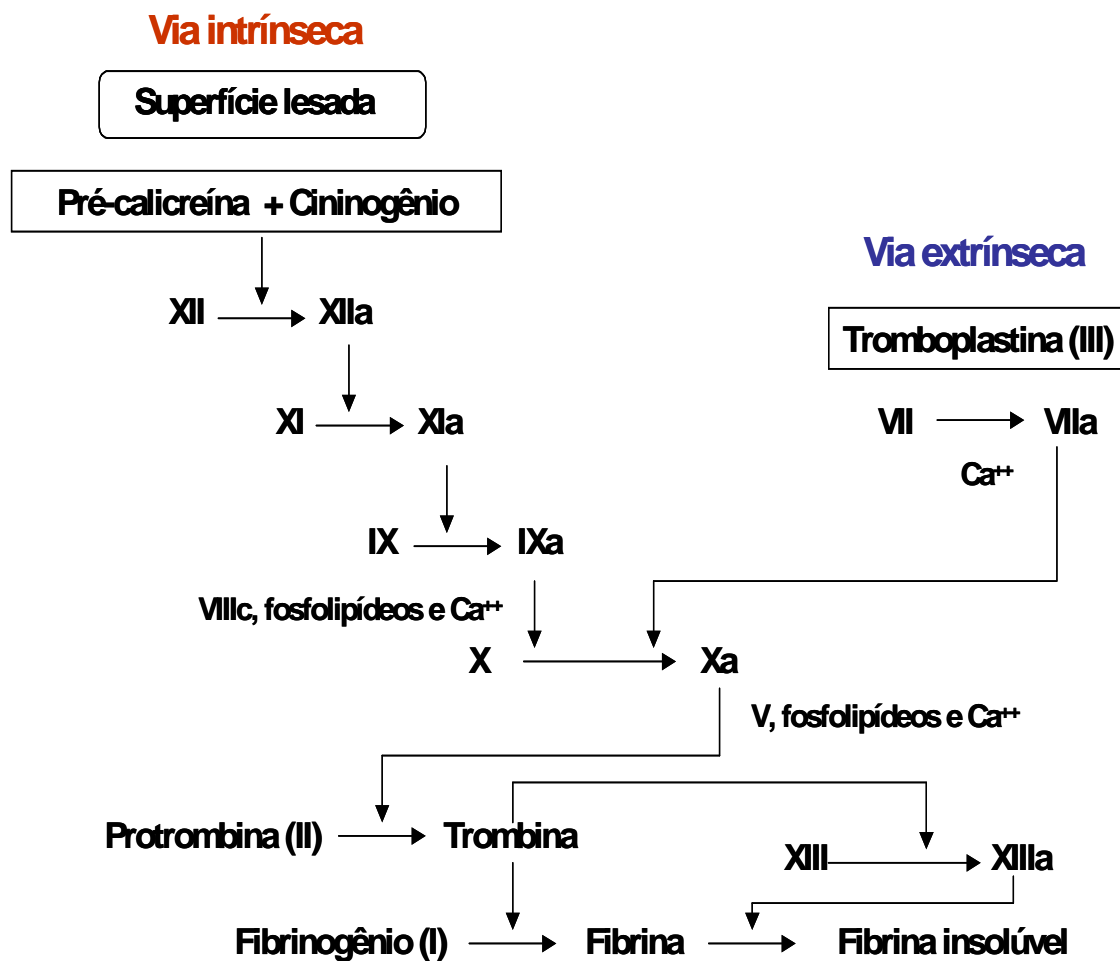


FIGURA 3. Cascata da coagulação (VERRASTRO *et al.*, 2002)

Tabela 1. Fatores da coagulação e nomenclatura (GUYTON, 1992)

Fator	Nomenclatura
<b>I</b>	Fibrinogênio
<b>II</b>	Protombina
<b>III</b>	Tromboplastina
<b>IV</b>	Cálcio
<b>V</b>	Fator lábil
<b>VII</b>	Fator estável
<b>VIII C</b>	Fator anti-hemofílico A
<b>VIII vW</b>	Fator von Willebrand
<b>IX</b>	Fator anti-hemofílico B
<b>X</b>	Fator Stuart-Prower
<b>XI</b>	Fator anti-hemofílico C
<b>XII</b>	Fator de contato
<b>XIII</b>	Fator estabilizador da fibrina
<b>Precalicroína</b>	Fator Fletcher
<b>Cinogênio</b>	Fator Fitzgerald-Williams
<b>Proteína C e S</b>	

Na via extrínseca, o fator tecidual liberado dos tecidos lesados se liga ao cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e ao fator VII e juntos ativam o fator X (Xa). A partir daí, segue a via comum, já descrita. Essa via ocorre sem a participação dos fatores XII, XI, IX e VIII.

A ação da fibrina se faz somente no local lesado, embora a quantidade de trombina gerada seja suficiente para coagular todo o sangue circulante, pois os fatores ativados são diluídos na corrente sangüínea e removidos da circulação por células do sistema retículo endotelial, por meio da fagocitose, e são neutralizados pela antitrombina III, um inibidor fisiológico da coagulação que pode se ligar à trombina e a outros fatores ativados. A heparina pode se ligar à antitrombina III, facilitando a inibição da trombina.

## 1. 2. COLÁGENO

O colágeno (VOET; VOET, 1990) é o componente principal da matriz extracelular do tecido conjuntivo de mamíferos. É uma proteína fibrosa (Figura 4) e tem por função mecânica manter a integridade estrutural dos tecidos.

Sua estrutura tem, como unidade básica molecular, o tropocolágeno, uma macromolécula linear semiflexível, que consiste de três cadeias polipeptídicas, denominadas  $\alpha$ , entrelaçadas, em sua maior parte, na conformação de uma longa hélice tripla, de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, com exceção das regiões N e C terminais ou telopeptídeos. Cada cadeia  $\alpha$  possui cerca de 1000 resíduos de aminoácidos com peso molecular em torno de 100.000 g/mol, cuja composição varia segundo a necessidade funcional do tecido. A molécula de colágeno é possível graças a uma seqüência primária peculiar, na qual o triplete (Gly-X-Y) se repete ao longo da hélice tripla, onde X e Y podem ser prolina ou hidroxiprolina, respectivamente. As cadeias do tropocolágeno formam ligações de hidrogênio entre si, através dos grupamentos NH dos resíduos de glicinas e grupos carboxílicos de um resíduo da cadeia vizinha. As hidroxilas da hidroxiprolina e das moléculas de água também participam destas ligações, o que estabiliza a hélice tripla (NIMNI; HARKNEE, 1988).

Já foram identificados 20 tipos de colágeno (Tabela 2), cada um destes, possuindo estruturas formadas por três cadeias polipeptídicas idênticas (homotriméricas) (colágeno tipo: II, III, VII, VIII e X) e com cadeias polipeptídicas diferentes (heterotriméricas) (colágeno tipo: I, IV, V, VI, IX e XI) (GELSE *et al.*, 2003).

Tabela 2. Composição e distribuição dos principais tipos de colágeno (FRIESS, 1998; GELSE *et al.*, 2003)

Tipo	Composição da cadeia	Distribuição
<b>I</b>	$(\alpha 1(I))_2 \alpha 2(I)_3$	Osso, tendão, pele, dentina e córnea
<b>II</b>	$(\alpha 1(II))_3$	Cartilagem, humor vítreo e notocorda
<b>III</b>	$(\alpha 1(III))_3$	Vaso sanguíneo, trato gastrointestinal, parede uterina e gengiva (coexiste com o colágeno tipo I )
<b>IV</b>	$(\alpha 1(IV))_2 \alpha 2(IV)$	Membrana basal
<b>V</b>	$(\alpha 1(V))_2 \alpha 2(V)(3)(V)$ ou $(\alpha 1(V))_2 \alpha 2(V)$ ou $(\alpha 1(V))_3$	Membrana placentar e ossos
<b>VI</b>	$(\alpha 1(VI)) \alpha 2(VI) \alpha 3(VI)$	Músculos do coração
<b>VII</b>	$(\alpha (VII))_3$	Pele, placenta e córnea
<b>VIII</b>	$(\alpha 1(V))_2 \alpha 2(V)(3)(V)$	Produzido pelas células endoteliais
<b>IX</b>	$(\alpha 1(VIII)) \alpha 2(VIII)$	Cartilagem
<b>X</b>	$(\alpha 1(X))_3$	Cartilagem hipertrófica
<b>XI</b>	$1\alpha 2\alpha 3\alpha 1$ ou $\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	Humor vítreo, disco intervertebral
<b>XII</b>	$(\alpha 1(XII))_3$	Ligamento periodontal bovino e tendão de embriões de frango

O colágeno tipo I é o mais abundante e estudado; é constituído por duas cadeias  $\alpha 1(I)$  e uma cadeia denominada  $\alpha 2(I)$ . As cadeias  $\alpha 1(I)$  e a cadeia  $\alpha 2(I)$  possuem 1014 resíduos que formam uma região contínua de hélice tripla. Na cadeia  $\alpha 1(I)$  as regiões dos telopeptídeos consistem de 16 resíduos N-terminais e 26 resíduos C-terminais. Na cadeia  $\alpha 2(I)$  os telopeptídeos contêm 9 resíduos N-terminais e 15 resíduos C-terminais, totalizando em 1056 resíduos na cadeia  $\alpha 1(I)$  e 1038 resíduos na cadeia  $\alpha 2(I)$ .

Em seu arranjo macromolecular, cinco moléculas de tropocolágeno se organizam lado a lado, deslocadas em 1/4 de seu comprimento em relação à molécula adjacente (Figura 4), por forças resultantes de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, no modelo conhecido como quarto alternado pentafibrilar (SMITH, 1968), para formar as microfibrilas, as menores unidades estruturais do tecido conjuntivo, que podem ser vistas em microscópio eletrônico. Essas se agregam formando as fibras que compõem a matriz colagênica dos tecidos. Durante a maturação das fibras, se estabelece no colágeno o processo de reticulação natural entre resíduos das cadeias laterais de lisinas (Lys) e hidroxilisinias (Hyl), presentes nos telopeptídeos, que são convertidos enzimaticamente em derivados aldeídicos, resultando em reticulações, por reação com grupos amino, com a formação de bases de Schiff ( $RHC=NR'$ ) envolvendo diferentes cadeias da estrutura microfibrilar, o que confere estabilidade mecânica e biológica ao tecido (ROBINS; DUCAN, 1983).

O colágeno pode ser extraído em solução aquosa, a partir de tecido conjuntivo de animais jovens, sendo possível solubilizar o colágeno de matrizes ainda não reticuladas, variando-se o pH e a concentração de sais do meio de extração. Condições variadas do pH, temperatura, presença de sais e de solventes podem alterar a temperatura de desnaturação do colágeno, que é, a temperatura



onde o colágeno perde sua integridade estrutural. O colágeno pode ser obtido sob as mais variadas formas, tais como, esponjas, membranas, filmes, pós, géis e com ampla aplicação na área biomédica (LEE *et al.*, 2001).

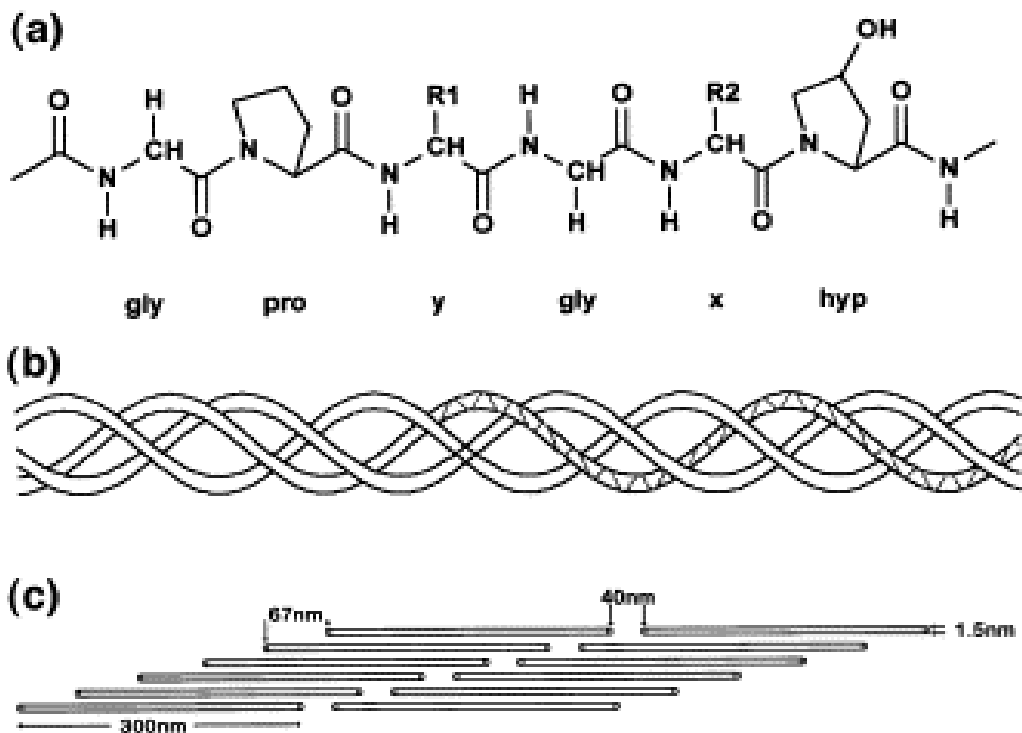


Figura 4. Estrutura química do colágeno tipo I. (a) seqüência primária de aminoácidos, (b) estrutura secundária em hélice e terciária em tripla-hélice e (c) estrutura quaternária (FRIESS, 1998).

Por suas propriedades naturais, tais como baixo índice de alergenicidade, antigenicidade e alta biocompatibilidade, o colágeno possui grande aplicação em correções plásticas, sistema de liberação de drogas, correções ósseas e em substituição de tecidos ou órgãos (LEE *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2002; FLANAGAN *et al.*, 2006). É um agente promotor de crescimento celular e possui propriedades hemostáticas, além de sua estrutura ser susceptível a modificações

químicas, o que permite o controle da biodegradabilidade e modificações em suas propriedades reológicas e propriedades dielétricas (GOISSIS *et al.*, 1999, GOISSIS *et al.*, 1998).

As oportunidades de aplicação do colágeno têm sido ampliadas pela possibilidade de associá-lo a outros materiais, e vários estudos têm sido realizados sobre as propriedades físico-químicas, dielétricas e piezoelétricas de filmes de colágeno-hidroxiapatita (SILVA *et al.*, 2001), filmes de colágeno-galactomanana (FIGUEIRÓ *et al.*, 2004), matrizes de colágeno-quitosana (WANG *et al.*, 2003), de colágeno-heparina (KIKUCHIA *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2006).

Estudos com matrizes de colágeno/quitosana foram desenvolvidos (WANG *et al.*, 2003) para criar uma melhor estratégia para a regeneração de fígado. Os resultados sugerem que esse tipo de material pode ser um bom candidato para ser usado em implantes de fígado.

O crescimento de células endoteliais é um método promissor para melhorar o desempenho de enxertos vasculares de pequeno diâmetro. Tem sido estudado colágeno reticulado com EDS (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) / NHS (N-hidroxisuccinamida) e colágeno reticulado com EDS / NHS heparinizado e observou-se que a matriz heparinizada é melhor substrato para crescimento de célula endotelial (WISSINK *et al.*, 2001).

Recentemente, YAO *et al.*, 2006 relataram sobre a imobilização de fatores de crescimento em matrizes de colágeno por ligação covalente ou por processo físico ou incorporando a heparina covalentemente e realizaram estudos sobre a liberação do fator endotelial vascular do crescimento (VEGF) em matrizes do colágeno *in vivo*.

### 1.3. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo complexo de macromoléculas com importantes atividades biológicas, tais como: atividade anticoagulante, antitrombóticas, antivirais, antibacteriana, antiinflamatória. Todavia, as atividades biológicas mais estudadas dessas moléculas são as atividades anticoagulantes e antitrombóticas (FARIAS *et al.*, 2000; SHANMUGAN; MODY, 2000, OLIVEIRA; FRANCO, 2001; CASU *et al.*, 2004; MOURÃO, 2004; PEREIRA *et al.*, 2002; CACERES *et al.*, 2000, DUARTE *et al.*, 2004, TALARICO *et al.*, 2005). São atóxicos e uma de suas características físico-química é a capacidade de formar géis, daí serem utilizados como espessantes na indústria alimentícia, além de suas aplicações na área de produtos farmacêuticos, na medicina e na biotecnologia. (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). Esses polímeros aniônicos são encontrados amplamente na natureza, tanto no reino animal, quanto no reino vegetal.

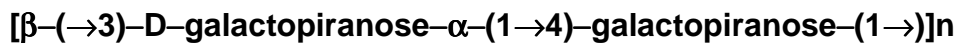
No reino vegetal, são encontrados em algas marinhas vermelhas, pardas e verdes que pertencem, respectivamente, às divisões Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta (CARVALHO; ROQUE, 2000). São encontrados também, em invertebrados marinhos (MOURÃO; PEREIRA, 1999) e plantas marinhas (AQUINO *et al.*, 2005). Entretanto, os polissacarídeos sulfatados, mais estudados, são os de algas marinhas (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005).

As algas vermelhas são filogeneticamente a mais velha divisão de macrófitas marinhos. Diferem de outras plantas, na composição de polissacarídeos, que usualmente, contém galactanas sulfatadas, como principal componente da parede

celular e matriz intercelular (USOV, 1998). Os principais polissacarídeos das algas pardas são as fucanas e das verdes, as arabinogalactanas.

A partir dos anos 60, houve vários avanços com relação à análise estrutural, caracterização de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas das galactanas sulfatadas (USOV, 1998).

As galactanas sulfatadas são constituídas de uma cadeia linear de dissacarídeos que se repetem ao longo do polímero, formados por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose (unidade A) e  $\alpha$ -galactopiranosose (unidade B). As unidades A e B se unem para formar os dímeros, através dos carbonos (C-1 e C-3) e (C-1 e C-4), respectivamente.



As unidades  $\beta$ -D-galactopiranosose podem apresentar O-metil no C-6, éster sulfato no C-2, C-4, C-6 ou acetal do ácido pirúvico [4,6-O-(1-carboxietilideno)] no C-4, C-6. A  $\alpha$ -galactopiranosose pode apresentar sulfatos no C-2, C-3 e C-6 ou estar na forma cíclica, 3,6-anidro- $\alpha$ -galactopiranosose e podem apresentar éter metílico no C-3 da galactose ou C-2 do anidrogalactose, bem como a presença de galactose em ramificações (LIAO *et al.*, 1996; USOV, 1998; DUARTE *et al.*, 2004).

Conforme a configuração enantiomérica, as galactanas podem ser classificadas em carragenanas (carragenófitas) e agaranas (agarófitas), a diferença de uma da outra é verificada na cadeia B que pode ser D na carragenana e L na agarana (Figura 05) (USOV, 1998).

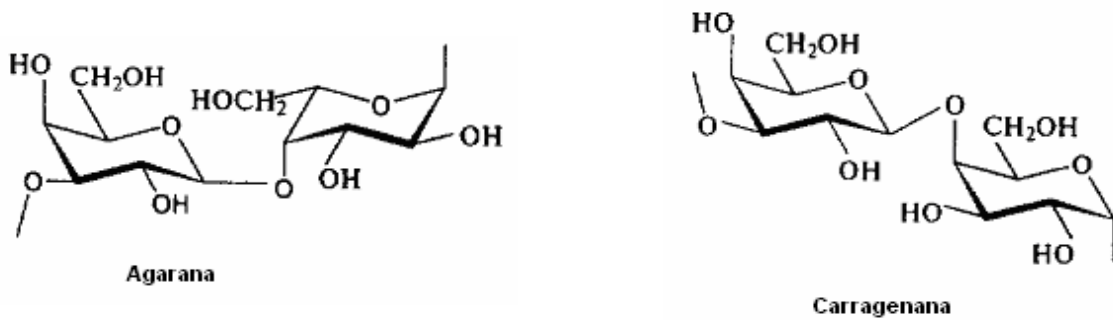


FIGURA 5. Estrutura química da Agarana e da Carragenana (USOV, 1998).

As carragenanas são compostas por dímeros  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactopirranose (unidade A) e  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactopirranose (unidade B). Conforme, a posição e a quantidade de sulfato, apresentam quatro famílias: Kappa ( $\kappa$ ), Lambda ( $\lambda$ ), Beta ( $\beta$ ) e Omega ( $\omega$ ) (RUITHER; RUDOLPH, 1997). As agaranas são formadas por  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactopirranose (unidade A) e (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-galactopirranose (unidade B) (RUITHER; RUDOLPH, 1997).

Há mais de 4000 espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) conhecidas até o momento, todavia, somente aproximadamente 70 a 80 espécies são usadas para produção industrial de géis de galactanas. Uma das espécies economicamente mais importante é a *Gracilaria* spp., pertencente da família *Gracilariaceae*. A *Gracilaria* é o mais largo gênero em Rhodophyta com cerca de 150 espécies descritas (ARMISEN, 1995). Ela é largamente distribuída em mares tropicais de águas transparentes e vivem, geralmente, fixas a rochas. (LAI; LII, 1997; FREILE-PELEGRÍN; MURANO, 2005; MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005).

Atualmente, a *Gracilaria* é uma das principais fontes de ágar. (FREILE-PELEGRIN; MURANO, 2005). O ágar é formado por dois diferentes componentes: agarose e agarpectina. A agarose é um polissacarídeo neutro com estrutura linear de unidades alternadas de D-galactose e de 3,6-anidro-L-galactose unidas por

ligações do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). A agarpectina é um polissacarídeo ácido contendo grupos éster sulfato, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico adicionados à agarobiose. A proporção de agarose e de agarpectina depende de cada espécie. O ágar é um dos agentes gelificantes mais utilizados, principalmente na indústria de alimentos, como estabilizantes (ARAKI, 1966).

O principal polissacarídeo presente no gênero *Gracilaria* representa um ágar típico com baixo teor de sulfato (2,3 – 8,9 %). Estudos com a *Gracilaria cornea*, em sua fração solúvel, mostraram um teor de sulfato de 4,8 %, cujo valor é aproximado ao encontrado na literatura em comparação a outras espécies. Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) indicaram a presença de galactose (64,6 %), 3,6-anidrogactose (24,7 %), 6-O-metil-galactose (8,5 %), glucose (1,5 %) e xilose (0,7 %) (MELO *et al.*, 2002). A Figura 6 mostra a estrutura do dissacarídeo obtido de *Gracilaria cornea*. Os grupos sulfatos ( $\text{SO}_3^-$ ), quando presentes, podem ser encontrados no C-4 da D-Galactose (PEREIRA *et al.*, 2005).

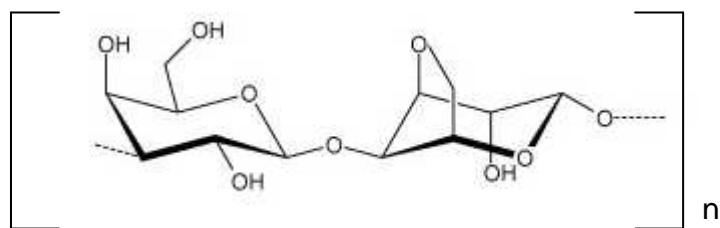


FIGURA 6. Estrutura química do dissacarídeo obtido da *Gracilaria cornea* (PEREIRA *et al.*, 2005)

As propriedades do gel são dependentes da quantidade de 3,6-anidrogactose e grupos sulfatos presentes na alga (MARINHO-SORIANO;

BOURRET, 2005). Em outras algas da *Gracilariaceae* já se constatou a presença de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e galactose em maior quantidade (PEREIRA *et al.*, 2005).

As algas marinhas são consideradas uma fonte de compostos bioativos, visto que, os polissacarídeos sulfatados extraídos delas apresentam uma série de atividades biológicas (XUE *et al.*, 2001; FARIAS, 2003).

Bansemir e colaboradores (2006) demonstraram que, dentre várias espécies estudadas, as algas marinhas de *Gracilaria cornea*, inibem o crescimento de bactérias patogênicas em peixes sendo utilizada como alternativa ao antibiótico comum usado em cultura de peixes.

Farias e colaboradores (2000), em estudos com galactanas sulfatadas de algas vermelhas da espécie *Botryocladia occidentalis* demonstraram que estas apresentam potente atividade anticoagulante, com mecanismo semelhante ao da heparina, através da inibição da trombina e fator Xa pela proteína plasmática antitrombina III e cofactor II da heparina.

A heparina (JUNQUEIRA; CARNEIRO *et al.*, 1995) é uma glucosaminoglicana sulfatada, encontrado em tecidos animais, que consiste predominantemente de resíduos alternados de D-glucoronato-2-sulfato unidos a N-sulfo-D-glucosamina-6-sulfato através de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 7).

A heparina é sintetizada e armazenada, quase exclusivamente, nas glândulas intracelulares dos mastócitos, nas paredes das artérias e é abundante no fígado e pulmão (VOET; VOET, 1990). A heparina é liberada no tecido após lesão, para prevenir a coagulação do sangue, por meio da inibição da conversão da protrombina em trombina. Sua ação antitrombótica é baseada na neutralização da trombina e do fator Xa pela antitrombina III, uma  $\alpha$ -2-globulina, que inibe as serino-proteinases (VERRASTRO *et al.*, 2002). A heparina inibe portanto, a coagulação do sangue e é

sugerido que sua liberação causada por alguma lesão do vaso, venha evitar a formação indiscriminada de coágulos.

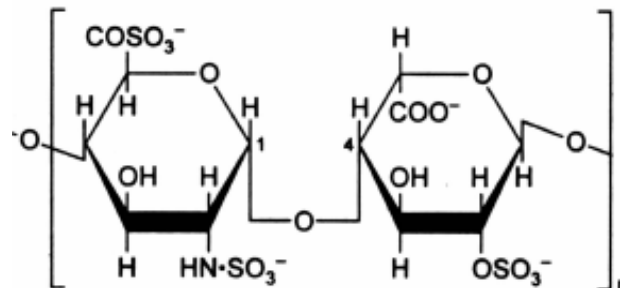


FIGURA 7. Estrutura do dissacarídeo obtido de Heparina (VOET; VOET, 1990)

#### 1.4. SUPERFÍCIES HEMOCOMPATÍVEIS

Devido à grande aplicação clínica da heparina, têm sido desenvolvidos biomateriais, como as próteses vasculares, cateteres e sistemas de circulação extracorpórea, associados à heparina, no intuito de melhorar a hemocompatibilidade. Sua ação se dá por repulsão eletrostática com os componentes do sangue carregados negativamente. Os estudos *in vitro* da hemocompatibilidade de biomateriais têm avaliado a atividade anticoagulante e adesão de plaquetas (LENS *et al.*, 1998; WENDEL *et al.*, 2000).

As abordagens descritas na literatura, em busca de materiais hemocompatíveis, têm sido a utilização de polímeros com superfícies heparinizadas, superfícies hidrofóbicas e crescimento de células endoteliais (PARK; LAKES, 1992, WISSINK *et al.*, 2000).

Tratando-se de superfícies heparinizadas, em geral, há duas formas de utilizar a heparina associada a biomateriais. Na primeira, a heparina é ocluída em um material bioestável ou biodegradável (dependendo da aplicação), através do qual



é progressivamente liberada na interface material–sangue. A eficácia desses materiais depende da duração da liberação da heparina, a qual, *in vivo*, pode variar de semanas a meses. A segunda estratégia utiliza a heparina recobrimdo a superfície do material, produzindo assim a ação anticoagulante. Através de sua ligação a antitrombina III. Esse recobrimento pode ser de três maneiras: através de uma mistura da heparina com o material utilizado na confecção da matriz; tais materiais possuem a desvantagem de haver lixiviação da heparina. Uma segunda maneira utiliza a heparina ligada à superfície do material através de interação iônica, entre grupos da heparina, carregados negativamente ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{OSO}_3^-$  e  $\text{NHSO}_3^-$ ), e a uma matriz polimérica catiônica. E a terceira maneira, consiste no recobrimento de materiais com heparina, isto diz respeito a sua imobilização à superfície do material por ligação covalente; neste caso, a imobilização da heparina consiste na ativação do material polimérico e reação posterior com os grupos funcionais da heparina ( $\text{OH}$ ,  $\text{COOH}$  e  $\text{NH}_2$ ) (MICHANETZIS, *et al.*, 2003)

Michanetzis e colaboradores (2003) compararam a hemocompatibilidade entre polímeros, como borracha de silicone, polietileno, polipropileno e cloreto de polivinila por diferentes técnicas de imobilização de heparina, ambos, com resposta à adesão de plaquetas e ativação do sistema de coagulação, especialmente para o caso de polietileno e cloreto de polivinila, sugerindo que a molécula de heparina mantém a atividade biológica.

Para melhorar a compatibilidade sanguínea, tem sido proposto o crescimento de células endoteliais sobre superfícies poliméricas de próteses vasculares, tendo em vista as ótimas características antitrombogênicas da monocamada de células endoteliais dos vasos naturais.

Wissink e colaboradores (2000), estudaram o crescimento de células endoteliais, para melhorar o desempenho dos enxertos em válvulas de pequeno calibre utilizando matrizes de colágeno reticulado com EDC (N-3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) / NHS (N-hidroxisuccimida) heparinizadas. A imobilização da heparina ao colágeno pode prevenir a coagulação sanguínea e adesão de plaquetas e pode ser utilizada *in vivo* para crescimento de células endoteliais em enxertos vasculares sintéticos.

## 2. JUSTIFICATIVA

As próteses vasculares têm sido usadas com sucesso na substituição de vasos sangüíneos de grande diâmetro. Quando se trata de vasos de pequeno calibre, a situação se complica em virtude da formação de trombos. Entre as alternativas para melhorar a compatibilidade sangüínea, tem sido proposta a utilização de materiais recobertos com células endoteliais tendo em vista suas características antitrombogênicas nos vasos sangüíneos naturais (WISSINK *et al.*, 2001).

Para melhorar a adesão e proliferação celular sobre o polímero, tem sido sugerida a utilização de uma camada de proteína apropriada. O colágeno tem sido usado com esse propósito por ser um importante promotor de adesão celular. Por outro lado é conhecida a função do colágeno na hemostasia e sua interação com plaquetas. A exposição de fibras colagênicas subendoteliais ao sangue, constitui o início da hemostasia e a origem de trombos devido à lesão celular (NIMNI; HARKNEE, 1988).

A associação do colágeno a moléculas com alta densidade de cargas negativas, como por exemplo a polissacarídeos sulfatados, é capaz de gerar um material com propriedade simulada da heparina.

Essa estratégia deve introduzir um tipo de substrato, capaz de promover crescimento endotelial e ao mesmo tempo prevenir a trombogenicidade.

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos:

1. Preparar filmes de colágeno com polissacarídeo sulfatado de algas vermelhas da espécie *Gracilaria cornea*, utilizando diferentes proporções do polissacarídeo.
2. Estudar as propriedades físico-químicas do colágeno, do polissacarídeo sulfatado e dos filmes de colágeno-polissacarídeo sulfatado por análise térmica, viscosidade, espectrometria no infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de impedância.
3. Realizar estudos de compatibilidade sangüínea pelo ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativado e adesão de plaquetas.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAIS**

#### **4.1.1. Colágeno**

Foi utilizada como matéria prima, a serosa bovina, obtida de abatedouros da região, onde é armazenada por volta de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , antes de sua utilização.

#### **4.1.2. Alga**

A alga vermelha *Gracilaria cornea* foi coletada na praia de Fleixeiras, Trairi-CE.

#### **4.1.3. Polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria cornea***

As amostras do polissacarídeo sulfatado (GC), obtido de algas vermelhas *Gracilaria cornea* (MELO *et al.*, 2002), foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas do Laboratório de Algas Marinhas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

### **4.2. MÉTODOS**

#### **4.2.1. Preparação do colágeno solúvel**

O colágeno (COL) foi extraído, a partir, de 50 g de serosa bovina, que foram tratadas a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período de 72 horas, com solução alcalina (3mL solução / g de tecido) contendo cloretos e sulfatos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^+$  e hidróxidos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . O material resultante foi equilibrado com uma solução contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  e

CaSO<sub>4</sub> (3mL solução / g de tecido) por um período de 12 horas (GOISSIS; MORIAK, 1990). A mistura foi homogeneizada em ácido acético 0,1 %. A concentração final da solução foi 10 mg/g, obtida por determinação de peso seco.

#### **4.2.2. Polissacarídeo em solução**

O polissacarídeo foi solubilizado em solução de ácido acético 0,1 %, até a concentração de 10 mg/g.

#### **4.2.3. Filmes de colágeno–polissacarídeo sulfatado (COLGC)**

Os filmes de COLGC foram obtidos a partir da mistura de solução de colágeno e do polissacarídeo sulfatado contendo 0, 5, 10, 20 e 25 % do polissacarídeo sulfatado descritos conforme itens 4.2.1 e 4.2.2. As blendas obtidas foram formatadas em moldes de acrílico em condições de baixa temperatura (15 °C).

#### **4.2.4. Plasma rico em plaquetas (PRP)**

Os ensaios de compatibilidade sanguínea foram realizados no laboratório de coagulação de Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

O sangue obtido no setor de processamento, em bolsa plástica lacrada, foi centrifugado a 2000 rpm por 7 min a 22 °C. Após a centrifugação, a bolsa de sangue total foi acondicionada no extrator automático de plasma, para separação do Plasma Rico em Plaquetas. O PRP foi estocado em uma bolsa plástica lacrada, em baixa temperatura, até sua utilização.

### **4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES**

#### **4.3.1. Espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR)**

Os espectros de infravermelho das amostras colágeno (COL), polissacarídeo sulfatado (GC) e das blendas colágeno-polissacarídeo sulfatados (COLGC 5, 10, 20, 25) foram obtidos em equipamento Shimadzu modelo IR Prestige 21.

#### **4.3.2. Análise térmica**

A estabilidade térmica das amostras COL, GC e das blendas COLGC 5, 10, 20, 25 foi estudada por Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) em um analisador térmico Shimadzu, DSC-50 e TGA-50H, respectivamente.

As amostras (5 mg) foram postas em cadinhos de alumínio e aquecidas em atmosfera inerte de N<sub>2</sub> a uma razão de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> para o DSC e 10 °C min<sup>-1</sup> para a TG.

#### **4.3.3. Espectroscopia de impedância**

Em peças de filme de 2,0 cm<sup>2</sup>, foram depositados eletrodos de prata, no centro do filme, com 1,0 cm de diâmetro. Os filmes COL, COLGC 5, 10, 20 e 25 apresentaram espessura de 0,059, 0,076, 0,067, 0,048, 0,041 mm, respectivamente, utilizando um micrômetro marca Mitutoyo.

As medidas de impedância foram realizadas a 25 °C usando a Solartron SI 1260 Impedance/Gain Phase Analyzer. As medidas foram realizadas com amplitude de voltagem de 100 mV e frequência variando de 1,0 × 10<sup>-2</sup> Hz a 1,0 × 10<sup>6</sup> Hz.

#### **4.3.4. Ensaio de adesão de plaquetas**

Peças de filmes de COL, COLGC 5, 10, 20, 25 foram equilibradas em tampão fosfato, 0,13 M, pH 7,4 por 1 hora, incubados em PRP a 37 °C por 120 minutos, em banho termostático. Após incubação, os filmes foram lavados no mesmo tampão fosfato, tratados com glutaraldeído 2,5 % por 15 minutos à temperatura ambiente; a seguir, foram feitas lavagens subseqüentes no mesmo tampão e em soluções de etanol 50, 60, 70, 80, 90 e 100 % e secos em dessecador (YAO *et al.*, 2006).

#### **4.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As fotomicrografias dos filmes de COL, COLGC 5, 10, 20 e 25 tratados com PRP foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura marca Philips modelo XL-30 com voltagem de aceleração 5–10 kV.

O procedimento de preparo das amostras incluiu cobertura com uma camada fina de ouro; para tornar o material condutor.

#### **4.3.6. Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA)**

Os ensaios de TTPA foram realizados usando 150 µL de PRP ( $3,5 \times 10^5$  células/ml) e 150 µL de solução da amostra do polissacarídeo sulfatado preparadas em concentrações que variaram de 6,25 a 2000 µg/mL. A curva de TTPA com heparina foi obtida através do mesmo procedimento, usando heparina sódica 5.000 UI/mL Strides Arcolab (0,0625 a 5 µg/mL). Os ensaios foram conduzidos em presença de cefalina (substituto plaquetário) e  $\text{CaCl}_2$ .

O TTPA foi determinado em coagulômetro modelo Sysmex CA1500, Marca Dade Behring.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO (GC)

#### 5.1.1. Espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR)

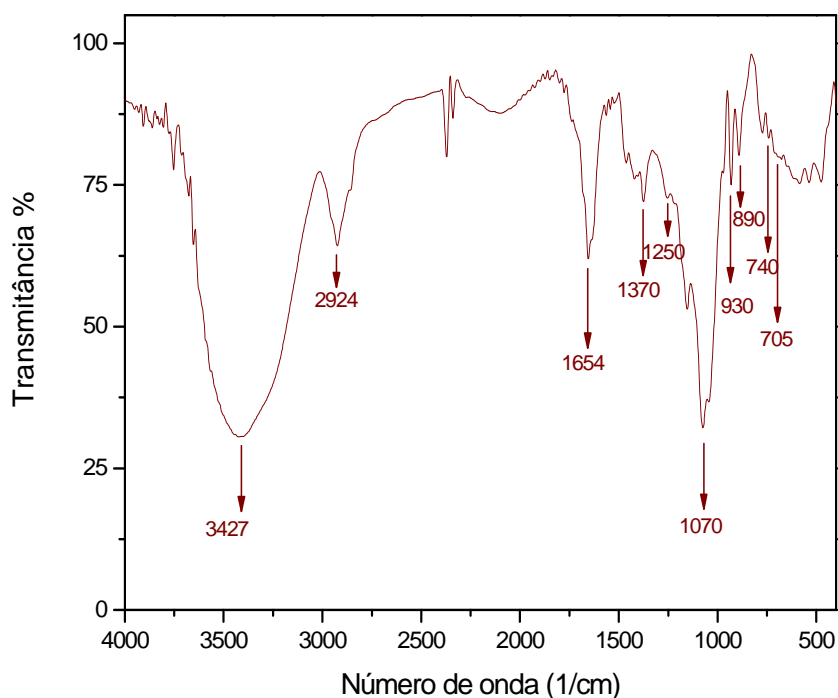


FIGURA 8. Espectro no infravermelho (ATR FTIR) do polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria cornea*, em pastilha de KBr.

A Figura 8 apresenta o espectro no infravermelho do polissacarídeo sulfatado apresentando absorções típicas de polissacarídeo de algas, como citado por (MELO *et al.*, 2002). Bandas de absorção de galactose-4-sulfato em  $705\text{ cm}^{-1}$ , banda específica de ágar em  $890\text{ cm}^{-1}$ , 3,6 anidrogactose em  $930\text{ cm}^{-1}$ , esqueleto de galactanas em  $1070\text{ cm}^{-1}$  e bandas típicas de galactanas sulfatadas éster sulfato em  $1370\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu\text{ C-H}$  em  $2924\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu\text{ O-H}$  em  $3427\text{ cm}^{-1}$  (Tabela 3).

As bandas de absorção do polissacarídeo em  $705\text{ cm}^{-1}$ ,  $1250\text{ cm}^{-1}$  e  $1370\text{ cm}^{-1}$ ; correspondem respectivamente, a galactose-4-sulfato, estiramento assimétrico ( $-S=O$ ) e éster sulfato ( $-S=O$ ).

TABELA 3. Bandas de absorção no espectro de infravermelho com as vibrações correspondentes para polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria cornea*

Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Vibração
3427	$\nu\text{ O-H}$
2924	$\nu\text{ C-H}$
1370	Éster sulfato ( $-S=O$ )
1250	Estiramento assimétrico $-S=O$
1070	Correspondente ao esqueleto das galactanas
930	3,6 – anidrogalactose
890	Banda específica de ágar
820	C-O-S galactose-6-sulfato
740	C-O-C de ligação glicosídica
705	Galactose-4-sulfato

### 5.1.2. Compatibilidade sanguínea (Tempo de tromboplastina parcial ativado - TTPA)

Para avaliar a possível atividade anticoagulante do polissacarídeo foi realizado o teste de tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), por ser o mais empregado em laboratório de análises clínicas para monitorar essa atividade.

A incubação do plasma com quantidades ótimas de fosfolipídeos e um ativador de superfície, leva a uma ativação dos fatores do sistema intrínseco de coagulação, mediante agregação de íons cálcio. É desencadeado, então, o tempo que leva até a formação do coágulo de fibrina.

As Figuras 9A e 9B mostram o TTPA em função da concentração de heparina e do GC, respectivamente.

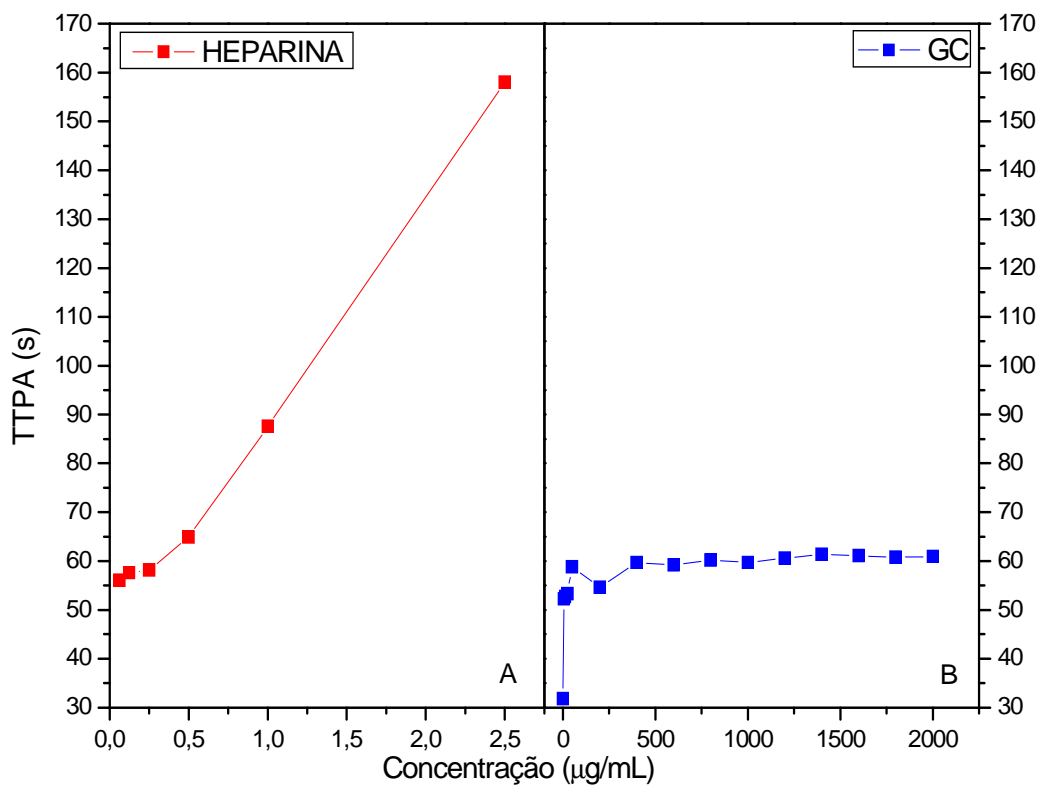


FIGURA 9. Ensaio de TTPA para o polissacarídeo sulfatado em comparação com a heparina, em função da concentração. Tempo de coagulação do plasma: 31s.

Na figura 9A, há um aumento da TTPA com um incremento da concentração da heparina, a partir de 0,25 µg/mL.

Na figura 9B, a presença do polissacarídeo aumenta o TTPA até 50  $\mu\text{g/mL}$  (60 s), permanecendo constante com o incremento da concentração. Esse resultado sugere que o polissacarídeo induz uma inibição do TTPA, embora em valores mais baixos quando comparado com a heparina, todavia significativamente maior que o plasma usado como controle (31 s).

### 5.1.3. Análise térmica

A curva de estabilidade térmica (Figura 10) por DSC do polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria cornea* apresenta duas transições térmicas, uma endotérmica a 81,66  $^{\circ}\text{C}$  e outra exotérmica a 272,33  $^{\circ}\text{C}$ . A primeira transição está relacionada com a perda de água da estrutura e a segunda com a degradação do material.

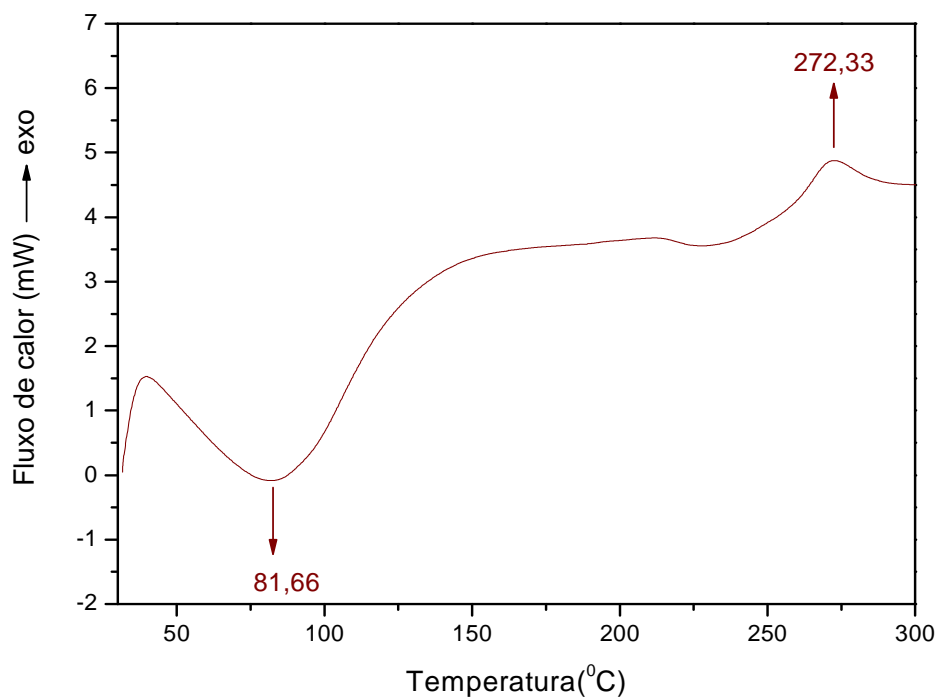


FIGURA 10. Termograma por DSC do polissacarídeo sulfatado *Gracilaria cornea*

A Figura 11 mostra o gráfico da derivada da curva de TG (DTG) onde pode ser observado um ponto de inflexão com máxima variação de massa a 286,92 °C relativa à temperatura de degradação do material, que concorda com o valor obtido por DSC.

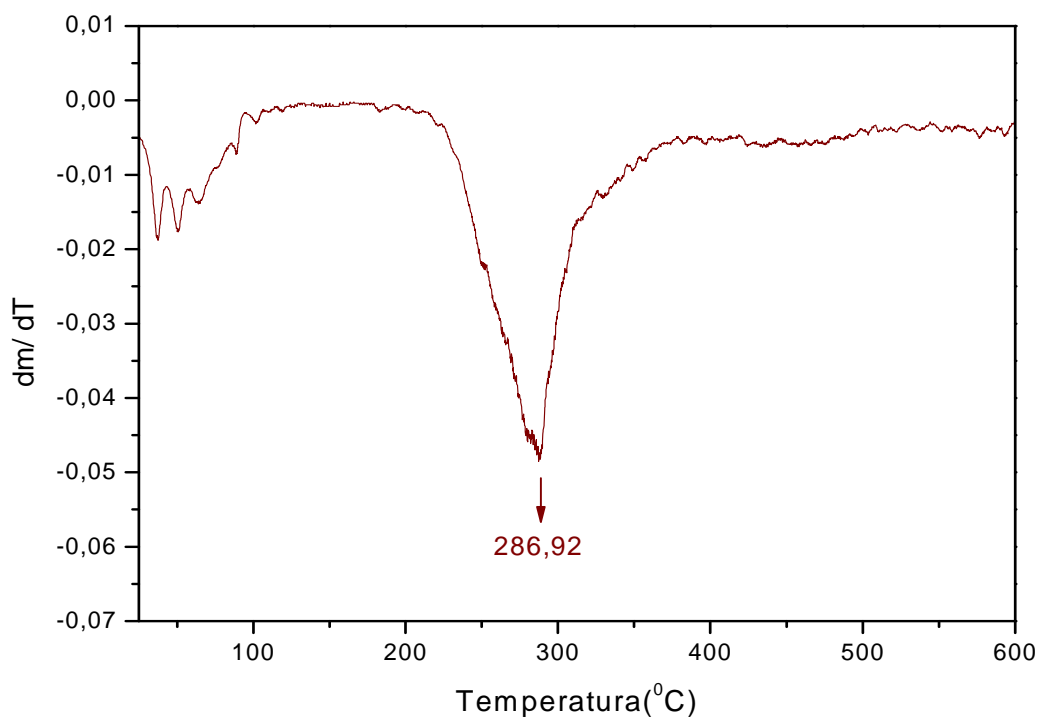


FIGURA 11. Curva de estabilidade térmica por DTG do polissacarídeo de *Gracilaria cornea* (GC)

## **5.2. CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO (COL)**

### **5.2.1. Caracterização do colágeno solúvel em pH 3**

#### **5.2.1.1. Viscosidade**

As moléculas de colágeno formam soluções viscosas, estáveis, em meio ácido, em baixa força iônica e à temperatura ambiente. Estudos viscosímetros são úteis para estudar as propriedades do colágeno em solução.

As curvas na Figura 12 mostram uma diminuição da viscosidade com o aumento do gradiente da velocidade, apresentando um comportamento pseudoplástico. Este resultado está relacionado à forma em bastão rígido da molécula de colágeno que tende a se alinhar na direção do fluxo.

As medidas foram realizadas utilizando 10 mL da solução de colágeno solubilizado em ácido acético 0,1 % na concentração de 10mg/mL em viscosímetro Brookfield modelo DV III.

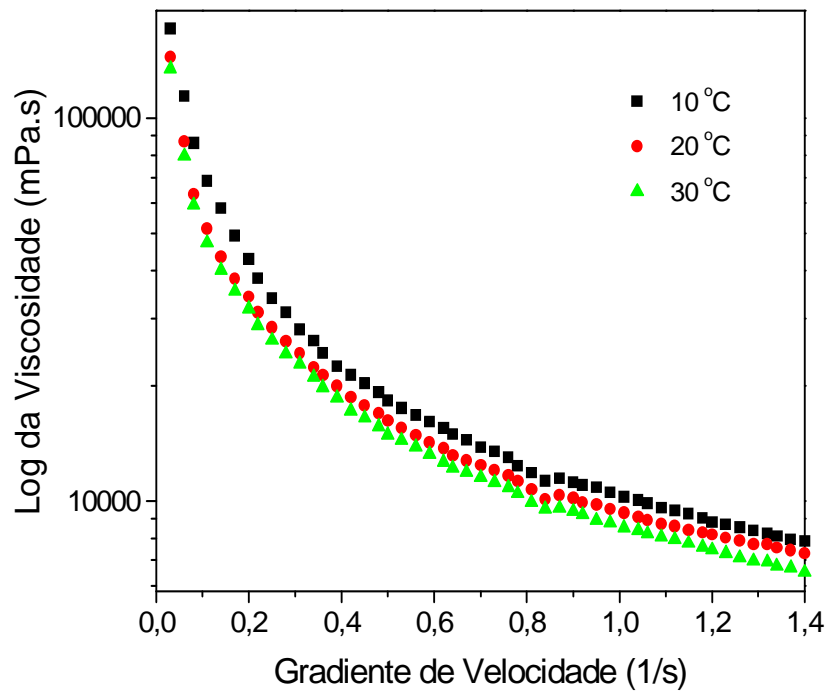


FIGURA 12. Efeito do gradiente de velocidade sobre a viscosidade do colágeno solúvel em pH 3, em diferentes temperaturas

## 5.2.2. Caracterização do filme de colágeno (COL)

### 5.2.2.1. Espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR)

O espectro (Figura 13) mostra bandas típicas para colágeno (Tabela 4) em  $1652\text{ cm}^{-1}$  e  $1541\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo respectivamente, à deformação axial da ligação  $\text{-C=O}$  em amida I e à deformação angular da ligação  $\text{-N-H}$  em amida II típicas de proteínas. A banda em  $1232\text{ cm}^{-1}$  corresponde às vibrações no plano do tipo amida III devido ao estiramento  $\text{C-N}$  e à vibração  $\text{N-H}$ , sensíveis a alterações na estrutura secundária do colágeno na tripla hélice, enquanto a banda em  $1458\text{ cm}^{-1}$  corresponde às vibrações dos anéis pirrolidínicos de prolina e hidroxiprolina. Essa banda, ao contrário da banda em  $1232\text{ cm}^{-1}$ , tem sua intensidade independente das variações estruturais do colágeno (WANG *et al.*, 2003; DE PAULA *et al.*, 2002).

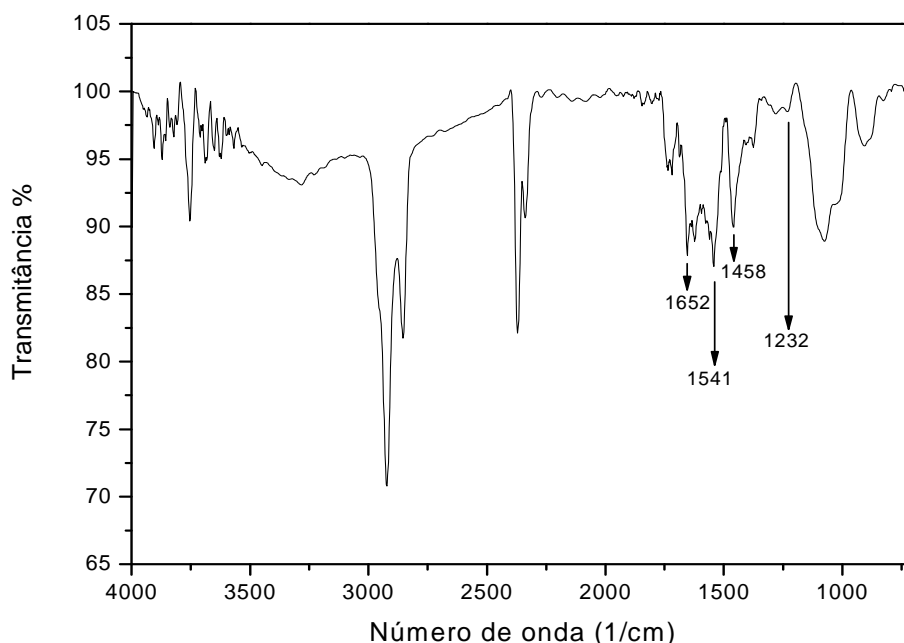


FIGURA 13. Espectro no infravermelho por reflectância total atenuada do filme de colágeno



TABELA 4. Principais bandas no espectro de infravermelho com as vibrações correspondentes para o colágeno

Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Vibração
1652	Amida I
1541	Amida II
1458	Anéis pirrolidínicos
1232	Amida III

#### 5.2.2.2. Análise térmica

A Figura 14 apresenta a curva de estabilidade térmica por DSC de filmes de colágeno. A curva mostra duas transições térmicas, uma em 77,06 °C, e outra em 208,7 °C. A primeira se refere à temperatura de desnaturação do COL associada à evaporação residual de água fortemente ligada. A segunda deve estar relacionada a um rearranjo estrutural que acontece depois da desnaturação.

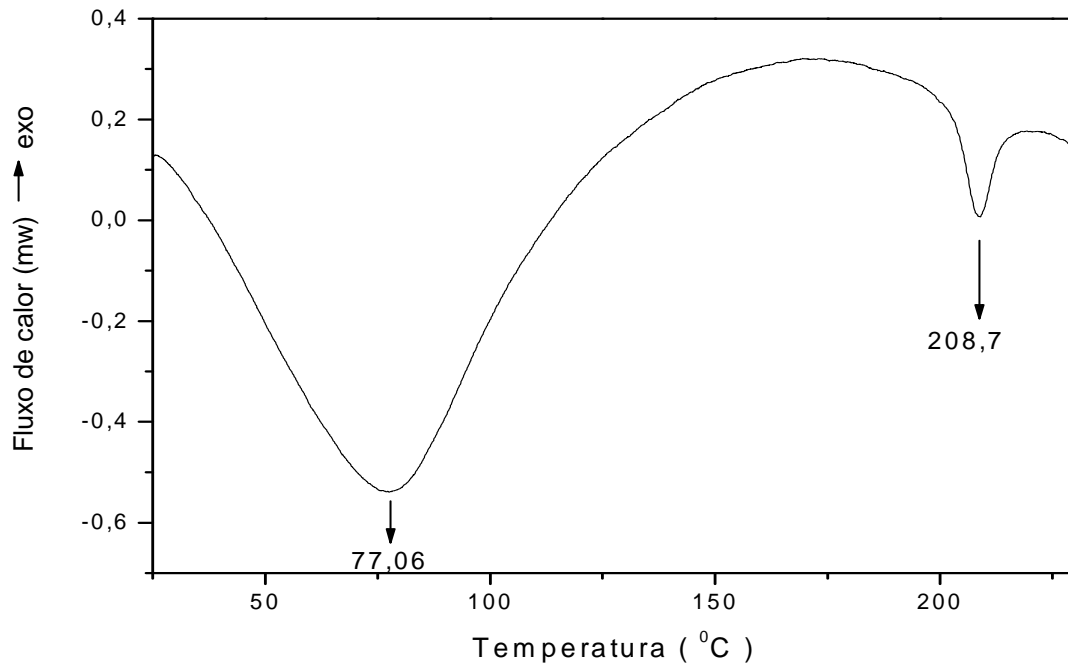


FIGURA 14. Termograma por DSC do filme de colágeno

A Figura 15 mostra a curva de DTG para filmes de COL. Um ponto de inflexão máximo é observado em 309,96 °C referente à temperatura de decomposição da amostra.

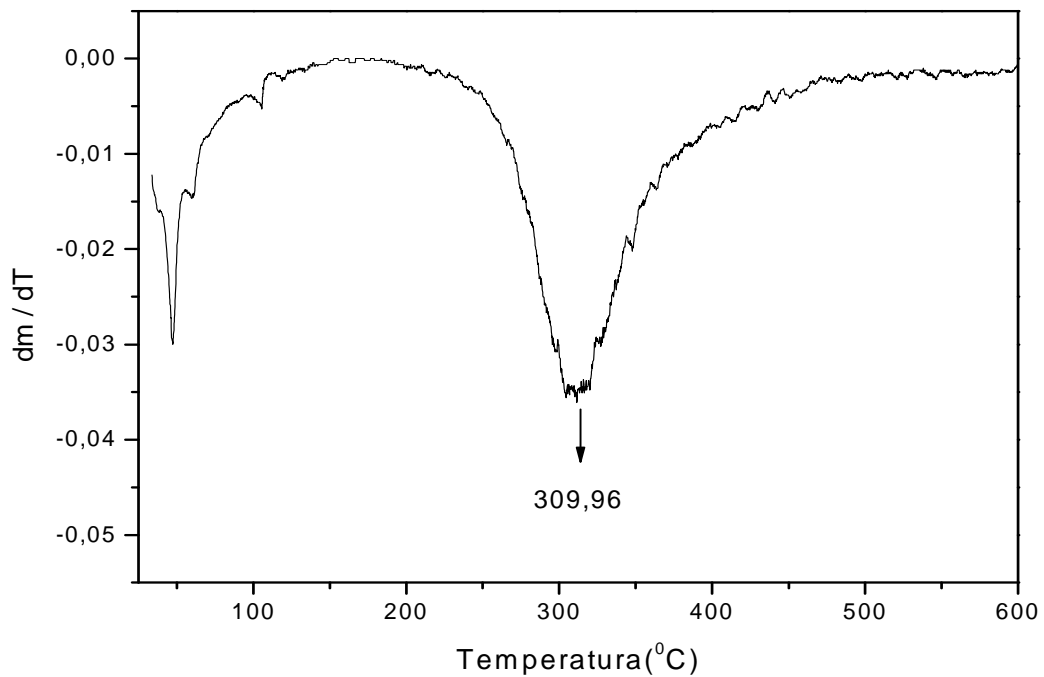


FIGURA 15. Curva de estabilidade térmica por DTG do filme de colágeno

### 5.3. CARACTERIZAÇÃO DO FILME DE POLISSACARÍDEO SULFATADO-COLÁGENO (COLGC)

#### 5.3.1. Espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR)

Os espectros no infravermelho dos filmes de COLGC 5, 10, 20 e 25 apresentados nas figuras 16, 17, 18, 19, respectivamente, mostram a presença de bandas típicas do colágeno (Amida I, II e III) e do polissacarídeo sulfatado.

Para as concentrações mais baixas (COLGC 5 e 10), as bandas de absorção de amida III foram deslocadas de  $1232\text{ cm}^{-1}$  para  $1276\text{ cm}^{-1}$  e  $1278\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Esse deslocamento deve estar relacionado, à sobreposição observada, das bandas de absorção de amida III do colágeno e estiramento assimétrico de  $(-S=O)$  no polissacarídeo.

As bandas típicas de polissacarídeo sulfatado, galactose-4-sulfato em  $705\text{ cm}^{-1}$  do polissacarídeo sulfatado não foram observadas nos espectros das blendas, provavelmente devido à baixa concentração do polissacarídeo. As bandas de absorção típicas da ligação éster sulfato ocorrem apenas para os filmes de maior concentração do polissacarídeo, COLGC 20 e 25, em  $1375\text{ cm}^{-1}$ .

Algumas vibrações aparecem na mesma frequência, por este motivo há sobreposição de algumas bandas.

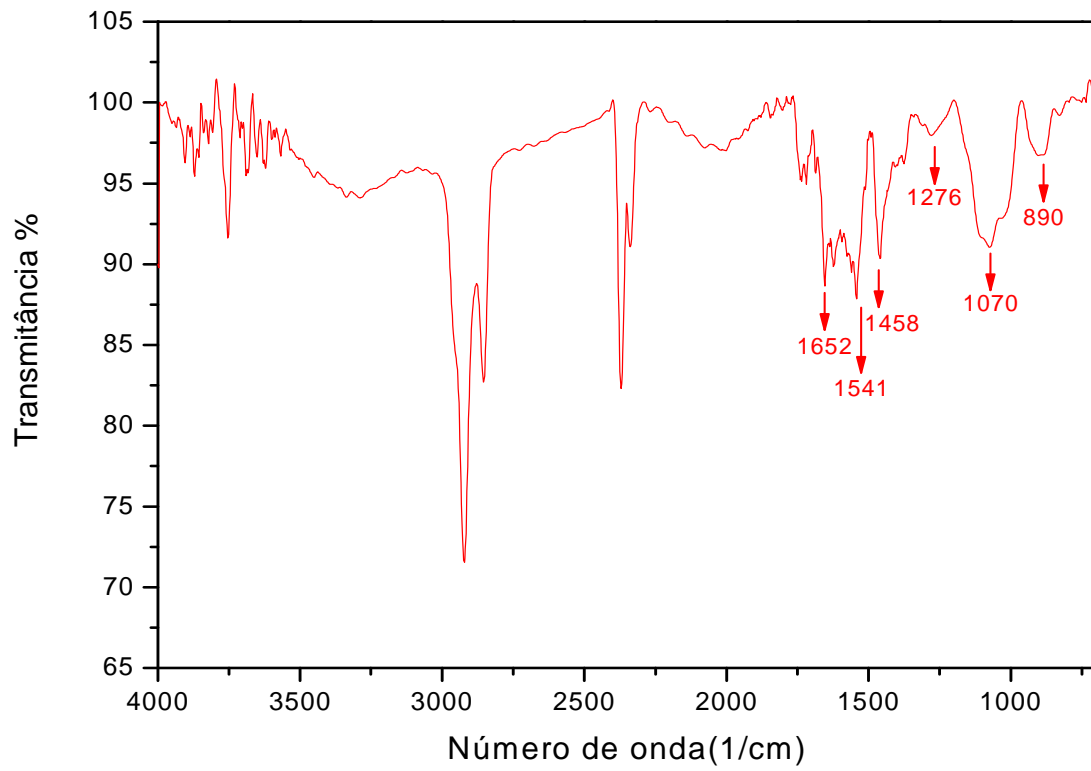


FIGURA 16. Espectro no infravermelho do filme colágeno– polissacarídeo sulfatado COLGC 5

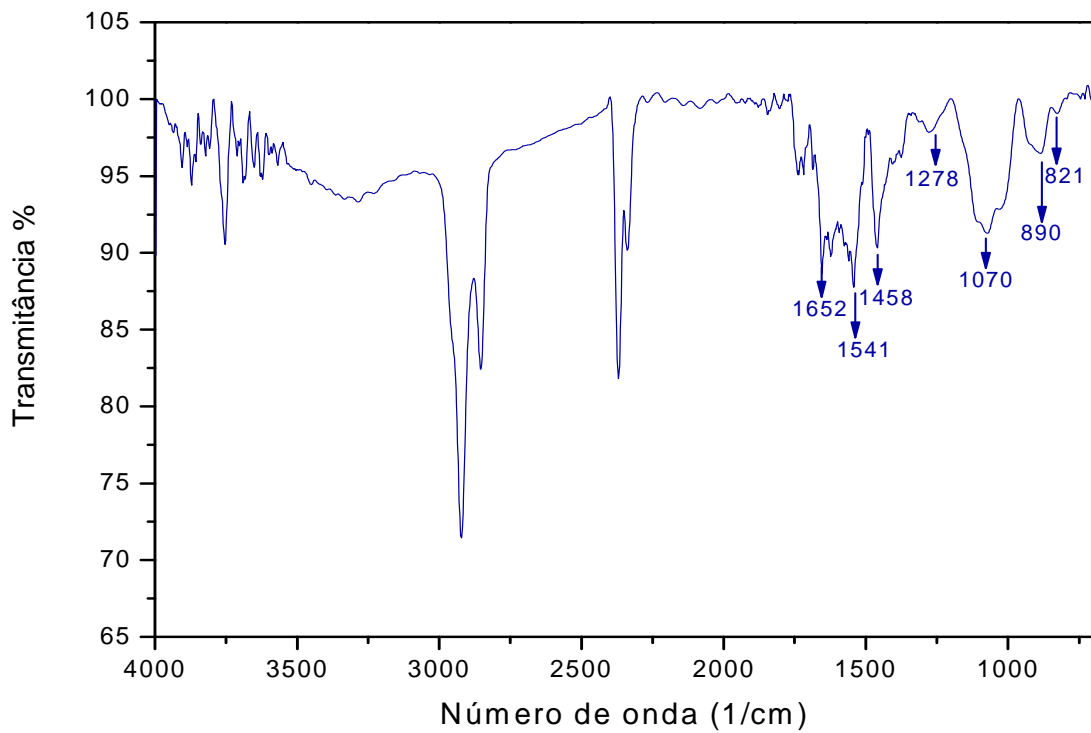


FIGURA 17. Espectro no infravermelho do filme COLGC 10

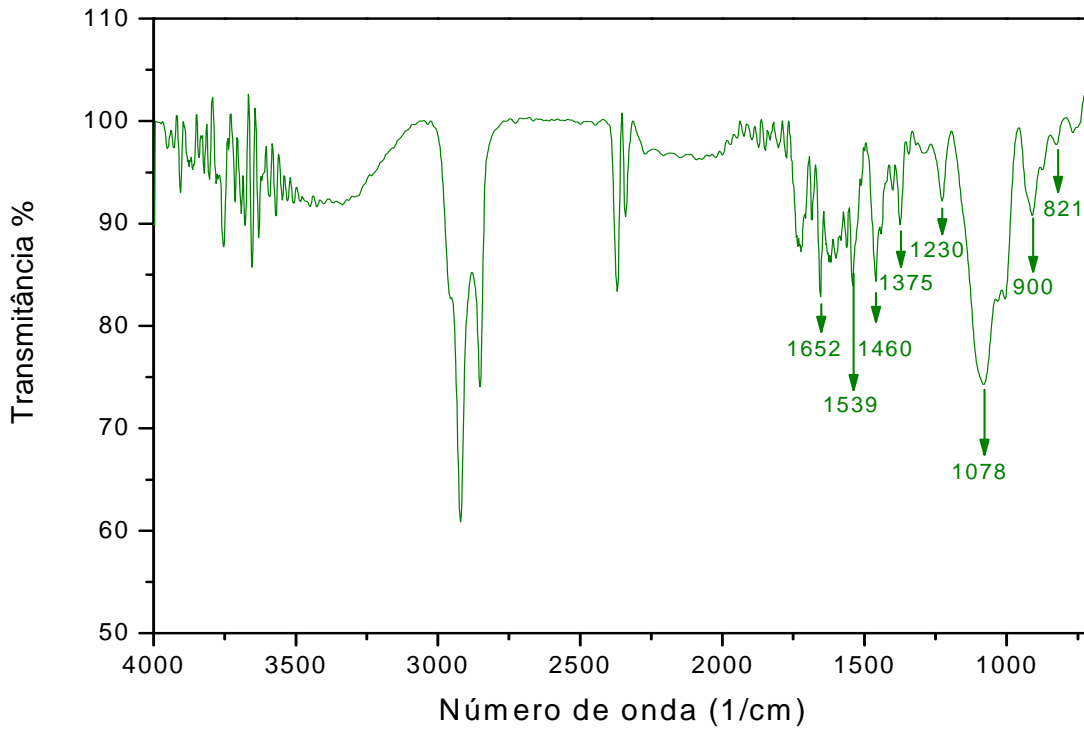


FIGURA 18. Espectro no infravermelho do filme COLGC 20

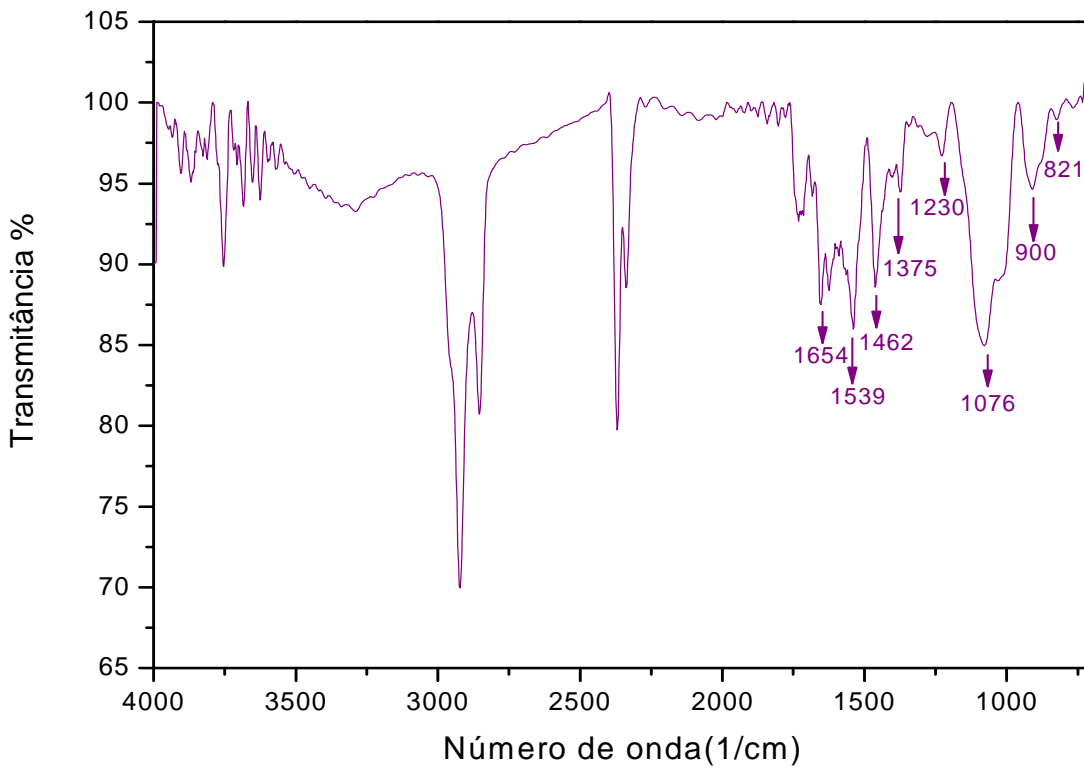


FIGURA 19. Espectro no infravermelho do filme COLGC 25

### 5.3.2. Análise térmica

A Figura 20 mostra as curvas de estabilidade térmica por DSC para filmes de COL, COLGC 5, 10, 20 e 25. Da mesma forma com que foi observado nos filmes de colágeno, os termogramas apresentam duas transições térmicas; respectivamente para filmes COLGC 5, 10, 20 e 25: a primeira em 77,21 °C, 76,98 °C, 81,72 °C, 77,96 °C e a segunda em 214,46 °C, 214,80 °C, 220,90 °C e 219,40 °C, respectivamente. Os resultados mostram que a adição do polissacarídeo nas amostras não diminui a estabilidade térmica do colágeno, tendo sido maior para amostras de COLGC 20.

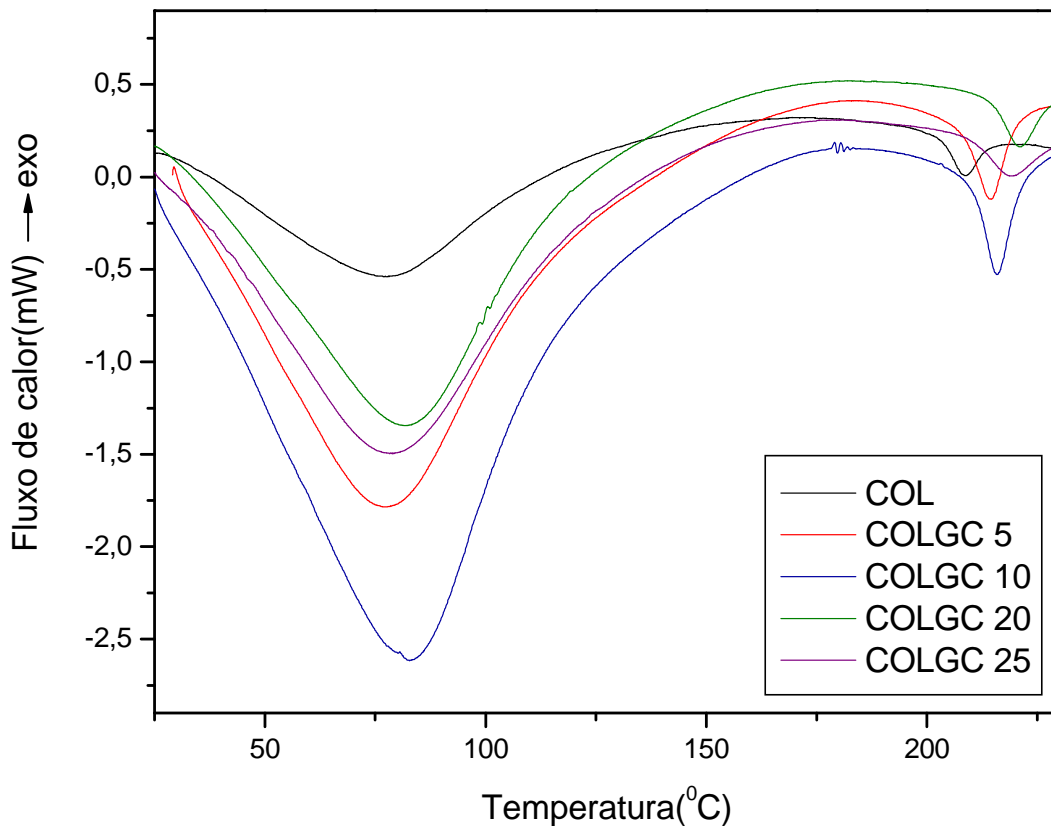


FIGURA 20. Termogramas por DSC dos filmes de colágeno e colágeno – polissacarídeo sulfatado.

TABELA 5. Temperaturas referentes às transições térmicas por DSC do filme de colágeno e de colágeno–polissacarídeo sulfatado.

Amostra	Temperatura <sub>1</sub> (°C)	Temperatura <sub>2</sub> (°C)
COL	77,06	208,70
COLGC 5	77,21	214,46
COLGC 10	76,98	214,80
COLGC 20	81,72	220,90
COLGC 25	77,96	219,40

A Figura 21 apresenta a curva da energia de transição térmica dos filmes de COL e COLGC 5, 10, 20 e 25 (Tabela 6) em função da concentração do polissacarídeo que está relacionada com a área dos termogramas por DSC (Figura 20). Podemos observar que os pontos não seguem a linearidade (curva azul) mostrando que há interação entre as macromoléculas.

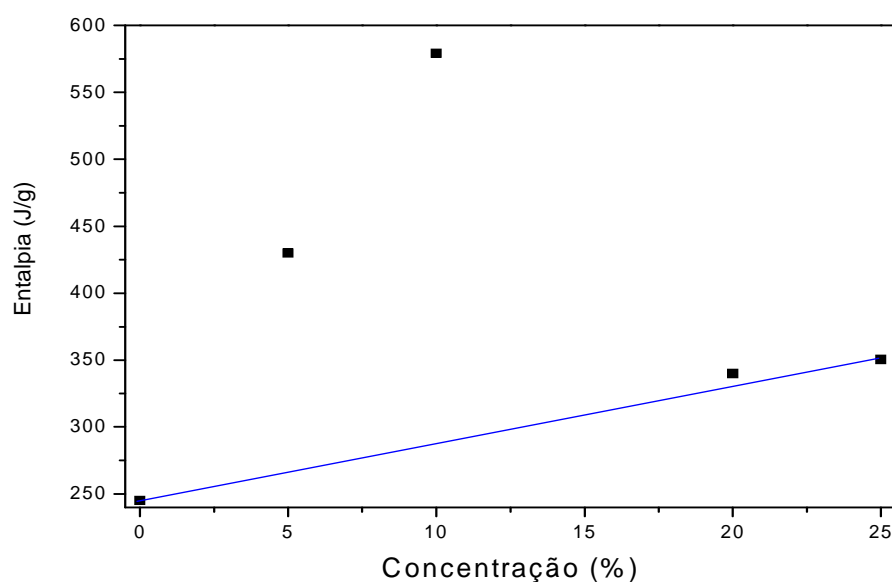


FIGURA 21. Energia de transição térmica dos filmes de COL e COLGC 5, 10, 20 e 25 em função da concentração do polissacarídeo.

TABELA 6. Temperaturas referentes às energias de transições térmicas por DSC.

Amostra	Energia J/g
COL	245,08
COLGC 5	429,95
COLGC 10	579,14
COLGC 20	339,94
COLGC 25	350,40

As Figuras 22, 23, 24 e 25 mostram, respectivamente, as curvas de estabilidade térmica por DTG para filmes de COLGC 5, 10, 20 e 25.

Conforme visto nas Figuras 11 e 15, vimos que a estabilidade térmica do colágeno, com relação à temperatura de degradação, é maior que a do polissacarídeo; isso ocorre provavelmente devido à natureza química das ligações. No polissacarídeo, as ligações glicosídicas são mais fracas que as ligações peptídicas no colágeno.

As determinações de DTG dos filmes de COLGC 5, 10, 20, 25 apresentam, respectivamente, pontos de inflexão máximos em 308,06 °C, 311,65 °C, 312,66 °C e 317,78 °C (Tabela 7) referentes à temperatura de de composição da amostra.

Com a adição do polissacarídeo ocorre um pequeno decréscimo da estabilidade de degradação térmica. Embora, ao adicionarmos 5 % do GC ao colágeno, ocorre uma ligeira redução em sua estabilidade, a partir daí, nas concentrações 10, 20 e 25 %, a estabilidade do filme vai aumentando.



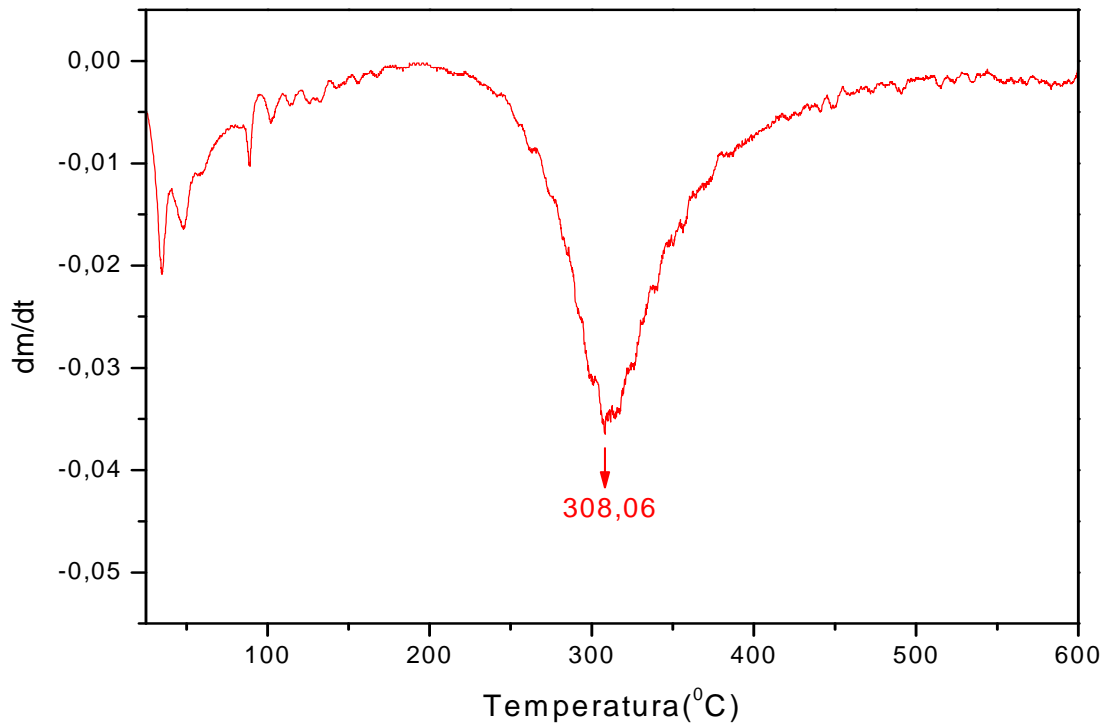


FIGURA 22. Curva de estabilidade térmica por DTG do COLGC 5

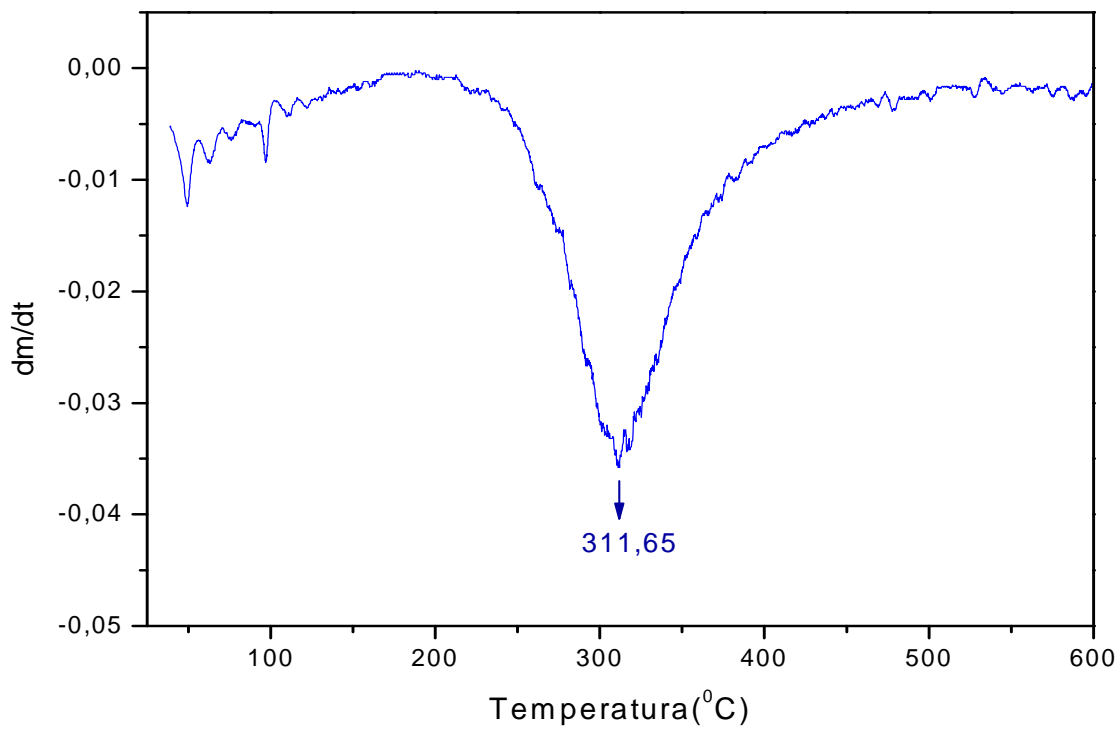


FIGURA 23. Curva de estabilidade térmica por DTG do COLGC 10

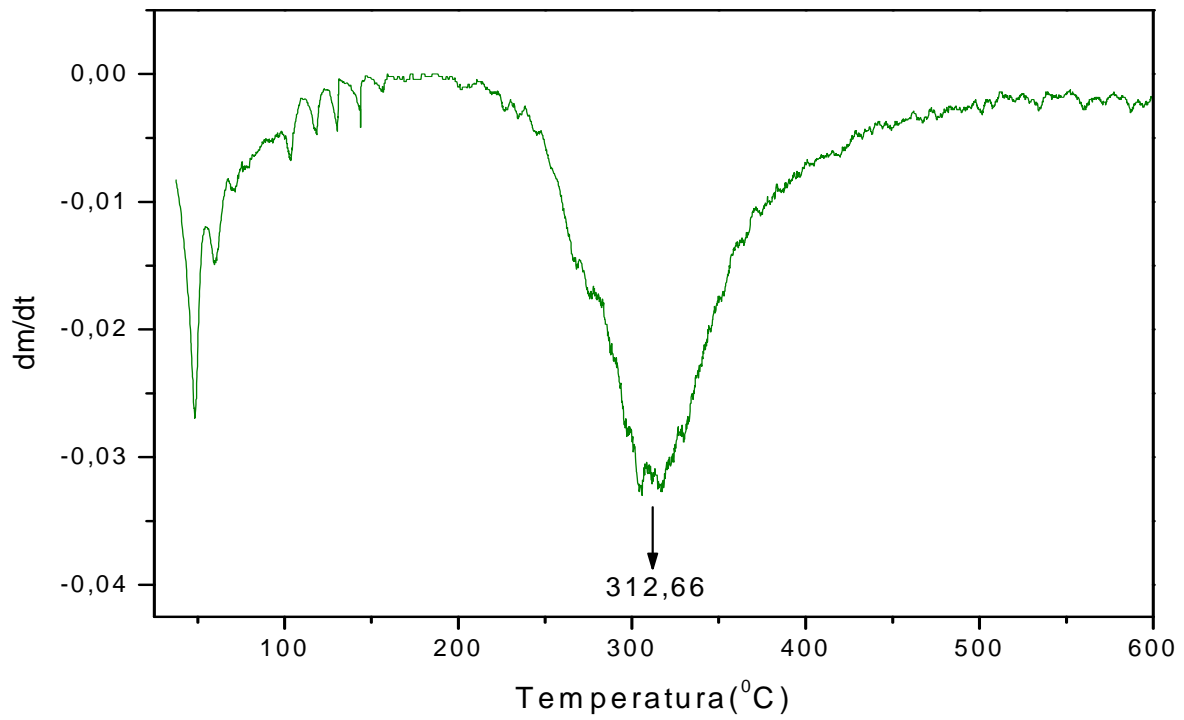


FIGURA 24. Curva de estabilidade térmica por DTG do COLGC 20

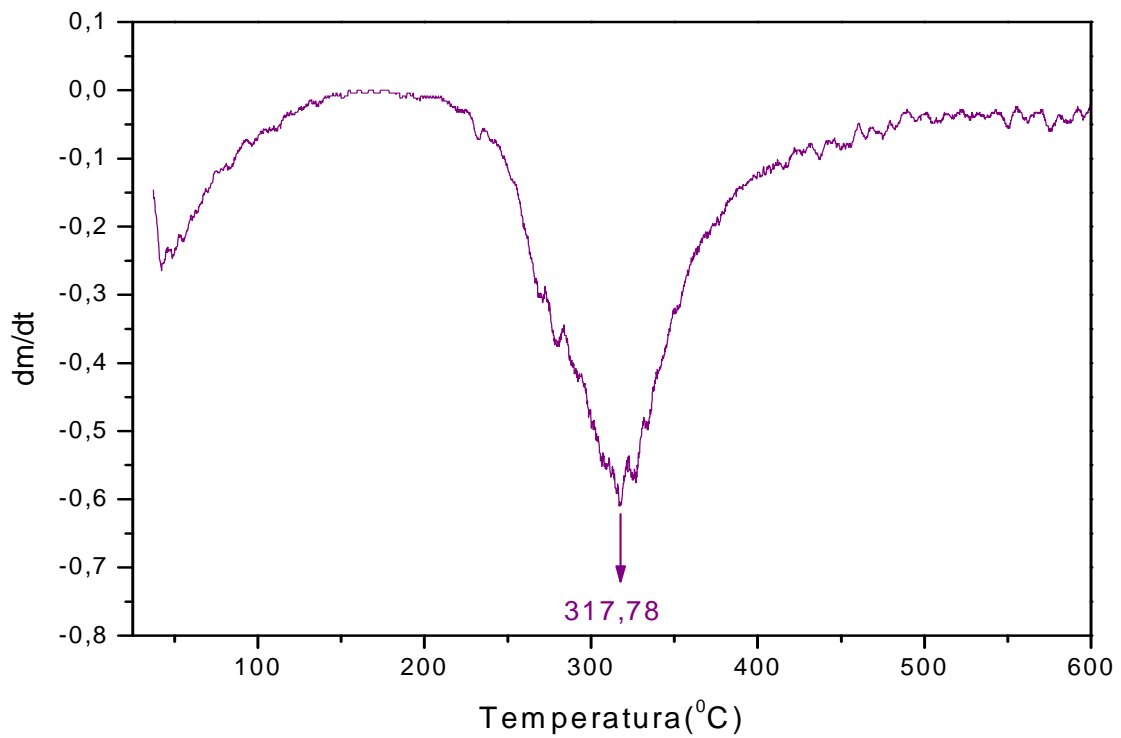


FIGURA 25. Curva de estabilidade térmica por DTG do COLGC 25

TABELA 7. Temperaturas referentes inflexão de degradação máxima das curvas de estabilidade térmica por DTG do polissacarídeo sulfatado e dos filmes de colágeno e de colágeno – polissacarídeo sulfatado.

Amostras	Temperatura de degradação (°C)
GC	286,92
COL	309,96
COLGC 5	308,06
COLGC 10	311,65
COLGC 20	312,66
COLGC 25	317,78

A curva de estabilidade térmica por TG do GC, COL, COLGC 5, 10, 20 e 25 conforme, Figura 26, apresenta o primeiro estágio (25 °C até cerca de 230 °C) que é atribuído à perda de massa adsorvida e estrutural contida nos materiais e no segundo estágio, iniciando-se próximo a 230 °C e indo até 600 °C referente à degradação dos materiais.

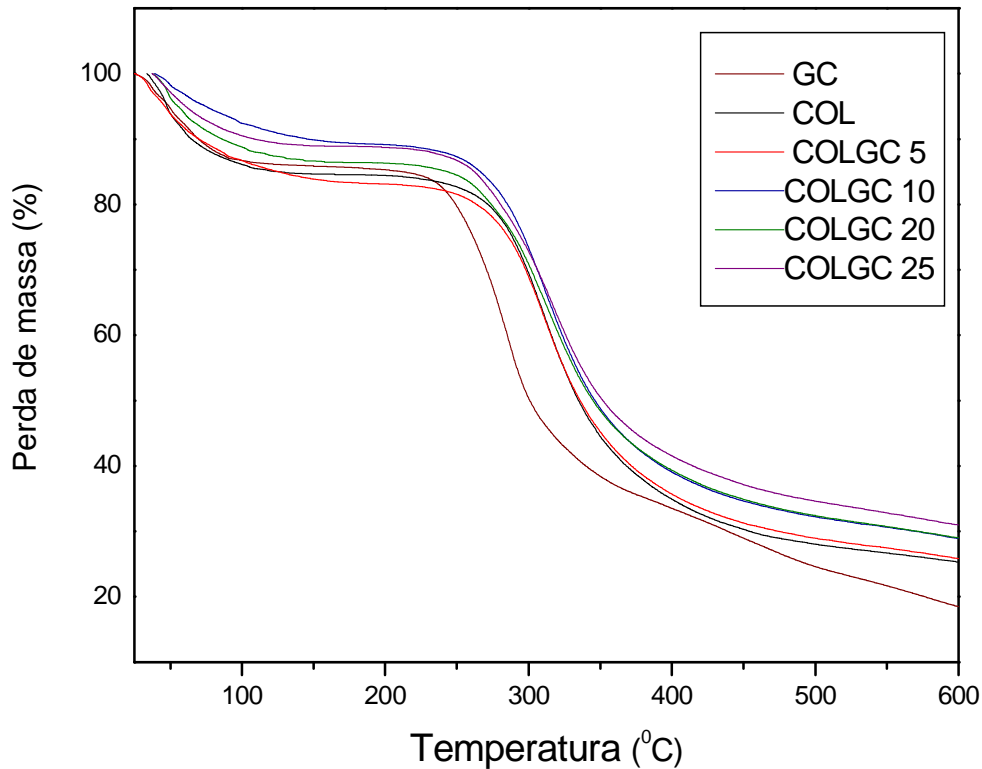


FIGURA 26. Curva de estabilidade térmica por TG do polissacarídeo sulfatado e dos filmes de colágeno e colágeno-polissacarídeo sulfatado.

### 5.3.3. Espectroscopia de impedância

A impedância elétrica é uma propriedade inerente aos materiais que pode ser utilizada para caracterizar tecidos e sistemas biológicos. Desde o século XIX se tem estudado a impedância elétrica em sistemas biológicos e o primeiro trabalho data da década de 1890, quando G.N.Steward usou a condutividade elétrica do sangue para caracterizar o tempo da circulação (FLORIO, 1998).

As bases fundamentais das medidas de impedância foram estabelecidas nas décadas de 30 e 40 do século passado quando Kenneth S. Cole apresentou seus primeiros trabalhos sobre partículas esféricas, desenvolvendo modelos matemáticos, circuitos equivalentes e descrevendo os vetores de impedância (COLE; COLE, 1941). Tão grande foi a importância que hoje em dia, mais de sessenta anos depois, ainda se utilizam seus modelos para a caracterização das medidas de espectroscopia de impedância.

As aplicações médicas nas quais se utilizam, atualmente, os sistemas de espectroscopia de impedância são muito diversos, desde, medidas em tecidos oculares (JÜRGENS *et al.*, 1996), pulmonares (HAHN *et al.*, 1995) a tumores (BLAD; BALDETORP, 1996).

De acordo com a técnica de espectroscopia de impedância, o sistema dielétrico, num capacitor de placas planas, é submetido a uma onda de potencial elétrico  $V(t)$  senoidal. A resposta do sistema, que depende de suas características dielétricas, é detectada como uma onda de corrente elétrica senoidal  $I(t)$  com a mesma frequência do potencial de excitação, mas com fase diferente causada por processos de relaxação dielétrica. A impedância  $Z$  do sistema é definida como a razão entre o potencial de excitação  $V(t)$  e a corrente de resposta  $I(t)$ . Quando um campo elétrico é aplicado num capacitor de placas paralelas separadas por um material dielétrico, como um biopolímero, as cargas elétricas dos átomos, moléculas e íons sofrem um deslocamento localizado relativo as suas posições originais de equilíbrio e o material se polariza. A polarização máxima é obtida quando o campo elétrico é capaz de afetar todas as cargas elétricas do material produzindo uma bem definida orientação dessas cargas no material. Geralmente, os efeitos de polarização em um material dielétrico homogêneo podem ser classificados em quatro categorias: polarização eletrônica – resultado do deslocamento dos orbitais eletrônicos em relação ao centro dos átomos; polarização atômica – causada pelo deslocamento dos átomos através da aplicação do campo elétrico; polarização dipolar – resultado da orientação de dipolos permanentes presentes nas moléculas, segmentos moleculares ou estruturas supramoleculares; polarização iônica – resultado da migração de cargas para os eletrodos através a ação do campo elétrico (NUCCI *et al.*, 2006).

As medidas de espectroscopia de impedância possibilitam a separação das diferentes contribuições individuais dos constituintes do material quando estes têm diferentes respostas em um determinado domínio de frequências (DAMOS *et al.*, 2004).

Para análise de impedância, tomamos por base um circuito onde temos um resistor em paralelo com um capacitor, designado por circuito RC em paralelo, como mostra a Figura 27.

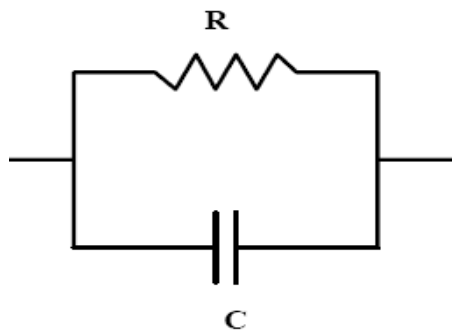


FIGURA 27. Circuito RC em paralelo

Neste circuito, a impedância do circuito é:

$$1/Z = 1/R + 1/X_c,$$

Sendo que, R é a resistência e  $X_c$ , a reatância capacitiva, que provoca um atraso de  $90^\circ$  na tensão (V), regido por uma frequência angular de oscilação ( $\omega$ ), em relação a uma corrente (I) e a  $\omega$  está relacionada com uma frequência f por :

$$\omega = 2 \pi f$$

A reatância capacitiva é dada por:

$$X_c = 1/i\omega C = Z_c,$$

sendo  $i = \sqrt{-1}$  a unidade imaginária.

Então, a impedância complexa é expressa por:

$$Z = Z' - Z''i = (R / 1 + \omega^2 C^2 R^2) - i (\omega C R^2 / 1 + \omega^2 C^2 R^2)$$

A curva que representa esse circuito é um semi-círculo com o centro sobre o eixo real, conforme, Figura 28, o diagrama de Argand-Gauss, que em medidas elétricas é conhecido por Cole-Cole (MACDONALD, 1987).

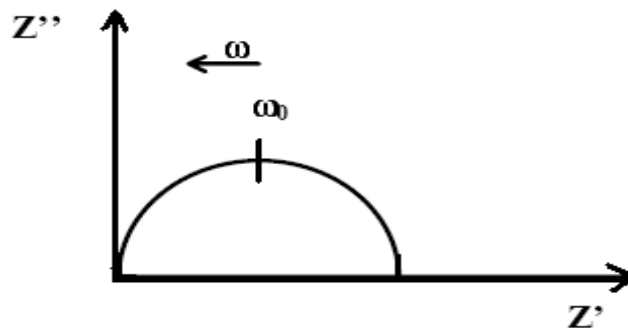


FIGURA 28. Diagrama de impedância ou gráfico de Cole-Cole do circuito mostrado na Figura 27.

A Figura 29 apresenta o gráfico plano complexo das impedâncias das amostras de filmes COL, COLGC 5, 10, 20 e 25.

Podemos observar que todas as amostras apresentam dois semi-círculos com raios diferentes. E as curvas apresentam valores não lineares.

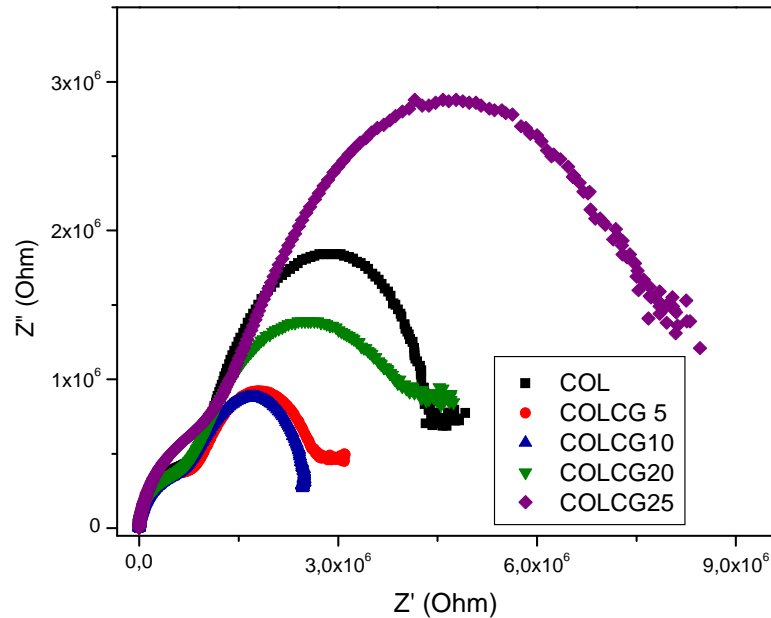


FIGURA 29. Diagrama de impedância dos filmes de colágeno e de colágeno-polissacarídeo sulfatado.

Estes resultados podem ser representados por um circuito, como o mostrado na Figura 30, onde dois RC paralelos estão em série. O diagrama de impedância desse tipo de circuito é mostrado na Figura 31, desde que as frequências características sejam distintas. A impedância desse circuito é:

$$Z = Z_1 + Z_2$$



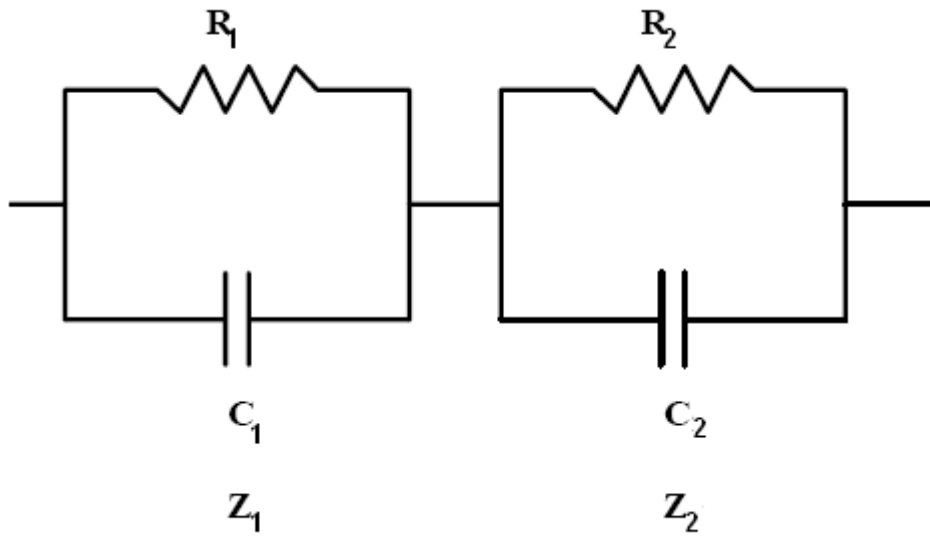


FIGURA 30. Circuito equivalente a um dielétrico.

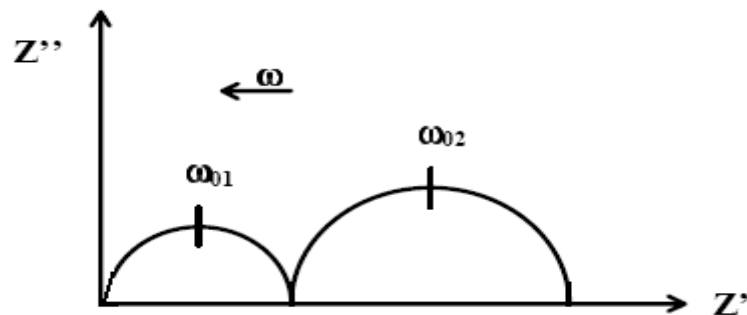


FIGURA 31. Diagrama de impedância mostrado na Figura 30.

No gráfico  $Z'$  versus  $Z''$ , na Figura 31, os dois semi arcos podem estar associados com mecanismos de relaxação, um em altas frequências ( $>85$  Hz) e o outro em baixas. Na tabela 8, são apresentados os parâmetros de ajuste do modelo descrito acima. Os resultados mostram que a resistência e o tempo de relaxação ( $\tau_1$  e  $\tau_2$ ) são maiores para COLGC 25 e que a curva não apresenta uma regularidade de comportamento; sendo, este efeito é semelhante ao DSC, estes resultados devem estar associados possivelmente a interações entre as macromoléculas.

TABELA 8. Parâmetros dielétricos dos filmes de colágeno e de colágeno-polissacarídeo sulfatado.

Amostras	$R_1 (x 10^6)$ Ohm	$\tau_1 (x 10^{-2})$ s	$R_2 (x 10^5)$ Ohm	$\tau_2 (x 10^{-4})$ s
COL	4.86	3.12	13.1	4.22
COLGC 5	2.15	2.34	7.45	2.24
COLGC 10	2.17	1.94	8.85	3.56
COLGC 20	6.06	3.32	11.7	2.40
COLGC 25	1.39	6.92	21.9	4.51

#### 5.3.4. Adesão de plaquetas

A microscopia eletrônica de varredura realizada com os filmes de COL, COLGC 5, 10, 20 e 25 estão, respectivamente, nas Figuras 32, 33, 34, 35 e 36.

A adesão de plaquetas ao colágeno está relacionada à presença de grupos  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina e hidroxilisinias de cadeias laterais dessa molécula (NIMMI; HARKNEE, 1988). Podemos observar na Figura 32 a interação das plaquetas ao colágeno, pela adesão ao filme, todavia não em tão grande quantidade, visto que, ao colágeno utilizado foi feita uma modificação química com tratamento alcalino, aumentando seus grupos carboxílicos, conseqüentemente, suas cargas negativas em relação ao colágeno nativo, devido à hidrólise seletiva de resíduos de asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes na proteína (DE PAULA *et al.*, 2002).

A microscopia eletrônica de varredura dos filmes de COLGC 5, 10, 20, 25 mostra que à medida que a concentração do polissacarídeo sulfatado aumenta, ocorre uma redução do número de plaquetas na superfície do filme. Isto sugere que a adesão de plaquetas pode ter sido reduzida por repulsão de eletrostática entre as plaquetas e as cargas negativas do colágeno e do polissacarídeo sulfatado (LIN *et al.*, 2004).

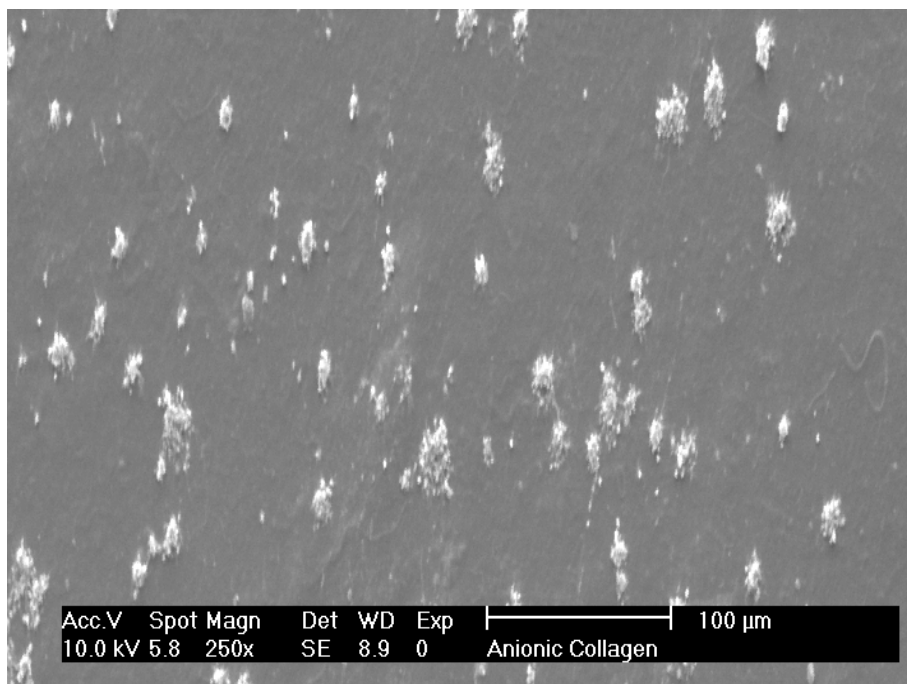


FIGURA 32. Micrografia do filme de colágeno tratado com PRP a 37 °C por 120 min

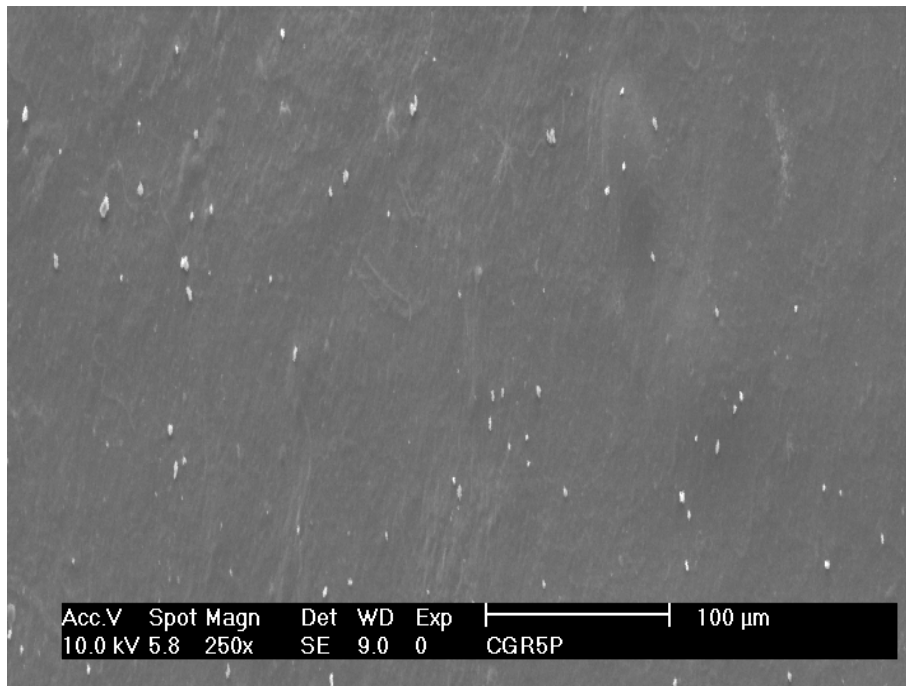


FIGURA 33. Micrografia do filme de COLGC 5 tratado com PRP a 37 °C por 120 min

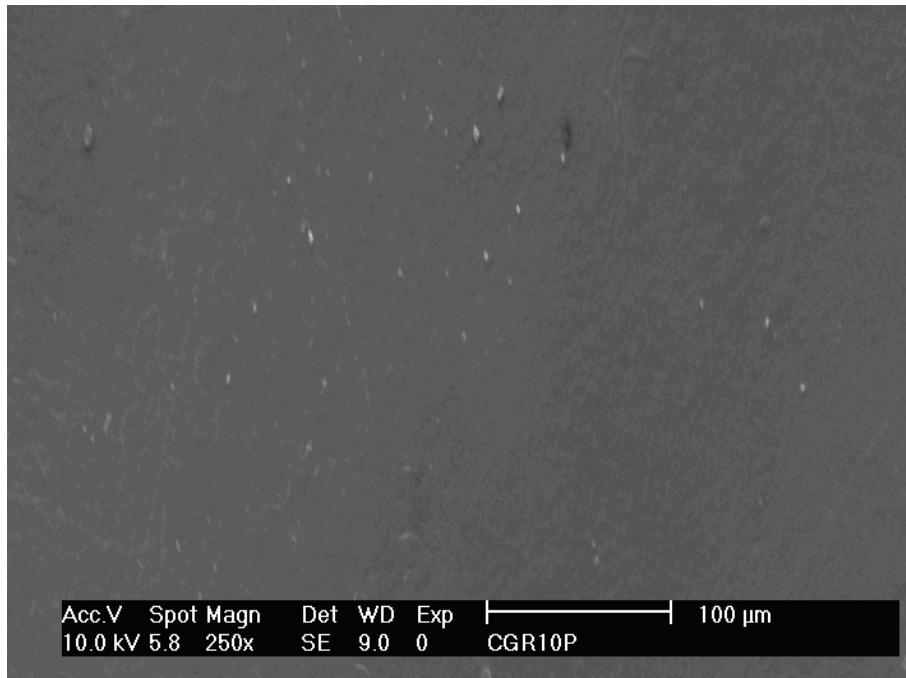


FIGURA 34. Micrografia do filme de COLGC 10 tratado com PRP a 37 °C por 120 min

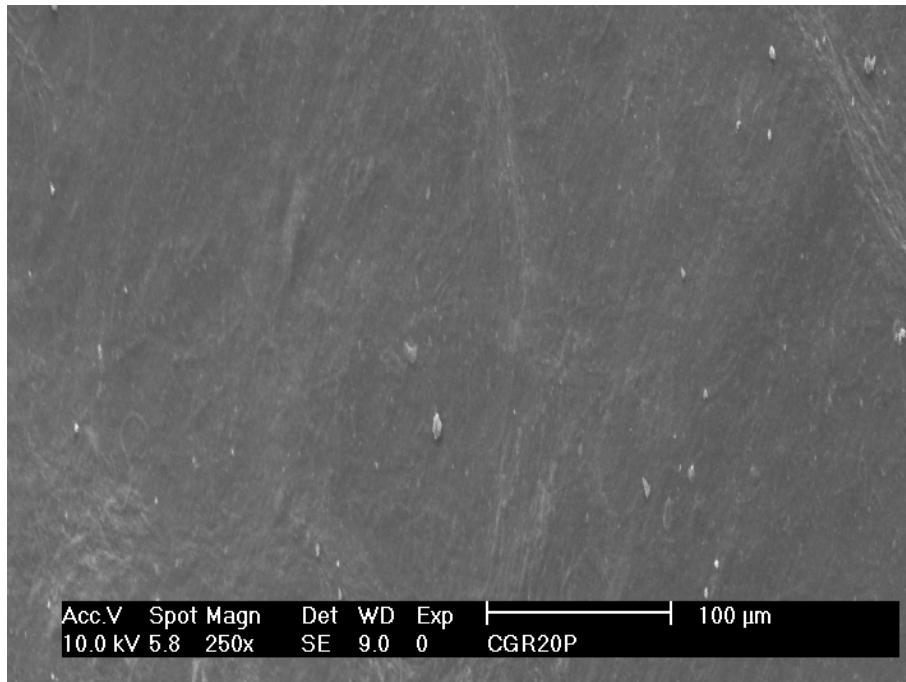


FIGURA 35. Micrografia do filme de COLGC 20 tratado com PRP a 37 °C por 120 min

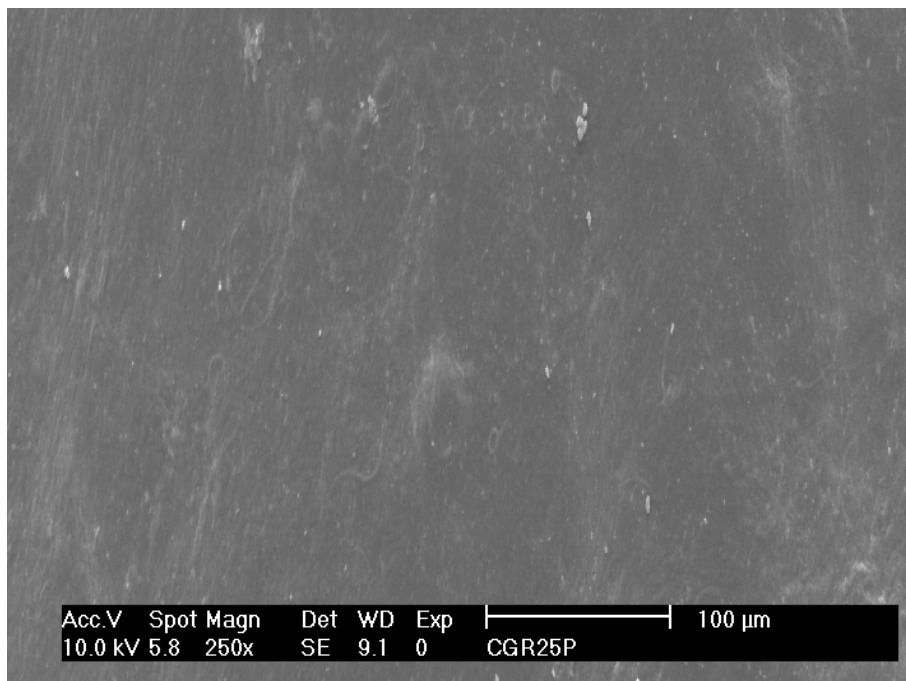


FIGURA 36. Micrografia do filme de COLGC 25 tratado com PRP a 37 °C por 120 min

## 6. CONCLUSÕES

- O polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria cornea* apresentou atividade anticoagulante pelo teste de tromboplastina parcial ativado.
- Os resultados de análise térmica por DSC mostraram que a integridade estrutural do colágeno foi preservada no processo de extração.
- A adição do polissacarídeo ao colágeno não afetou sua estabilidade térmica com exceção para a concentração de 20 % (COLGC 20) cuja temperatura de desnaturação foi de 81,72 °C em comparação a 77,06 °C para filmes de colágeno.
- Os resultados de Termogravimetria (DTG) mostraram que a presença do polissacarídeo nos filmes aumentou a temperatura de degradação térmica do material.
- Os resultados de espectroscopia de impedância demonstram uma possível interação entre as macromoléculas confirmando os resultados de DSC.
- Os resultados de adesão de plaquetas sugerem que filmes de colágeno-polissacarídeo sulfatado possuem propriedades antitrombogênicas.

Os resultados obtidos sugerem que:

- Há possibilidades de aplicação desses filmes no revestimento de próteses vasculares.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar com maior nível de detalhamento as interações entre as macromoléculas;
- Avaliar o comportamento *in vivo* dos filmes colágeno-polissacarídeo sulfatado;
- Avaliar o emprego de colágeno-polissacarídeo sulfatado na preparação de novos materiais com características antitrombogênicas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELE, P. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. **Biomaterials**. **25**: 2831–2841, 2004.

AQUINO, R. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**. **15**: 11–20, 2005.

ARAKI, C. Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. **Proc. Int. Seaweed Symp.** **5**: 3-19, 1966.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of Gracilaria. **Journal of Applied Phycology**. **7**: 231-243, 1995.

BANSEMIR, A.; BLUME, M.; SCHRÖDER, S.; LINDEQUIST, U. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**. **252(1)**, 79-84, 2006.

BLAD, B.; BALDETORP, B. Impedance spectra of tumor tissue in comparison with normal tissue, a possible clinical application for electrical impedance tomography. **Physiological Measurement**. **17 (4)**: A105-A115, 1996.

CACERES, P.J.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; MATSUIRO, B.; ZUNIGA, E. A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**. **53 (1)**: 81-86, 2000.

CARVALHO, L. R.; ROQUE, N. F. Fenóis Halogenados e/ou Sulfatados de Macroalgas Marinhas. **Química Nova**. **23 (6)**: 757-764, 2000.

CASU, B.; GUERRINI, M.; TORRI, G. Structural and Conformational Aspects of the Anticoagulant and Antithrombotic Activity of Heparin and Dermatan Sulfate. **Current Pharmaceutical Design**. **10 (9)**: 939-949, 2004.

COLE, K.S.; COLE, R. H. Dispersion and absorption in dielectrics. I. Alternating current characteristics. **Journal of Chemical Physics**. **9**:341-351, 1941.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS E SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**. **27 (6)**: 970-979, 2004.

DE PAULA, M.; GOISSIS, G.; MARTINS, V. C. A. Compósitos de colágeno aniônico: ramsana como géis injetáveis para correções plástica: preparação, caracterização e propriedades reológicas. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. **18 (1)**: 7-16, 2002.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; GONÇALVES, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E. B.; CERESO, A.S. *The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and*



*its antiviral activity*. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**. **339**: 335-347, 2004.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. **J. Biol. Chem.** **275 (38)**: 29299-29307, 2000.

FARIAS, W. R. L. As algas na mira da ciência. Pesquisas FUNCAP. **Revista de Ciência e Tecnologia**. Ano 5. Nº 3 dezembro/2003.

FIGUEIRÓ, S.D.; GÓES, J. C.; MOREIRA, R. A.; SOMBRA, A. S. B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan-collagen films. **Carbohydrate Polymers**. **56**: 313-320, 2004.

FLANAGAN, T. C.; WILKINS, B.; BLACK, A.; JOCKENHOEVEL, S.; SMITH, T. J.; PANDIT, A. S. A collagen-glycosaminoglycan co-culture model for heart valve tissue engineering applications. **Biomaterials**. **27**: 2233-2246, 2006.

FREILE-PELEGRIN, Y.; MURANO, E. Agars from three species of Gracilaria (Rhodophyta) from Yucatán Península. **Bioresource Technology**. **96**: 295-302, 2005.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. **45**: 113-136, 1998.

FLORIO, D. Z. **Estudos de Sinterização e de Envelhecimento Térmico de Cerâmicas de Zircônia - Ítria por Espectroscopia de Impedância**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo, 1998.

GELSE, K.; PÖSCHL E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**. **55 (12)**: 1531-1546, 2003.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1263, 1992.

GOISSIS, G.; MORIAK, C. M. Processo de solubilização de tecido conjuntivo na presença de dimetilsulfóxido e concentração salina variável. 1990 Patente Industrial n. 9.000.972.

GOISSIS, G.; PICCIRILI, L.; GOES, J.C.; DE GUZZI, A.M. Anionic Collagen: Polymer composites with improved dielectric and rheologica properties. **Int. J. Artif. Organs**. **2**: 215-221, 1998.

GOISSIS, G.; DE PAULA, M.; MARTINS, V.C.A. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. **Biomaterials**. **20**: 27-34, 1999.

HAHN, G.; FRERICHS, I.; KLEYER, M.; HELLIGE, G. Local mechanics of lung tissue determined by functional EIT Proc. **IX International Conference on Electrical Bio-Impedance**, Heidelberg, Germany, pp.456-457, 1995.

JIANG, Y.; ZHU, J.; ZHU, C.H.; SHEN, J.; LIN, S.C. Blood compatibility of polyurethane surface grafted copolymerization with sulfobetaine monomer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. **36**: 27–33, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8<sup>a</sup> ed. Editora Guanabara Koogan S.A., 1995.

JÜRGENS, I.; ROSELL, J.; RIU, P. J. Electrical impedance tomography of the eye: In vitro measurements of the cornea and the lens. **Physiological Measurement**, **17**: 187-196, 1996.

KIKUCHIA, M.; MATSUMOTO, H.N.; YAMADA, T.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDA, K.; TANAKA, J. Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite / collagen self-organized nanocomposites. **Biomaterials**. **25**: 63–69, 2004.

LAI, M. F.; LII, C. Rheological and thermal characteristics of gel structures from various agar fractions. **International Journal of Biological Macromolecules**. **21**: 123-130, 1997.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**. **221**: 1–22, 2001.

LENS, J. P.; TERLINGEN, J.G.; ENGBERS, G.H.; FEIJEN, J. Preparation of heparin-like surfaces by introducing sulfate and carboxylate groups on poly(ethylene) using an argon plasma treatment. **J Biomater Sci Polym Ed**. **9**: 357–72, 1998.

LIAO, M.-L.; CHIOVITTI, A.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.J.; KRAFT, G.T.; BACIC, A. Sulfated galactans from Australian specimens of the red alga *Phacelocarpus peperocarpus* (Gigartinales, Rhodophyta) Carbohydrate. **Research**. **296**: 237-247, 1996.

LIN, W.-C.; LIU, T.-Y.; YANG, M.-C. Hemocompatibility of polyacrylonitrile dialysis membrane immobilized with chitosan and heparin conjugate. **Biomaterials**. **25**: 1947–1957, 2004.

LIN, Y. K.; LIU, D. C. Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species. **Food Chemistry**, 2005 *in press*.

MACDONALD, J.R. **Impedance Spectroscopy**. J Wiley & Sons. New York, 346, 1987.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Bioresource Technology**. **96**: 379–382, 2005.

MELO, M. S. R.; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P.; DE PAULA, R.C.M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**. **49**: 491- 498, 2002.

MICHANETZIS, G. P. A.; KATSALA, N.; MISSIRLIS, Y. F. Comparison of haemocompatibility improvement of four polymeric biomaterials by two heparinization techniques. **Biomaterials**. **24 (4)**: 677-688, 2003.

MOURÃO, P. A. S.; MULLOY, B.; THOMAS, S.; GRAY, E. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. **Br J Haematol**. **101**: 647–52, 1998.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for Alternatives to Heparin Sulfated Fucans from Marine Invertebrates. **TCM**. **9 (8)**: 225-232, 1999.

MOURÃO, P. A. S. Use of Sulfated Fucans as Anticoagulant and Antithrombotic Agents: Future Perspectives. **Current Pharmaceutical Design**. **10 (9)**: 967-981, 2004.

NIMNI, M; HARKNEE, R. Molecular structures and functions of collagen. In **Collagen: Biochemistry**, CRC Press. **1**: 1-77, 1988.

NUCCI, A.M.; NICOLAU, A.; MARTINI, E. M. A.; SAMIOS, D. Electrical impedance spectroscopy of epoxy systems: The case of 1,4-butanediol diglycidylether/cis-1,2-cyclohexanedicarboxylic anhydride and triethylamine as initiator. **European Polymer Journal**. **42**:195–202, 2006.

OLIVEIRA, L. C. O.; FRANCO, R. F. Novas drogas anticoagulantes. Medicina, Ribeirão Preto: **Simpósio: HEMOSTASIA E TROMBOSE**. VI (34): 276-281, jul./dez. 2001.

PARK, J. B.; LAKES, R. S. **Biomaterials an Introduction**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Plenum Press, 55-78, 1992.

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES N.M.; MELO, M.R.; VALENTE, A.P.; MELO, F.R.; MOURÃO, P.A. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**. **340**: 2015–2023, 2005.

PEREIRA, M. S.; VILELA-SILVA, A.-C.; E. S.; VALENTE, A.-P.; MOURÃO, P. A. S. A 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. **Carbohydrate Research**. **337**: 2231-2238, 2002.

ROBINS, S. P.; DUNCAN, A. Cross-linking of collagen. Location of pyridinoline in bovine articular cartilage at two sites of the molecule. **Biochemical Journal**. **215(1)**: 175–182, 1983.

ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**. **23**: 449–456, 2002.

RUITHER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**. **8**: 389-395, 1997.

SHANMUGAM, M.; MODY, K. H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Current Science**. **79**: 1672-1683, 2000.

SILVA, C. C.; THOMAZINI, D.; PINHEIRO, A. G.; ARANHA, N.; FIGUEIRÓ, S. D.; GÓES, J. C.; SOMBRA, A. S. B. Collagen–hydroxyapatite films: piezoelectric properties **Materials Science and Engineering B**. **86(3)**: 210-218, 2001.

SMITH, J.W. Molecular pattern in native collagen. **Nature**. **219(150)**:157-8, 1968.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARÍA, P.C.S.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, M.E.R.; DAMONTE, E.B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**. **66**: 103–110, 2005.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of Agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**.**12**: 301-308, 1998.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo: Atheneu, 303p., 2002.

VOET, D.; VOET, J.G., **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1223p.,1990.

WANG, X.H.; LI, D. P.; WANG, W. J.; FENG, Q. L.; CUI, F. Z.; XU, Y. X.; SONG, X. H.; VAN DER WERF, Mark. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. **Biomaterials**. **24**: 3213–3220, 2003.

WENDEL, H.P.; WEBER, N.; ZIEMER, G. Adsorption of plasma proteins at heparin-coated surfaces—comparative investigations. **Biomed Technol**. **45**: 282–7, 2000.

WISSINK, M. J. B.; BEERNINK, R.; SCHARENBERG, N.M.; POOT, A.A.; ENGBERS, G.H.M.; BEUGELING, T.; VAN AKEN, W.G.; FEIJEN J. Endothelial cell seeding of (heparinized) collagen matrices: effects of bFGF pre-loading on proliferation (after low density seeding) and pro-coagulant factors. **Journal of Controlled Release**. **67**:141-155, 2000.

WISSINK, M. J.B.; BEERNINK, R.; POOT, A.A.; ENGBERS, G.H.M.; BEUGELING, T.; VAN AKEN, W.G.; FEIJEN, J. Binding and release of basic fibroblast growth factor from heparinized collagen matrices. **Biomaterials**. **22 (16)**: 2291-2299, 2001.

XUE, C.H.; FANG, Y.; LIN, H.; CHEN, L.; LI, Z.-J.; DENG, D.; LU, C.-X. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. **Journal of Applied Phycology**. **13**: 67-70, 2001.

YAO, C.; RODERFELD, M.; RATH, T.; ROEB, E.; BERNHAGEN, J.; STEFFENS, G. The impact of proteinase-induced matrix degradation on the release of VEGF from heparinized collagen matrices. **Biomaterials**. **27 (8)**: 1608-1616, 2006.

## 9. ANEXOS

