



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CLAYTON SOUZA CAMPELO

**AVALIAÇÃO DA COAGULABILIDADE E DA CALCIFICAÇÃO EM FILMES DE
QUITOSANA SULFONATADA E CARRAGENANA**

FORTALEZA

2014

CLAYTON SOUZA CAMPELO

**AVALIAÇÃO DA COAGULABILIDADE E DA CALCIFICAÇÃO EM FILMES DE
QUITOSANA SULFONATADA E CARRAGENANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C196a Campelo, Clayton Souza.
 Avaliação da coagulabilidade e da calcificação em filmes de quitosana sulfonatada e carragenana /
Clayton Souza Campelo. – 2014.
 103 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.
 Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
 Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.
1. Biopolímeros. 2. Biomoléculas. 3. Quitosana. 4. Carragenana. I. Título.

CDD 547

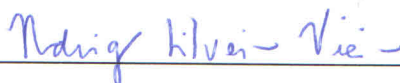
CLAYTON SOUZA CAMPELO

AVALIAÇÃO DA COAGULABILIDADE E DA CALCIFICAÇÃO EM FILMES DE
QUITOSANA SULFONATADA E CARRAGENANA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 26 / 09 / 2014.

BANCA EXAMINADORA



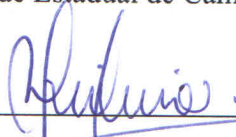
Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof^a. Dr^a. Marisa Masumi Beppu

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)



Prof^a. Dr^a. Vilma de Lima

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Àquela que sempre esteve presente em cada passo do meu viver:

Minha Mãe

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Rodrigo Vieira pela oportunidade, pelo apoio, por ter acreditado no meu trabalho, e por ser um orientador presente, ajudando sempre que eu precisava e dando uns ‘puxões de orelha’ quando se fazia necessário.

Ao Grupo de Pesquisas em Separações por Adsorção/UFC, que cedeu suas dependências para que fosse possível à realização deste trabalho. À Janelene Eloi, pelo apoio técnico. À Andrea Prudente, Juliana Bezerra e Caroline Rodrigues, pelo apoio administrativo.

À Faculdade de Engenharia Química/Unicamp que gentilmente cedeu suas instalações para a realização do ensaio de calcificação. Ao LRAC e ao técnico Hugo Teixeira pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Prof^ª. Marisa Beppu, pelo apoio dado para a realização do ensaio de calcificação. À Mariana Agostini e toda equipe do LEQUIP/Unicamp, pelo acolhimento caloroso e ajuda prestada durante a realização do ensaio de calcificação.

À Embrapa/Fortaleza, pelas análises de FTIR, à Prof^ª Morsyleide Rosa, cujo apoio foi essencial para a realização das análises, e ao técnico João Paulo Moraes, por ter realizado as análises.

À Faculdade de Medicina/UFC, à Prof^ª Vilma de Lima, à Prof^ª Gerly Brito, e à técnica Rose Freire, pelas análises de microscopia confocal.

Ao Departamento de Física/UFC, pelas análises de microscopia de força atômica, em especial à pós-doutoranda Luciana Rebelo, pela realização das análises e a explicação sobre o funcionamento de um microscópio de força atômica.

À l’Université Laval, au Prof. Diego Mantovani e à la professionnelle de recherche Pascale Chevallier, pour les efforts dépensés de façon que je puisse faire les essais de recouvrement.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Au Gouvernement du Canada pour la bourse du Programme des Futurs Leaders dans les Amériques qui m’a permis de faire les essais de recouvrement.

À Funcap pelo fomento de Cooperação Internacional.

Um agradecimento todo especial à Luana Dias por toda ajuda dada ao longo do mestrado.

À Letícia Marin e Juliana Vaz pelas valorosas discussões sobre eletropolimento, MFA, ângulo de contato, XPS e *grafting*.

À saudosa tia Célia Campelo (*in memoriam*) que sempre torceu, acreditou e se orgulhou do seu sobrinho ‘cientista maluco’.

Aos amigos Luis Arthur Silva e Kaciano Gadelha que, mesmo longe, sempre estiveram perto, com seus conselhos, brincadeiras e palavras de conforto para os momentos de desespero. Aos amigos Patrícia Inês Castro, Gerla Chinelate, Ofir de Andrade e Guilherme Norjosa por serem minha força nos momentos de maiores tribulações. Vocês fazem parte da realização deste trabalho.

Ao querido Humberto Izidro que sempre esteve presente desde os meus planos de fazer mestrado.

Aos meus pais, Gilberto e Fátima, por me darem a oportunidade que nunca tiveram, fazendo, às vezes, sacrifícios pela minha educação e pedindo em troca apenas a minha dedicação.

Aos meus irmãos, Cristiano e Gisele, e à minha amada cunhada, Roberta, que sempre apoiaram meus estudos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, torceram pelo meu sucesso e contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

RESUMO

Várias estratégias têm sido utilizadas para que materiais, quando em contato com sangue, possam reduzir a adsorção de proteínas do plasma e, conseqüentemente, a probabilidade de formação de trombos. Além disso, outro problema associado é a calcificação, descrita como um processo de formação de fosfato de cálcio, que é a causa primária de falhas em tecidos moles e implantes devido à deposição destes sais. A quitosana e a carragenana são dois polímeros que apresentam propriedades que os tornam promissores para utilização como biomateriais. A quitosana, em função dos grupos amino em sua estrutura, pode promover a adesão plaquetária, sendo necessária uma modificação química, como reações de sulfonatação, que visam diminuir a adsorção de proteínas plasmáticas. A presença de grupos sulfato na carragenana pode contribuir para a obtenção de superfícies com propriedades antitrombogênicas sem a necessidade de modificação química da estrutura. A formação de complexos polieletrólíticos (PECs) alia a biocompatibilidade superior da quitosana com a densidade de carga da carragenana, gerada pela presença dos grupos sulfato. Esse trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da calcificação e da trombogenicidade de filmes de quitosana e carragenana caracterizando-os através de técnicas de microscopia e espectroscopia, assim como realizar estudo de revestimento de superfície metálica utilizando estes polímeros. Observou-se uma diminuição nos efeitos de calcificação para as blendas de quitosana e carragenana e nos filmes sulfonatados (Ca/P 0,11 ou ausência de fósforo), reduzindo a formação e deposição de sais de cálcio quando comparados com a quitosana natural (Ca/P 2,78). Ensaio de adesão plaquetária mostraram melhoria das superfícies de quitosana quando modificadas pela sulfonatação, ou quando misturadas com carragenana, apresentando adesão, em média, de 1 a 2 plaquetas/0,01 mm², contra a formação de trombos em filme de quitosana. No ensaio de revestimento, a modificação da superfície metálica foi evidenciada pela alteração da quantidade percentual de carbono e oxigênio na composição química da superfície quando comparado o aço eletropolido bruto e após a inserção da quitosana. As sucessivas mudanças sofridas pelo ângulo de contato reforçam o sucesso do *grafting* dos polímeros, através da formação de uma camada hidrofílica tanto para quitosana natural quanto para a sulfonatada. Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que a quitosana sulfonatada e as blendas de quitosana/carragenana mostram-se promissoras para serem utilizadas como biomateriais em contato com sangue.

Palavras-chave: Coagulabilidade, calcificação, quitosana sulfonatada, carragenana

ABSTRACT

Various strategies have been proposed to reduce the plasma proteins adsorption and consequently the probability of thrombus formation on materials when contacted with blood. Furthermore, another problem associated with biomaterials is the calcification process, which is described as calcium phosphate formation, which is the primary cause of failures in soft tissues and implants. Chitosan and carrageenan are two polymers that show properties that make them promising for use as biomaterials. Chitosan, due to amino groups in its structure, may promote platelet adhesion, being necessary to perform a chemical modification on it, such as sulfonation reactions, in order to reduce plasma protein adsorption. The presence of sulfate groups in carrageenan structure may contribute to obtain surfaces with antithrombogenic properties without the need of chemical modification on its structure. The formation of polyelectrolyte complexes (PECs) combines the high biocompatibility of chitosan with the charge density of carrageenan, generated by the presence of sulfate groups. This work aimed to study the effects of calcification and thrombogenicity of chitosan and carrageenan films, characterizing them by microscopy and spectroscopy techniques. We also conducted the study of metal surfaces coating using these polymers. A reduction in the effects of calcification for chitosan and carrageenan blends and for sulfonated chitosan films (Ca/P 0.11 or phosphate absence) was observed, reducing the formation and deposition of calcium salts when compared with pristine chitosan (Ca/P 2.78). Assays of platelet adhesion for chitosan surfaces when modified by sulfonation reaction or when blended with carrageenan, showed adhesion on average of 1 to 2 platelets/0.01mm² against thrombus formation on chitosan film. For the coating essays, the modification on metal surface was characterized by the changing of carbon and oxygen percentage amount on the chemical composition surface, comparing the raw electropolished steel and grafted chitosan. The successive changes observed in the contact angle reinforce the success of the grafting of polymers, forming a hydrophilic layer both for pristine and sulfonated chitosan. From the results obtained, it can be inferred that the sulfonated chitosan and chitosan/carrageenan blends are promising for use as biomaterials in blood contact.

Keywords: Coagulability, calcification, sulfonated chitosan, carrageenan

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Objetivos	13
1.1.1	<i>Objetivo geral</i>	13
1.1.2	<i>Objetivos específicos</i>	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Biomateriais	14
2.1.1	<i>Hemocompatibilidade</i>	16
2.2	Calcificação	20
2.3	Quitosana	22
2.3.1	<i>Modificação da quitosana</i>	23
2.4	Carragenana	26
2.5	Complexos polieletrólíticos	27
2.6	Revestimento	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Reagentes	31
3.2	Soluções	31
3.2.1	<i>Solução de quitosana natural</i>	31
3.2.2	<i>Solução de κ-carragenana</i>	32
3.2.2.1	<i>Solução para filmes</i>	32
3.2.2.2	<i>Solução para blendas</i>	33
3.2.3	<i>Soluções para ensaio de calcificação</i>	33
3.3	Filmes	34
3.3.1	<i>Filmes de quitosana natural</i>	34
3.3.2	<i>Filmes de κ-carragenana</i>	34
3.3.3	<i>Filmes de quitosana sulfonatada</i>	36
3.3.4	<i>Blendas quitosana/carragenana</i>	37
3.4	Modificação da solução de quitosana para os ensaios de revestimento	38
3.5	Ensaio de adesão plaquetária	39
3.5.1	<i>Coleta de sangue</i>	39
3.5.2	<i>Adesão plaquetária</i>	39
3.5.3	<i>Microscopia confocal</i>	39
3.5.4	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	40
3.6	Ensaio de calcificação	40
3.6.1	<i>Fluido corpóreo simulado (SBF)</i>	40
3.6.2	<i>Calcificação</i>	40
3.6.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	41
3.6.4	<i>Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	41
3.7	Ensaio de revestimento	42
3.7.1	<i>Eletropolimento do substrato metálico</i>	42
3.7.2	<i>Aminilização da superfície metálica</i>	44
3.7.3	<i>Grafting do PEGb</i>	44
3.7.4	<i>Grafting dos polímeros</i>	44
3.7.5	<i>Caracterização da superfície</i>	45
3.7.5.1	<i>Espectroscopia de Foto-Elétrons de Raios-X (XPS)</i>	45
3.7.5.2	<i>Microscopia de Força Atômica (MFA)</i>	45

3.7.5.3	<i>Determinação do ângulo de contato (AC)</i>	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1	Caracterização dos filmes	47
4.1.1	<i>Espessura</i>	47
4.1.2	<i>Grau de substituição</i>	48
4.2	Ensaio de adesão plaquetária	49
4.2.1	<i>Microscopia confocal</i>	50
4.2.2	<i>Microscopia de força atômica</i>	54
4.3	Ensaio de calcificação	64
4.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	65
4.3.2	<i>Microanálise elementar</i>	65
4.3.3	<i>Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier</i>	77
4.4	Ensaio de revestimento	81
4.4.1	<i>Espectroscopia de Foto-Elétrons de Raios-X (XPS)</i>	81
4.4.2	<i>Microscopia de Força Atômica (MFA)</i>	83
4.4.3	<i>Ângulo de contato</i>	86
5	CONCLUSÕES	88
5.1	<i>Sugestões para futuros trabalhos</i>	89
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

A utilização de biomateriais remonta a um passado distante, ninguém sabe ao certo quando o homem passou a utilizar materiais no tratamento de feridas e tecidos perdidos (DUCHEYNE *et al.*, 2011). A princípio, estes materiais eram obtidos através de tentativa-erro, com pouquíssimas chances de sucesso. Apenas após a Segunda Guerra Mundial, cientistas e terapeutas passaram a se preocupar mais com a seleção de materiais e a diversificação de seu uso (RATNER *et al.*, 2004; DUCHEYNE *et al.*, 2011).

As principais propriedades desejáveis para um biomaterial são: a) biocompatibilidade; b) baixa citotoxicidade e ausência de efeitos carcinogênicos c) estabilidade química; d) ser de fácil processabilidade e custo aceitável (RATNER *et al.*, 2004; ORÉFICE, PEREIRA & MANSUR, 2006). Dentre estas propriedades, a biocompatibilidade destaca-se em importância, quando o biomaterial entra em contato com o sangue, devido à hemocompatibilidade.

Várias estratégias têm sido utilizadas, separadamente ou em conjunto, para melhorar a biocompatibilidade de um biomaterial, tais como: derivatização para mimetizar um material mais biocompatível (AMIJI, 1998), revestimento com outro biomaterial que apresente maior biocompatibilidade (LI *et al.*, 2011), liberação controlada de fármacos (SHAIKH *et al.*, 2013) ou fatores de crescimento (RUAN *et al.*, 2013), entre outras.

Tanto polímeros sintéticos como naturais têm sido propostos para uso em dispositivos médicos em contato com o sangue, por apresentarem boas propriedades de hemocompatibilidade (AMIJI, 1995; CHUANG *et al.*, 1999; DON *et al.*, 2006; LIN, YU e YANG, 2006; ZHU e CHEN, 2006; MA, MAO e GAO, 2007). Como esta é uma propriedade de importância fundamental em muitas aplicações biomédicas, a melhoria das propriedades de hemocompatibilidade de biomateriais tem sido foco de muitas pesquisas recentes.

Estes biomateriais quando em contato com sangue podem acarretar: a) adsorção de proteínas, lipídios, cálcio ou outras substâncias a partir do sangue na superfície do biomaterial, b) adesão de plaquetas, leucócitos ou eritrócitos sobre o biomaterial, c) ativação das plaquetas ou degranulação de leucócitos, além de adenosina difosfato, trombina e serotonina para ativar outras plaquetas restantes, bem como a reação de coagulação e a formação de trombos (FARHATNIA *et al.*, 2013). Entretanto, a relação precisa entre a natureza da superfície, compatibilidade sanguínea e o mecanismo de trombose induzido pela superfície, assim como de calcificação sobre a superfície é objeto de estudo.

A calcificação ou biomineralização é descrita como um processo de formação de fosfato de cálcio e outros compostos de cálcio. O interesse pela calcificação, e de como controlá-la, deve-se ao fato de que ela pode ser altamente desejada, quando ocorre em locais como ossos e dentes, ou o contrário, quando se dá em tecidos moles e implantes onde não é desejada a deposição dos sais de cálcio (válvulas cardíacas, implantes mamários), sendo esta a causa primária de falhas. Assim, faz-se necessário o conhecimento detalhado do mecanismo de calcificação ao qual um biomaterial é exposto ao ser implantado (BEPPU, 1999).

A quitosana é um polissacarídeo obtido através da desacetilação alcalina da quitina, sendo constituída por monômeros de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetoamino-2-desoxi-D-glicopiranosose ligados entre si através de ligações do tipo β (1 \rightarrow 4). A presença destes grupos amino mostra-se uma grande vantagem, pois é possível realizar modificações químicas na estrutura da quitosana a fim de obter derivados mais adequados à aplicação desejada. Um exemplo de modificação química são as reações de sulfonatação, que visam conferir aos polímeros características similares às da heparina, dextrana sulfato e polietileno glicol sulfonato (AMIJI, 1997; AMIJI, 1998), diminuindo, desta forma, a adesão de proteínas plasmáticas. Nesta reação, grupos sulfatos ou sulfonatos são introduzidos na cadeia polimérica através dos grupos hidroxila (O-substituição) ou dos grupos amino (N-substituição) pela utilização de agentes sulfatantes (ácido clorossulfúrico, ácido 5-formil-2-furansulfônico sal de sódio, óleo etc.).

A carragenana é um conjunto de polissacarídeos sulfatados extraído da parede celular de algas vermelhas. É formada por monômeros de D-galactopiranosose e 3,6-anidrogactose ligados entre si através de ligações cruzadas do tipo α (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4). A carragenana divide-se em diversos tipos, sendo os tipos λ , κ e ι os mais abundantes, os quais diferem entre si pelo conteúdo de 3,6-anidrogactose e pelo número de grupamentos sulfato presentes na estrutura ao longo da cadeia. A presença de grupos sulfato na carragenana pode contribuir para a obtenção de superfícies com propriedades antitrombogênicas melhoradas sem a necessidade de modificação química da estrutura.

O revestimento de superfícies combina as propriedades mecânicas e de superfície (propriedades antitrombogênicas e anticalcificante) de um material, garantindo, assim, o sucesso em longo prazo quando implantados (LI *et al.*, 2011). Várias técnicas são utilizadas para o revestimento de biomateriais, entre elas: *dip*, *grafting*, eletrofiação, *layer-by-layer*, Langmuir-Blodgett, deposição de vapor químico, transferência de átomo de polimerização radical e deposição por plasma (FARHATNIA *et al.*, 2013). As vantagens de cada método

variam de acordo com a aplicação. A deposição por plasma, por exemplo, deve proporcionar uma melhor aderência entre a camada de polímero e uma estrutura metálica, quando submetido à deformação, fricção, ou tensão de cisalhamento induzidas pelo fluxo sanguíneo, do que um revestimento feito por *dip*. Esta melhor adesão é devido à ativação inicial da superfície metálica (HOLVOET *et al.*, 2010).

Diante do exposto, o presente estudo visa estudar os efeitos da calcificação e da adesão plaquetária em filmes de quitosana, quitosana sulfonatada, carragenana e complexos polieletrólitos de quitosana e carragenana caracterizando-os através de técnicas de microscopia e espectroscopia, assim como realizar estudo de revestimento de superfície metálica, através de *grafting*, utilizando estes polímeros.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de coagulabilidade e calcificação em filmes de quitosana sulfonatada e blendas de quitosana e carragenana.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Produzir membranas densas de quitosana e carragenana e caracterizá-las;
- b) Realizar ensaio de adesão plaquetária analisando os efeitos provocados através de microscopia confocal e microscopia de força atômica (MFA);
- c) Avaliar o grau de calcificação *in vitro* através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- d) Estudar o revestimento de superfícies de aço inoxidável utilizando técnicas de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), microscopia de força atômica (MFA) e ângulo de contato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais

O uso de materiais para o tratamento de feridas ou substituição de órgãos e membros perdidos remonta a um passado longínquo da história da humanidade. Não se sabe ao certo quando o ser humano começou a desenvolver tais dispositivos (DUCHEYNE *et al.*, 2011). Quando crianças, nós aprendemos a cantar sobre um pirata com perna de pau e olho de vidro sem nos darmos conta de que estamos falando de exemplos antigos de biodispositivos. O Rigveda, a primeira coleção de hinos sagrados hindu datados de 1500 a 1200 AC, conta sobre como Vishpla, uma rainha guerreira que perde sua perna em batalha, recebe dos deuses Ashvins uma perna de ferro em substituição ao membro perdido (CANTOS, 2005). A história de olhos artificiais, da antiguidade aos nossos dias, tem sido descrita (GU *et al.*, 2000). Em 2007, arqueólogos italianos e iranianos encontraram na necrópole da cidade de Shahr-i-Sokhta, no deserto de Sistan, um olho artificial semi-esférico feito com um derivado de pasta de betume, apresentando um círculo central para representar a íris e linhas de ouro “como raios de Sol”. A idade deste olho foi estimada em aproximadamente 5.000 anos (ENOCH, 2007).

Os primeiros materiais não levavam em conta a interação que estes desenvolveriam com o organismo, sendo usados apenas pela funcionalidade e usabilidade (RATNER *et al.*, 2004). A partir da Segunda Guerra Mundial, cientistas e terapeutas passaram a se preocupar mais com a seleção de materiais e a diversificação de seu uso (RATNER *et al.*, 2004; DUCHEYNE *et al.*, 2011). É conveniente separar a história dos biomateriais em quatro gerações (RATNER *et al.*, 2004).

A primeira geração é marcada pelo empirismo. Os dispositivos não tinham preocupação estética e em sua maioria eram produzidos com materiais de origem natural, tais como ouro e marfim em próteses dentárias, vidro ou metal para globos oculares e madeira para confecção de membros perdidos (RATNER *et al.*, 2004; CANTOS, 2005).

A segunda geração passa a usar novos materiais, mais duráveis e inertes, que haviam sido desenvolvidos para os tempos de guerra. Entre estes materiais estão silicones, poliuretanos, Teflon, Nylon, metacrilatos, titânio e aço inoxidável (RATNER *et al.*, 2004).

A terceira geração é marcada pelo surgimento dos materiais bioengenheirados, ou seja, os materiais foram desenvolvidos especificamente para o uso como biomateriais. Muitos

materiais da geração passada foram estudados e modificados para uso exclusivo como biomateriais como, por exemplo, Teflon poroso, polietilenoglicol, hidroxiapatita e biovidro.

A quarta geração, ou era contemporânea, é a era onde os biomateriais são desenvolvidos para controlar respostas biológicas específicas (RATNER *et al.*, 2004). Várias ideias da Ciência de Materiais passaram a ser aplicadas, sendo uma delas, a modificação de superfície, explorada neste estudo.

Na antiguidade, os materiais usados nos dispositivos não recebiam uma denominação específica. Somente na década de 1960, com o surgimento do termo biomaterial mesmo sem uma definição formal, é que eles passaram a ser uma classe especial de materiais (DUCHEYNE *et al.*, 2011). Hoje, biomaterial pode ser definido como “qualquer substância (que não seja um fármaco) ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que possa ser usada por um período de tempo, como um todo ou parte de um sistema, que trata, melhora ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (DEE, PULEO e BIZIOS, 2002). Esta definição mostra que um biomaterial difere dos outros materiais pela necessidade de atender o requisito de biocompatibilidade, que é “a habilidade de um material desempenhar sua função com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica” (RATNER *et al.*, 2004; DUCHEYNE *et al.*, 2011). A ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar que visa o desenvolvimento de materiais para desempenhar, aumentar ou substituir uma função natural.

Várias propriedades podem ser desejadas nos biomateriais de acordo com a função que este venha a desempenhar. Entre estas propriedades, a mais importante seria a biocompatibilidade (MA, MAO & GAO, 2007; BAUER *et al.*, 2013). A princípio, biocompatibilidade era definida como a característica que um material tinha em não interagir com o organismo, ou seja, qualquer material biocompatível seria tão bem aceito pelo organismo que, ao ser implantado, formaria, para o organismo, um tecido homogêneo composto pelo próprio tecido junto com o biomaterial. Entretanto, percebeu-se que qualquer material sempre provoca uma resposta dos tecidos vizinhos. Em alguns casos, esta interação material-tecido é totalmente desejada, em outros, um material pode ser biocompatível para algumas aplicações e não-biocompatível para outras (ORÉFICE, PEREIRA & MANSUR, 2006).

Assim, para se estudar biocompatibilidade é importante observar quatro aspectos importantes:

- Fenômenos físico-químicos na interface material-tecido nos primeiros instantes após o contato;

- Respostas dos tecidos à presença do material;

- Mudanças ocorridas no material promovidas pelo meio;

- Reações de outras partes do organismo que não estejam em contato direto com o material (KASEMO & LAUSMAA, 1994).

Entre outras propriedades dos biomateriais podemos citar algumas, tais como: resistência mecânica (cerâmicas utilizadas em implantes dentários), flexibilidade (lentes intraoculares), biodegradabilidade (suturas internas) e não-toxicidade, sendo esta a principal propriedade, pois é requerido que o biomaterial não ative uma reação adversa do organismo ao ser colocado em ação (CZERNUSZKA, 1996).

Os biomateriais podem ser utilizados para diversas aplicações. Na Engenharia de Tecidos e Órgãos, são utilizados para válvulas cardíacas (HASAN *et al.*, 2014), suportes (LEE *et al.*, 2014) ou membranas (YAMANO *et al.*, 2014) para regeneração óssea, recobrimento de ferimentos/lesões (LAÇIN, 2014) e peles artificiais (CIRILLO *et al.*, 2014). Nos dispositivos de entrega os biomateriais são utilizados para realizar uma liberação controlada e direta no local de ação. Estes sistemas de entrega são utilizados para liberação de fármacos (EBERLE *et al.*, 2014), vacinas (EVEN *et al.*, 2014), genes (DU *et al.*, 2014) e ácidos nucleicos (YAMADA *et al.*, 2014). No desenvolvimento de próteses, eles são utilizados para lentes intraoculares (OGURA *et al.*, 2014), próteses dentárias (JAIN *et al.*, 2013) e stents (LAUTO *et al.*, 2001; NELKEN & SCHNEIDER, 2004; HAÏDOPOULOS *et al.*, 2006; LEWIS *et al.*, 2008; TOUZIN *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2009; HANADA *et al.*, 2013; FARHATNIA *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2013; FORTIER, GULLAPALLI & MIRSHAMS, 2014).

2.1.1 Hemocompatibilidade

Tanto polímeros sintéticos como naturais têm sido propostos para uso em dispositivos médicos em contato com o sangue, por apresentarem boas propriedades de hemocompatibilidade (AMIJI, 1995; CHUANG *et al.*, 1999; DON *et al.*, 2006; LIN, YU e YANG, 2006; ZHU e CHEN, 2006; MA, MAO e GAO, 2007). Como esta é uma propriedade de importância fundamental em muitas aplicações biomédicas de materiais, a melhoria das

propriedades de hemocompatibilidade de biomateriais tem sido foco de muitas pesquisas recentes.

Estes biomateriais quando em contato com sangue podem acarretar: a) adsorção de proteínas do plasma, lipídios, cálcio ou outras substâncias a partir do sangue na superfície do biomaterial, b) adesão de plaquetas, leucócitos ou eritrócitos sobre o biomaterial, c) ativação das plaquetas ou degranulação de leucócitos, além de difosfato adenosina, trombina e serotonina para ativar outras plaquetas restantes, bem como a reação de coagulação e a formação de trombose (KEUREN *et al.*, 2013; FARHATNIA *et al.*, 2013).

Da perspectiva do padrão ISO, a avaliação da hemocompatibilidade pode ser feita através de cinco testes: trombose, coagulação, plaquetas, hematologia e imunologia (sistema complemento e leucócitos) (BALAN & VERESTIUC, 2014).

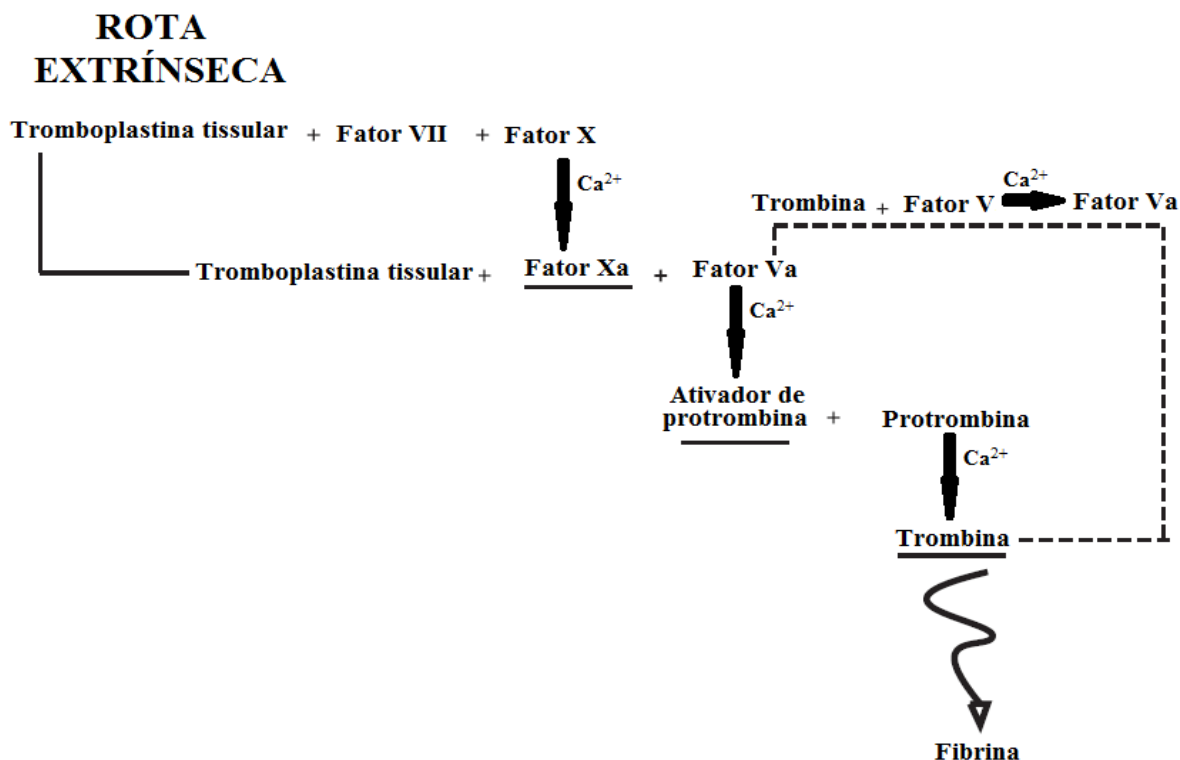
Ao contrário da biocompatibilidade, o termo hemocompatibilidade não está bem definido (BALAN & VERESTIUC, 2014). Labarre (2001) definiu um superfície hemocompatível como “uma superfície capaz de manter os processos de coagulação e inflamação sob controle em sua interface quando em contato com sangue, em dadas condições hemodinâmicas”. Por outro lado, Gorbet e Sefton (2004) levam em consideração apenas a resposta trômbica causada pelo material quando em contato com o sangue. Porém, ambos os casos levam em consideração o processo de coagulação.

O mecanismo de coagulação, também chamado de cascata de coagulação, pode ser uma resposta do organismo a um trauma causado aos tecidos e vasos sanguíneos ou a presença de um corpo exógeno (DEE, PULEO & BIZIOS, 2002). Caso o início da cascata de coagulação seja decorrente de um trauma ao vaso ou tecidos circum-vizinhos, a coagulação seguirá uma rota chamada extrínseca, se for originada por um material estranho ao corpo, seguirá a via intrínseca.

A rota extrínseca (Figura 1) começa com a liberação de tromboplastina tissular que irá se combinar e ativar o fator VII. Este complexo por sua vez, irá ativar enzimaticamente o fator X na presença de íons de Ca^{2+} . O fator Xa se liga à tromboplastina, ou fosfolípidos provenientes de plaquetas, e juntamente com o fator Va forma um ativador de protrombina. Este complexo promove a proteólise de protrombina gerando fragmentos de trombina, que age como uma enzima. Estes fragmentos enzimáticos ativam o fator V quando entram em contato com ele. A trombina também é responsável pela clivagem de outra proteína sanguínea, o fibrinogênio. O resultado dessa clivagem é o monômero de fibrina. Estes monômeros se polimerizam, com a ajuda de um fator estabilizante (fator XIII) que é

liberado por plaquetas e ativado pela trombina, formando uma rede de fibrina, que irá reter células sanguíneas formando um coágulo.

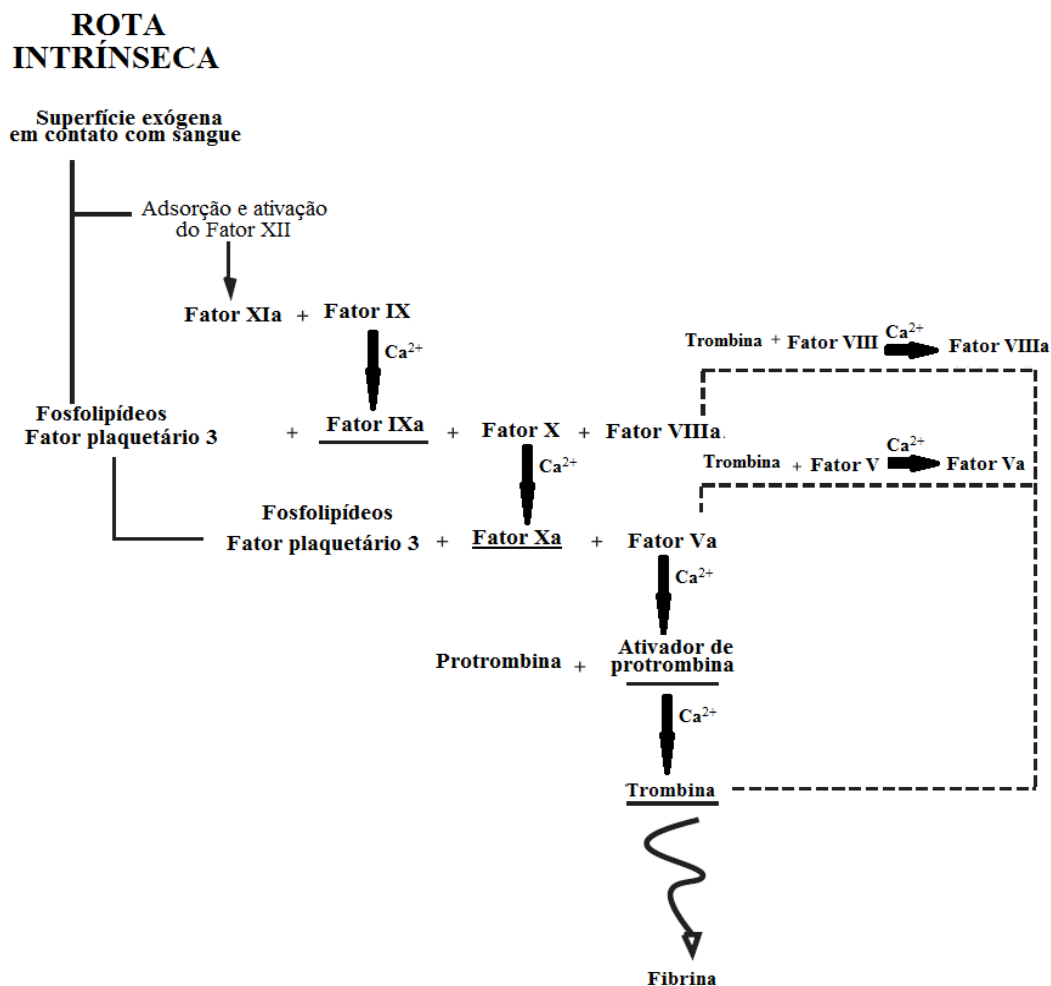
Figura 1 - Fluxograma da rota extrínseca da cascata de coagulação



Fonte: Elaborada pelo autor

A rota intrínseca (Figura 2) é iniciada quando uma superfície exógena (diferente do endotélio normal de um vaso sanguíneo) entra em contato com o sangue. Em um primeiro momento, o fator XII se adsorve a superfície e é ativado, em seguida o fator XIIa ativa o fator XI. O fator XIa se combina com o fator IX e na presença de cálcio promove a ativação deste último. O fator IXa então se liga aos fosfolipídios presentes na membrana celular das plaquetas, ou ao fator plaquetário 3, e juntamente com o fator VIIIa (ativado pela trombina na presença de Ca^{2+}) promove a ativação do fator Xa, o qual irá se combinar com os fosfolipídeos das plaquetas ou do fator plaquetário 3 e juntamente com o fator Va (ativado pela trombina na presença de Ca^{2+}) irá formar o ativador de protrombina. A partir deste ponto, a rota intrínseca segue a mesma cascata que a rota extrínseca, sendo a cascata chamada de rota comum (Figura 3) deste ponto em diante.

Figura 2 - Fluxograma da rota intrínseca da cascata de coagulação

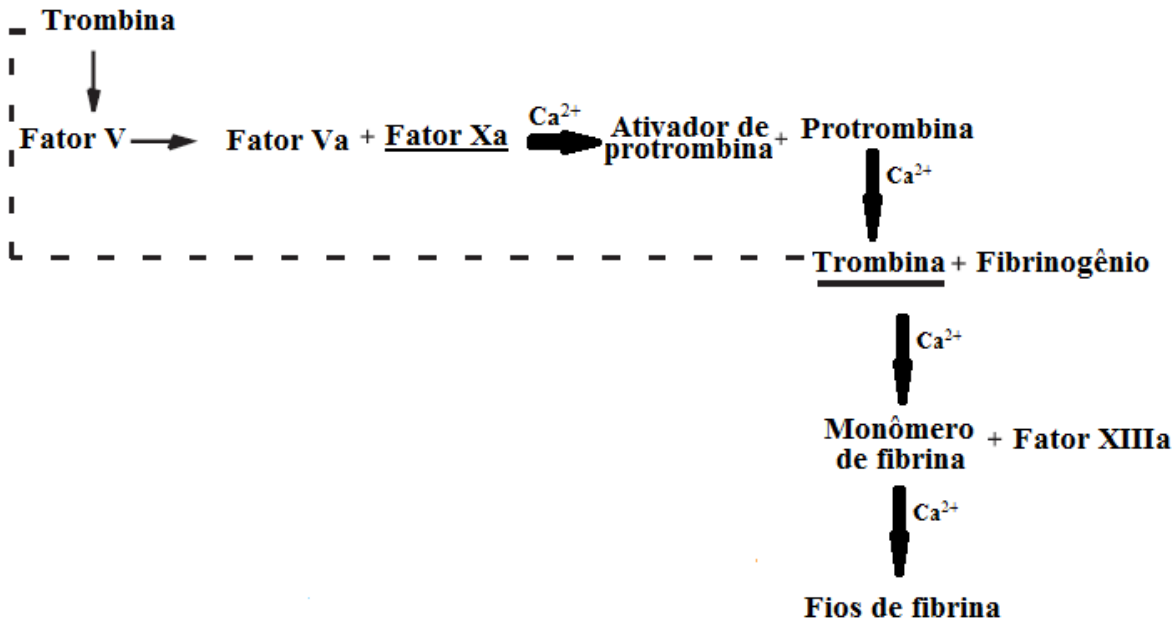


Fonte: Elaborada pelo autor

É importante notar que existem alguns elementos chaves na cascata de coagulação: cálcio, plaquetas, trombina e fator X. O controle destes elementos pode resultar em um mecanismo de anticoagulação. De fato, tubos para coleta de sangue se utilizam de substâncias quelantes, tais como citrato de sódio e EDTA, para sequestrar os íons de cálcio presentes no sangue e impedir a cascata de coagulação (DEE, PULEO & BIZIOS, 2002). Este mecanismo, porém, não seria viável para ser utilizado *in vivo*, pois qualquer corte resultaria em uma hemorragia. O controle, quando se trata de um biodispositivo, deve ser feito de forma localizada. Este controle localizado é possível através de engenharia da superfície que irá entrar em contato com o sangue.

Figura 3 - Fluxograma da rota comum da cascata de coagulação

ROTA COMUM



Fonte: Elaborada pelo autor

A superfície pode evitar o mecanismo de coagulação através de: a) adsorção de antitrombina III (AT III), uma proteína sérica que inibe a expressão da trombina e do fator Xa; b) repulsão de proteínas sanguíneas carregadas negativamente impedindo a adesão de plaquetas; ou c) ação conjunta dos itens a e b (JURD *et al.*, 1995; AMIJI, 1998; SHANMUGAM & MODY 2000; DEE, PULEO & BIZIOS, 2002; KEUREN *et al.*, 2003; ZHU & CHEN, 2006; BALAN & VERESTIUC, 2014).

2.2 Calcificação

A calcificação, ou biomineralização, é um processo onde ocorre formação de depósitos de fosfato ou outros sais de cálcio. É tida como normal quando ocorre em locais esperados (ossos, dentes e materiais osteoindutivos), e anormal, ou patológica, quando se dá em tecidos moles e implantes onde não é esperada a deposição dos sais de cálcio (SCHOEN & LEVY, 2004).

A calcificação patológica pode ser classificada em:

a) Distrófica: ocorre em biomateriais ou tecidos lesionados, em indivíduos com metabolismo normal de cálcio;

b) Metastática: ocorre em tecidos inicialmente normais devido a metabolismo anormal de cálcio.

As condições que favorecem ambos os tipos podem atuar de forma sinérgica, ou seja, em condições de metabolismo anormal de cálcio, a calcificação em um biomaterial pode ter sua velocidade elevada (SCHOEN & LEVY, 2004).

A fase mineral formada é um fosfato de cálcio pouco cristalino chamado de apatita, cuja fórmula química é $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})$, um composto muito semelhante com a hidroxiapatita de cálcio, mineral responsável por promover a rigidez estrutural dos ossos e que tem fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (SCHOEN & LEVY, 2004).

Em biomateriais, a calcificação é responsável por falhas ocorridas, comprometendo o desempenho do dispositivo e reduzindo seu tempo de vida útil (PATHAK *et al.*, 1990). Entre os dispositivos prejudicados pela calcificação, estão: válvulas cardíacas biológicas e sintéticas, corações artificiais, dispositivos de assistência ventricular, próteses urinárias, dispositivo intrauterino, lentes de contato gelatinosas e bexigas artificiais (SCHOEN & LEVY, 2004; CHANDRAN 2007).

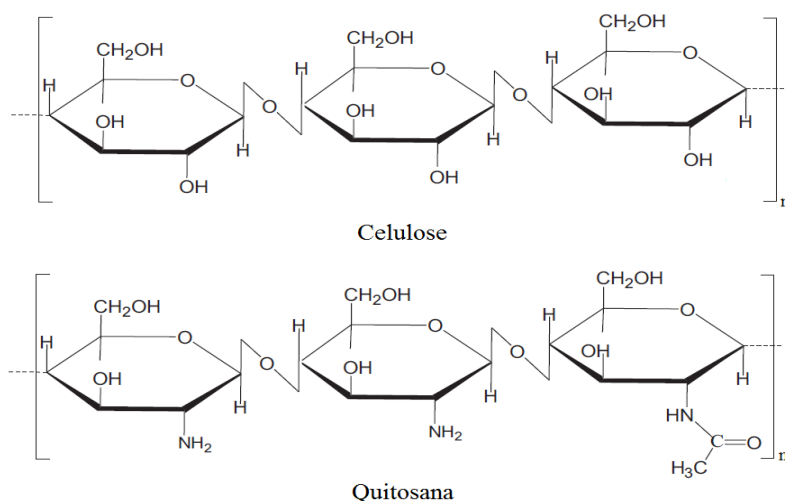
A necessidade de se obter uma superfície livre de calcificação tem motivado pesquisas buscando o desenvolvimento de tratamento que inibam a calcificação (CHANDRA, 1994; SHANTHI & RAO, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2010; POLAK *et al.*, 2013; GALLYAMOV *et al.*, 2014). Chandra (1994) estudou o uso de quitosana para prevenir a calcificação de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído. O resultado aponta que a quitosana foi capaz de reduzir a calcificação através da neutralização dos grupos aldeído livre e preenchimento de espaços que poderiam ser sítios de deposição de cálcio. Resultados similares foram obtidos por Nogueira *et al.* (2010) ao tratarem pericárdio bovino com quitosana e fibroína de seda. As amostras tratadas com os polímeros não apresentaram qualquer sinal de calcificação mesmo após serem imersas em solução rica em cálcio.

Embora diversos estudos tratem dos efeitos anticálcificantes de sulfatos (PATHAK *et al.*, 1990; CHANDRA, KURIBAYASHI & ABE, 1997; VYAVAHARE *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 1997; CHANDRA, KURIBAYASHI & ABE, 1999; LEE *et al.*, 2001; ARENAZ *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2014), até a presente data não se tem conhecimento de pesquisas avaliando o efeito anticálcificante da carragenana.

2.3 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo obtido pela N-desacetilação alcalina da quitina, polissacarídeo natural que está presente no exoesqueleto de insetos e crustáceos, na parede celular de fungos e leveduras, entre outros (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; LARANJEIRA & FÁVARE, 2009; DASH *et al.*, 2011). A molécula de quitosana é uma cadeia linear constituída por monômeros de 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose ligados entre si através de ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2007; LARANJEIRA & FÁVARE, 2009; DASH *et al.*, 2011). A quitosana possui uma estrutura química muito similar à da celulose, diferenciando-se desta pela presença de grupos amino ou acetamida no carbono 2 do anel glicosídico (Figura 4).

Figura 4 - Comparativo entre as estruturas da celulose e da quitosana.



Fonte: Elaborada pelo autor

A principal fonte comercial de quitosana provém dos resíduos da indústria pesqueira (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2007). No mundo todo, cascas de camarão e carapaça de siris, caranguejos e lagostas são utilizadas para produção de toneladas de quitina (AZEVEDO *et al.*, 2007; DASH *et al.*, 2011). A utilização de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 40-45% (m/v) a 90-120°C por 4-5h determinará o grau de desacetilação e o peso molecular da quitosana obtida (DASH *et al.*, 2011).

A quitosana apresenta muitas características desejáveis, tais como biodegradabilidade, não toxicidade, biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (AZEVEDO

et al., 2007; PHILLIPS & WILLIAMS, 2009; KONG *et al.*, 2010). Devido a estas características, tem sido utilizada na agricultura (ZHANG *et al.*, 2014), no tratamento de água (ZEMMOURI *et al.*, 2013), na indústria cosmética (PARK, JO & JEON, 2014) e biofarmacêutica (SETH *et al.*, 2014), como agente bactericida (PINHAS *et al.*, 2014) e, sobretudo, na área biomédica, com ênfase na liberação de fármacos (PAVALOIU *et al.*, 2014) e engenharia de tecidos (CROISIER & JÉRÔME, 2013). Sua natureza catiônica, devido aos grupos amino ao longo da cadeia, é responsável por estas características, sendo o único polímero de origem natural carregado positivamente (RINAUDO, 2006; CROISIER & JÉRÔME, 2013).

Embora apresente várias propriedades desejadas, a quitosana tem uso restrito para aplicações que envolvam contato com o sangue devido a sua trombogenicidade (AMIJI 1998; ZHU & CHEN, 2006; DON *et al.*, 2006; BALAN & VERESTIUC, 2014). De acordo com Balan & Verestiuc (2014), duas estratégias podem ser utilizadas para conferir atividade antitrombogênica à quitosana:

- a) Associação da quitosana com outra substância que apresente propriedade complementar (blendas);
- b) Modificação da estrutura da quitosana através de N-substituição, O-substituição ou N,O-substituição.

Várias pesquisas foram realizadas usando estas duas estratégias. Amiji (1995) desenvolveu uma membrana de hemodiálise a partir de uma blenda de quitosana e óxido de polietileno. Don *et al.* (2006) avaliaram a hemocompatibilidade de blendas feitas com quitosana e álcool polivinílico (PVA), desenvolvendo uma superfície aliando a boa viabilidade celular da quitosana com a hemocompatibilidade do PVA. Carneiro *et al.* (2013) estudaram a adsorção de proteínas plasmáticas, BSA e fibrinogênio, em blendas de quitosana e carragenana, obtendo um resultado promissor que mostra que o aumento da concentração de carragenana na composição da blenda diminui a adsorção das proteínas estudadas.

2.3.1 Modificação da quitosana

Balan & Verestiuc (2014) citam vários métodos de modificação da quitosana para aumentar a hemocompatibilidade, sendo eles: acilação, sulfatação, modificação com pequenas e macro moléculas, e modificação com fosforilcolina. Comumente, as pesquisas que usam a

estratégia de modificação da estrutura da quitosana são realizadas usando a N-substituição. A presença de aminas primárias ao longo da cadeia de quitosana confere a quitosana uma característica altamente desejada: a facilidade de derivatização (YI *et al.*, 2005; THOMAS & THOMAS, 2013). Outras características da quitosana, como insolubilidade em pH alto, natureza hemostática e catiônica, podem ser revertidas através da sulfonatação da amina, por exemplo, gerando um polímero aniônico, solúvel em pH elevado e anticoagulante (AMIJI, 1998; RINAUDO, 2006; DASH *et al.*, 2011; THOMAS & THOMAS, 2013). Desta forma é possível utilizar a quitosana para um grande número de aplicações.

Sagnella e Mai-Ngam (2005) desenvolveram um composto surfactante para melhorar a hemocompatibilidade de biodispositivos. Este composto consiste em um *backbone* de quitosana com ramificações de polietileno glicol, para repelir a adsorção de proteínas não específicas, e hexanal, para facilitar a adsorção e orientação em substratos hidrofóbicos através de interações hidrofóbicas. Zhu e Chen (2006) realizaram o *grafting* de o-carboximetil quitosana (OCMCS) em uma superfície de polietileno tereftalato (PET) para melhorar a hemocompatibilidade desta superfície. Para demonstrar a eficiência da modificação da quitosana, foi realizado um *grafting* de quitosana (CS) e poliácido acrílico (PAA) em outras superfícies de PET para servir como controle positivo. Neste estudo, a superfície PET-OCMCS apresentou menor adesão plaquetária e redução na adsorção de fibrinogênio quando comparado com as outras duas superfícies.

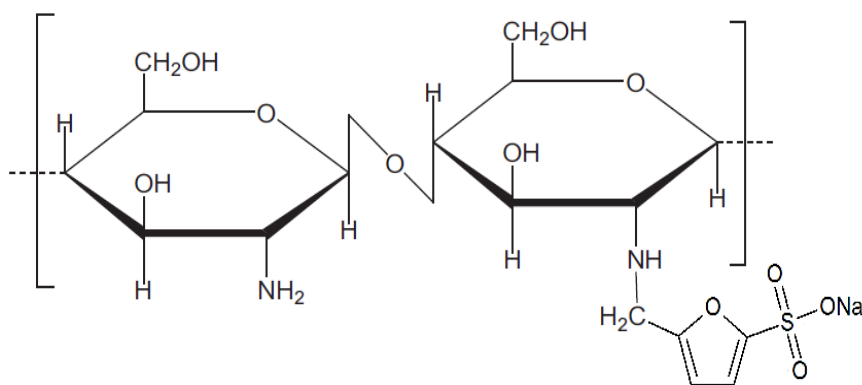
Vários estudos têm sido feitos para melhorar a hemocompatibilidade da quitosana através de reações de sulfatação. O principal objetivo alcançado com a sulfatação da quitosana é a mimetização da heparina. A heparina é um polissacarídeo sulfatado, constituído por monômeros de α -D-glucosamina e ácido urônico, extraído das mucosas de suínos e bovinos. É a molécula biológica que possui a maior densidade de carga negativa (NELSON & COX, 2008). O mecanismo de ação da heparina tem caráter fortemente eletrostático e baseia-se na adsorção de antitrombina, um inibidor de serino protease, que irá promover a inibição da trombina e do fator Xa. Devido à presença de grupos sulfatos, a heparina causa repulsão eletrostática de componentes sanguíneos carregados negativamente, gerando uma superfície mais hemocompatível e diminuindo, ou tornando mais reversível, a adsorção de proteínas (KEUREN *et al.*, 2003). Entretanto, o custo da etapa de purificação da heparina torna-a um produto caro (SHANMUGAM & MODY 2000). A quitosana sulfonatada desponta como um forte candidato para substituir a heparina como agente anticoagulante aplicado em superfícies

por apresentar biocompatibilidade, não toxicidade e antitrombogenicidade. Nos últimos 20 anos, várias rotas de sulfonação da quitosana têm sido exploradas.

Várias pesquisas exploraram diversos agentes de sulfatação da quitosana, tais como: N,N-dimetilformamida (DMF) e trióxido de enxofre (HIRANO *et al.*, 1985), ácido 2-cloroetilsulfônico em meio orgânico (MUZZARELLI, 1992), ácido clorossulfúrico, DMF e trióxido de enxofre para formar um complexo de sulfatação (GAMZAZADE *et al.*, 1997), ácido dicloroacético e piridina-SO₃ (NISHIMURA *et al.*, 1998), carbonato de sódio anidro e trimetilamina-trióxido de enxofre (TMA-SO₃) (JE, PARK & KIM, 2005).

Amiji (1998) desenvolveu uma metodologia de modificação da quitosana utilizando o sal sódico 5-formil-2-furano ácido sulfônico (FFSA). Esta reação de derivatização produz a N-sulfofurfuril-quitosana (Figura 5) que, devido às cargas negativas dos grupos sulfonato, apresenta propriedades não trombogênicas. Neste estudo, foi realizada adesão de plaquetas em lâminas de vidro, uma sem revestimento e outras duas revestidas com quitosana natural e quitosana sulfonatada. A lâmina de vidro sem revestimento apresentou 5,9 plaquetas por 0,01 mm² enquanto que as lâminas revestidas por quitosana, natural e sulfonatada, apresentaram 2,9 e 0,2 plaquetas por 0,01 mm², respectivamente.

Figura 5 - Estrutura da quitosana sulfonatada.



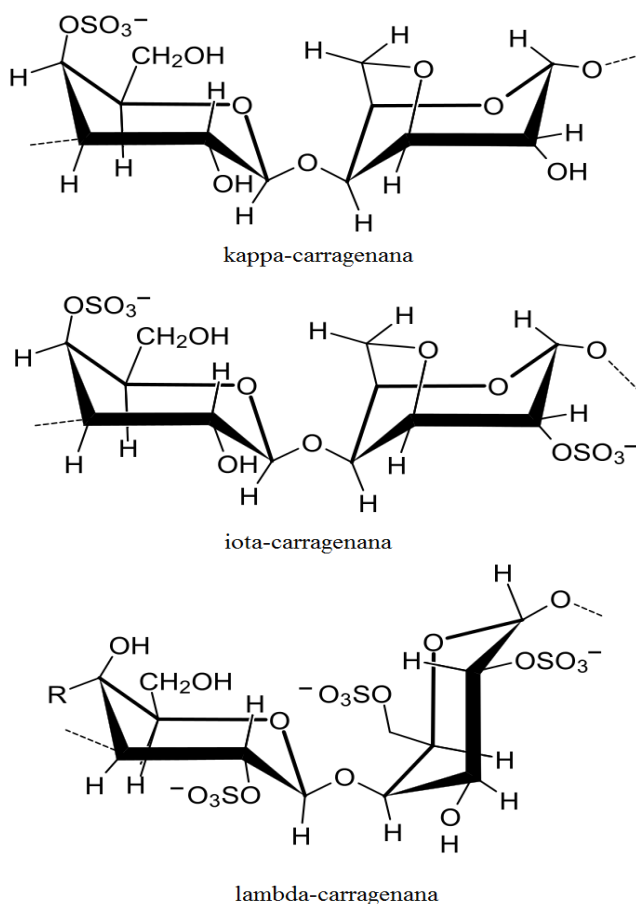
Fonte: Elaborada pelo autor

Lima *et al.* (2013) avaliaram a adsorção de proteínas em filmes de quitosana sulfonatada produzidos com metodologia modificada de Amiji (1998). Através dos resultados é possível verificar que a sulfonação da quitosana promove uma diminuição na taxa de adsorção das proteínas plasmáticas globulares.

2.4 Carragenana

Carragenana é nome dado ao conjunto de polissacarídeos sulfatados extraído da parede celular de algas vermelhas. É formada por monômeros de D-galactopiranosose e 3,6-anidrogactose ligados entre si através de ligações cruzadas do tipo α (1→3) e β (1→4) (Figura 6). A carragenana divide-se em diversos tipos, sendo os tipos λ , κ e ι os mais abundantes, os quais diferem entre si pelo conteúdo de 3,6-anidrogactose e pelo número de grupamentos sulfato presentes na estrutura ao longo da cadeia (BONDU *et al.*, 2010; PRAJAPATI *et al.*, 2014). A presença de grupos sulfato na carragenana pode contribuir para a obtenção de superfícies com propriedades antitrombogênicas melhoradas sem a necessidade de modificação química da estrutura.

Figura 6 - Estruturas da kappa, iota e lambda carragenanas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudos na literatura relatam os efeitos anticoagulantes da carragenana (OPOKU, QIU & DOCTOR, 2006), indicando que este polissacarídeo age de sobremaneira no tempo de trombina. Estudos efetuados sobre a proteólise da trombina constataam a influência da carragenana. Os resultados mostram que a carragenana atua inibindo a proteólise da trombina tanto através da expressão da antitrombina-III, quanto que diretamente (KINDNESS, LONG e WILLIAMSON, 1980). Jurd *et al.* (1995) realizaram um estudo sobre a influência do conteúdo de sulfato de polissacarídeos na coagulação sanguínea. Os resultados mostraram que os grupos sulfatos potencializam a expressão do cofator heparina II, um inibidor de serino protease, que inibe a trombina e o fator IIa, desempenhando um papel de anticoagulante. Embora este mecanismo não diminua a adesão de plaquetas, ele inibe fortemente a agregação plaquetária e, por consequência, reduz a formação de coágulos (SHANMUGAM e MODY, 2000).

2.5 Complexos polieletrólíticos

Os complexos polieletrólíticos (PECs) são uma combinação de polissacarídeos de cargas opostas em solução aquosa (HUGERTH, LELHAM & SUNDELOF, 1997). A atração eletrostática entre os polieletrólitos é responsável pela reticulação iônica dos PECs, sendo esta caracterizada por uma alta densidade de cargas em microambiente hidrofílico (SAKIYAMA *et al.*, 1993; BERGER *et al.*, 2004,). Existem duas formas de preparação de PECs: método de mistura de soluções, onde o contato entre os polieletrólitos se dá dentro de uma solução, e método de complexação superficial, quando o contato ocorre em camadas intercaladas (*layer-by-layer*), com o auxílio de um suporte (ZHAO *et al.*, 2011).

O objetivo dos PECs é combinar diferentes características de cada polímero para a obtenção um material que apresente características desejáveis de ambos. Assim, a utilização de PECs desponta como uma alternativa de biomateriais para dispositivos de contato com sangue, pois são capazes de aliar materiais que sejam biocompatíveis com materiais antitrombogênicos.

Estudos têm sido realizados com PECs formados por misturas de polímeros naturais (SOYSAL, KOFINAS & LO, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2013), misturas de polímeros sintéticos (MORADI, MODARRES & NOROOZI, 2004; LIU *et al.*, 2012) e misturas de polímeros sintéticos com polímeros naturais (LIN, YU & YANG, 2006, IRFAN *et al.*, 2014).

Embora polímeros sintéticos apresentem vantagens como custo e melhores propriedades mecânicas, a utilização de materiais de origem natural é necessária para conferir, ao PEC, biocompatibilidade e biodegradabilidade superiores (SIONKOWSKA, 2011).

Algumas propriedades dos PECs, influenciadas pelas interações eletrostáticas, variam de acordo com a composição e com o pH da mistura (SAKIYAMA *et al.*, 1993; SOYSAL, KOFINAS & LO, 2009; BERGER *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2014). O grau de intumescimento, por exemplo, pode ser influenciado pelo grau de dissociação dos grupos funcionais dos polímeros gerado por mudança no pH (SAKIYAMA *et al.*, 1993).

Diversas pesquisas têm estudado PECs formados entre quitosana e carragenana para aplicações biomédicas dos mais variados tipos, tais como engenharia tissular, dispositivos cardiovasculares e sistemas de entrega (HUGERTH, LELHAM & SUNDELOF, 1997; PARK *et al.*, 2001; TAPIA *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2012; RODRIGUES, COSTA & GRENHA, 2012). A atração eletrostática entre os grupos amino (catiônicos), presentes na quitosana, e os grupos sulfato (aniônicos), presentes na carragenana, é responsável pela formação dos PECs.

Assim, para aplicações que envolvam contato com o sangue, o PEC quitosana/carragenana deve aliar a biocompatibilidade da quitosana com a alta densidade de cargas negativas da carragenana, gerando um material com características antitrombogênicas e que seja bem aceito pelo organismo quando implantado.

2.6 Revestimento

A combinação de propriedades mecânicas e de superfície (propriedades antitrombogênicas e anticalcificante) é fundamental para determinar o sucesso em longo prazo dos biomateriais quando implantados. Uma forma de garantir, ou pelo menos aumentar, as chances de sucesso após o implante é o revestimento com uma substância mais biocompatível (LI *et al.*, 2011). Estes dispositivos revestidos devem apresentar critérios essenciais, tais como: a) a matriz revestida e o polímero de revestimento não devem causar qualquer reação alérgica, ou inflamatória não intencional, nos tecidos circum-vizinhos, que ultrapasse os limites de defesa do hospedeiro; e b) é desejável que a modificação da superfície permita a ligação de peptídeos biomiméticos, anticorpos e/ou fatores de crescimento, ou que seja

possível incorporar nanomateriais e/ou medicamentos para a distribuição localizada ou com controle de liberação (FARHATNIA *et al.*, 2013).

Várias técnicas são usadas para o revestimento de biomateriais. As técnicas mais comumente utilizadas são: *dipping*, eletrofiação, *layer-by-layer*, moldagem, Langmuir-Blodgett, atomização ultrassônica, deposição de vapor químico, transferência de átomo de polimerização radical e deposição por plasma (FARHATNIA *et al.*, 2013). As vantagens de cada método variam de acordo com a aplicação. A deposição por plasma, por exemplo, deve proporcionar uma melhor aderência entre a camada de polímero e uma estrutura metálica, quando submetido à deformação, fricção, ou tensão de cisalhamento induzidas pelo fluxo sanguíneo, do que um revestimento feito por dip. Esta melhor adesão é devido à ativação inicial da superfície metálica (HAÏDOPOULOS *et al.*, 2006; LEWIS *et al.*, 2008; TOUZIN *et al.*, 2008; HOLVOET *et al.*, 2010).

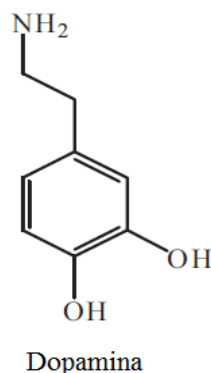
A utilização de catecol para formação de uma camada orgânica seguida do *grafting* do polímero mostra-se como a forma mais eficaz de garantir a fixação do polímero. Catecol, o isômero orto do benzenodiol, ocorre naturalmente em frutas e vegetais, como cebola, maçã e açúcar bruto de beterraba, sendo encontrado também em árvores, como pinheiro, carvalho e salgueiro. Foi primeiramente isolado em 1839 por H. Reinsch através da destilação do catecino (IARC, 1999; SURESH, SRIVASTAVA & MISHRA, 2012). Eles podem atuar como antioxidantes, agentes quelantes ou blocos de construção (FAURE *et al.*, 2013).

Em 1981, uma pesquisa conduzida por Waite e Tanzer identificou o catecol como sendo o principal responsável pela adesão de mexilhões em zonas entremarés e quebra-mares (LEE *et al.*, 2011; FAURE *et al.*, 2013). Um estudo detalhado das proteínas que compõem o byssus, estrutura utilizada pelos mexilhões para se aderirem às rochas, mostrou que em seis delas é possível encontrar 3,4 – dihidroxifenil-L-alanina, também conhecida como dopamina (Figura 7) com porcentagem molar variando de 3 a 30% (FAURE *et al.*, 2013). Vários estudos de modificação de superfície utilizam cloridrato de dopamina como um bloco de construção para a obtenção de novas estruturas (GE *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2010; SAIDIN *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2013; KOHRI *et al.*, 2014).

Em condições alcalinas, o catecol se oxida formando quinona. Esta forma oxidada permite que o catecol reaja com a própria quinona, gerando uma autopolimerização, e grupos tiol e amina, por adição de Michael ou reação de base de Schiff, produzindo camadas funcionais de forma covalente (NAM *et al.*, 2013). A dopamina pode se polimerizar sobre

diversos substratos, incluindo metais nobres, materiais inorgânicos (SiO_2 e Al_2O_3), polímeros orgânicos (polietileno, poliestireno, polietileno tereftalato e policarbonato) além da criação de nanopartículas revestidas de polidopamina (KOHRI *et al.*, 2014).

Figura 7- Estrutura da dopamina



Fonte: Elaborada pelo autor

Uma abordagem comum é a funcionalização de polímeros, lineares ou ramificados, com Dopa ou outros grupos funcionais do catecol utilizando reações químicas padrão (LEE *et al.*, 2011). Desta forma pode-se ter duas abordagens da forma de *grafting*. A primeira é conhecida como *grafting from* e consiste em fazer o *grafting* de um polímero a uma superfície. Nesta abordagem, a superfície é tratada como o *backbone* da reação. A outra abordagem, chamada de *grafting to*, introduz ramificações em cadeias poliméricas bem definidas e posterior deposição sobre a superfície a ser revestida (FAURE *et al.* 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

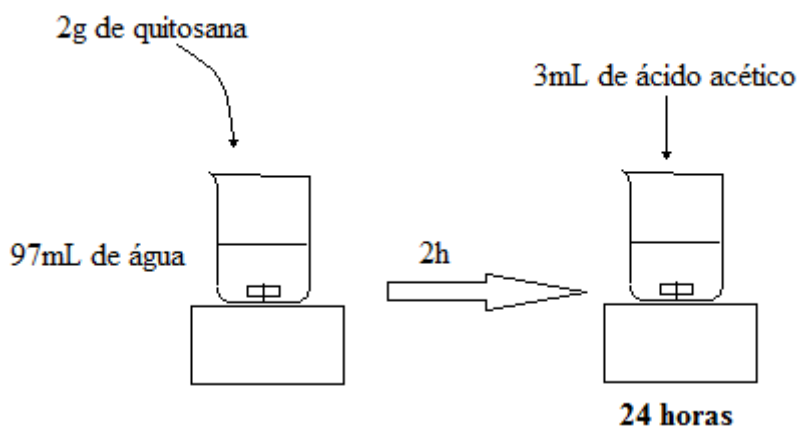
Todos os reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico. Quitosana com grau de desacetilação de 85%, κ -carragenana e dicloridrato de quinacrina foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Ácido 5-formil-2-furansulfônico sal de sódio (FFSA) foi obtido da Alfa Aesar (EUA). Metanol, acetona, ácido acético glacial, ácido clorídrico, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, bicarbonato de sódio, fosfato dibásico de potássio, sulfato de sódio, tris hidroximetilaminometano (TRIS), glutaraldeído, epicloridrina, borohidreto de sódio e hidróxido de sódio foram obtidos da VETEC Química Fina (Brasil). Trietanolamina foi adquirida da Cinética Reagentes & Soluções (Brasil). Para o ensaio de revestimento, foram adquiridas placas de aço inoxidável AISI 316L (espessura 0,5 mm) da Goodfellow Cambridge Limited (Inglaterra). Ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico e ácido fluorídrico foram comprados da Laboratoire MAT (Canadá). Dopamina, Poli(etilenoglicol) bis (carboximetil) éter (PEGb) (Mn 600), N-(3-dimetilamiopropil)-N-etilcarbodiimida hidroxiclорídrico (EDAC) e tampão ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado (MES) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Todas as soluções utilizadas para os ensaios de calcificação foram preparadas com água ultrapura produzida através de sistema Milli-Q.

3.2 Soluções

3.2.1 Solução de quitosana natural

A solução de quitosana 2% (p/p) foi feita através da dispersão 2,0 g de quitosana em 97 mL de água destilada, mantendo o sistema em agitação mecânica por um período de 2 h. Passado esse período, foram adicionados 3,0 mL de ácido acético glacial para promover a solubilização da quitosana. A solução foi recoberta com filme de PVC e mantida sob agitação mecânica por um período de 24 h. Em seguida, foi acondicionada em frascos de esterilização e guardada sob refrigeração até o momento do uso. A Figura 8 ilustra o preparo da solução.

Figura 8 - Preparo da solução de quitosana 2%



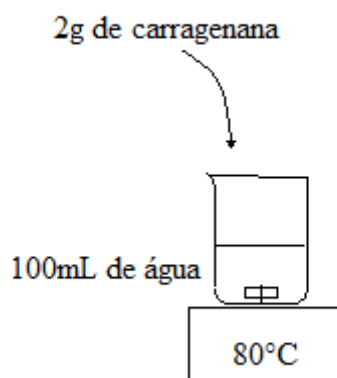
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.2 Solução de κ -carragenana

3.2.2.1 Solução para filmes

A solução de κ -carragenana 2% (p/p) utilizada na produção de filmes foi realizada adicionando-se lentamente 2,0 g de κ -carragenana em 100 mL de água destilada previamente aquecida e mantida a 80°C, mantendo-a sob agitação por 2 h (Figura 9). Após esse período, a solução foi imediatamente utilizada conforme descrito no item 3.3.2, adiante.

Figura 9 - Solução de carragenana para filmes

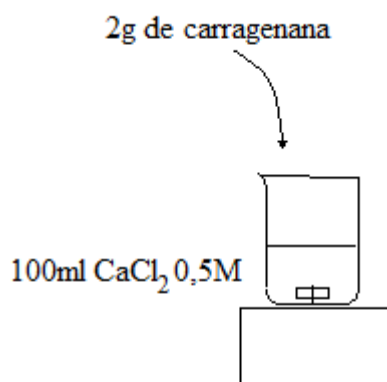


Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.2.2 Solução para blendas

Devido à natureza da carragenana de gelificar rapidamente quando a temperatura é inferior a 80°C, utilizou-se uma variação no modo de preparar a solução para ser utilizada nas blendas de quitosana/carragenana. Foram dissolvidos 2,0 g de κ -carragenana em 100 mL de solução 0,5 M de KCl de forma a se obter uma solução de carragenana 2% (p/p) (Figura 10). A solução foi mantida sob agitação por 2 h. Em seguida, a solução foi utilizada conforme o procedimento descrito no item 3.3.4, adiante.

Figura 10 - Preparo da solução de carragenana para blendas



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.3 Soluções para ensaio de calcificação

As soluções utilizadas no ensaio de calcificação foram preparadas usando-se metodologia proposta por Kokubo *et al.* (1990) para produção do fluido corpóreo simulado (*simulated body fluid*, SBF), com pequenas modificações. Foram produzidas soluções salinas nas concentrações constantes na Tabela 1, além de soluções de ácido clorídrico e TRIS para o ajuste do pH. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura e cuidadosamente estocadas antes do uso.

Tabela 1 - Concentrações das soluções salinas e volumes utilizados para preparo do SBF

Solução	Concentração	Volume utilizado para solução de SBF
NaCl	2,74M	50mL
KCl	0,06M	50mL
CaCl ₂	0,05M	50mL
MgCl ₂	0,03M	50mL
NaHCO ₃	0,0895M	50mL
K ₂ HPO ₄	0,02M	50mL
Na ₂ SO ₄	0,01M	50mL
TRIS	0,4M	125mL
HCl	0,36M	~112mL
Volume final		1000mL

Fonte: Weska, 2009.

3.3 Filmes

3.3.1 Filmes de quitosana natural

Os filmes de quitosana natural foram feitos despejando-se aproximadamente 20 g de solução de quitosana 2% (p/p) em placas de Petri de vidro de 10 cm de diâmetro. Em seguida, as placas com a solução foram levadas à estufa a 65°C por 5 h ou até que a massa permanecesse constante. Os filmes foram então imersos em solução 2 M de NaOH e deixados em repouso por 24 horas. Após as 24 horas, os filmes foram lavados em abundância com água destilada até a água de lavagem atingir pH 7, verificado com fita de pH Merck (Alemanha). Os filmes foram então estendidos em placas de Petri de plástico e levados para secagem em dessecador a vácuo. Após a secagem por cerca de uma semana, os filmes foram estocados a temperatura ambiente até o momento do uso. A Figura 11 mostra o preparo dos filmes de quitosana natural.

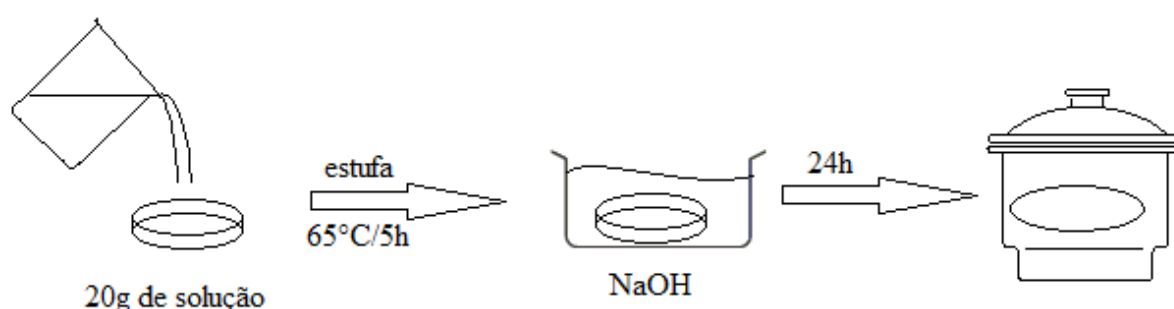
3.3.2 Filmes de κ -carragenana

Os filmes de κ -carragenana foram feitos despejando aproximadamente 25 g de solução de carragenana em placas de Petri de vidro de 10 cm de diâmetro. Em seguida, foram

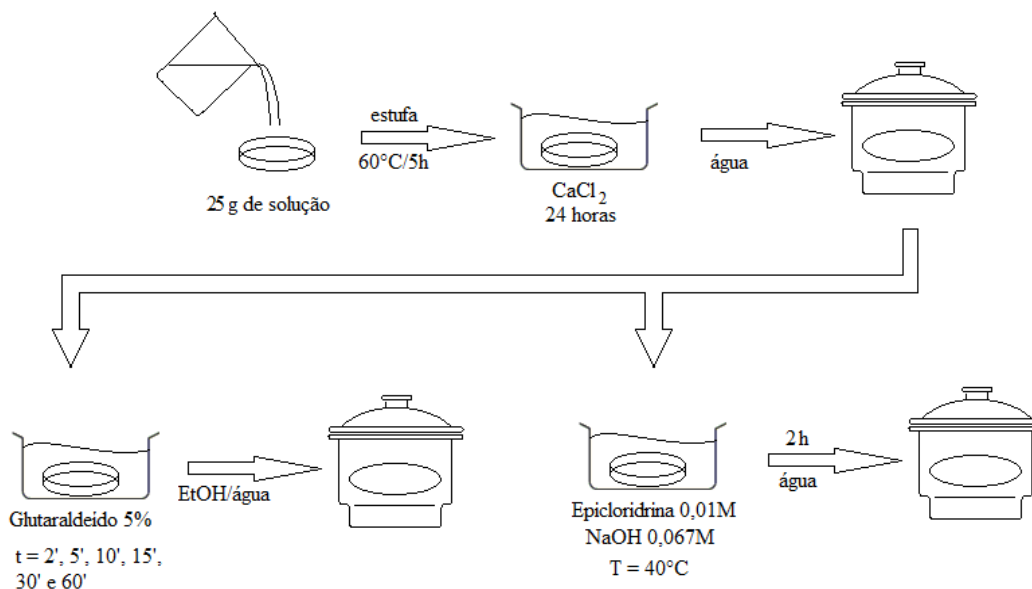
levados à estufa a 60°C por 5 h ou até que a massa permanecesse constante. Os filmes foram imersos por 24 horas em solução 2M de KCl para efetuar a reticulação entre as duplas hélices de cadeias de carragenana (PICULELLE *et al.*, 1997, VIEBKE, PICULELL & NILSSON, 1994). Passado esse tempo, os filmes foram rapidamente lavados com água destilada para retirada do excesso de cloreto de potássio. Os filmes foram então estendidos em placas de Petri de plástico e levados a dessecador a vácuo para secarem. Após a secagem, os filmes foram estocados em temperatura ambiente até o momento do uso.

Também foram produzidos filmes de carragenana utilizando glutaraldeído e epicloridrina como agentes reticulantes. Após o preparo dos filmes usando a metodologia descrita acima, eles foram imersos em solução de glutaraldeído 5%, permanecendo em contato por 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. Decorrido o tempo, os filmes foram lavados com etanol para retirada do glutaraldeído em excesso, seguido de lavagem com água destilada e levados para dessecador a vácuo. Para a reticulação com epicloridrina, os filmes foram imersos em solução de epicloridrina 0,01 M, preparada em 50 mL de NaOH 0,067 M, à 40°C, ficando sob agitação por um período de duas horas, sendo em seguida lavados para retirada do excesso de epicloridrina. Os filmes foram dispostos em placas de Petri de plástico e levados para dessecador a vácuo para secagem. Os procedimentos realizados para o preparo dos três tipos de filmes de κ -carragenana encontram-se na Figura 12.

Figura 11 - Preparação do filme de quitosana natural



Fonte: Elaborada pelo autor.

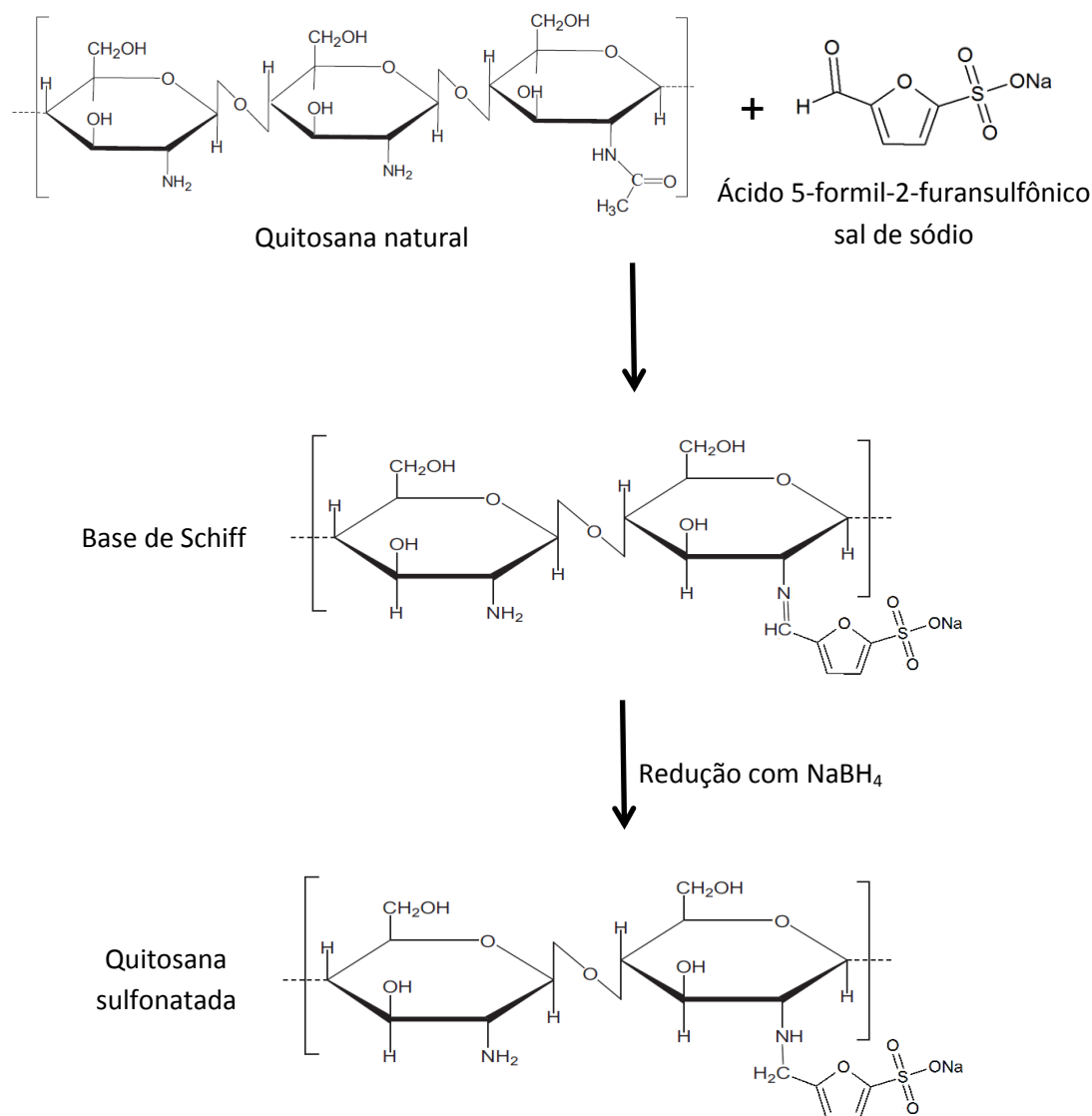
Figura 12 - Esquema de preparo dos filmes de κ -carragenana

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.3 Filmes de quitosana sulfonatada

Os filmes de quitosana sulfonatada foram produzidos através de reação heterogênea utilizando-se filmes de quitosana natural, seguindo uma modificação da metodologia proposta por Amiji (1998). Para produzi-los, utilizou-se de um balão de fundo chato acoplado a um condensador. No balão foram adicionados 25 mL de metanol e 1 g de FFSA e deixados sob agitação por 1 h para completa dissolução do sal. Em seguida, foram adicionados os filmes de quitosana natural em recortes de aproximadamente 1,5x1,5 cm, prosseguindo com a agitação por mais 1 h. Após esse período, foram adicionados 2 g de NaBH₄, mantendo-se a agitação por mais 4 h para neutralização da base de Schiff formada. Após o término da reação, os filmes foram lavados com metanol em excesso para retirada do FFSA não reagido. Os filmes foram levados para dessecador a vácuo. Após estarem secos, foram guardados até o momento do uso. A Figura 13 apresenta o esquema de reação envolvido no processo de sulfonatação.

Figura 13 - Esquema de sulfonatação da quitosana natural



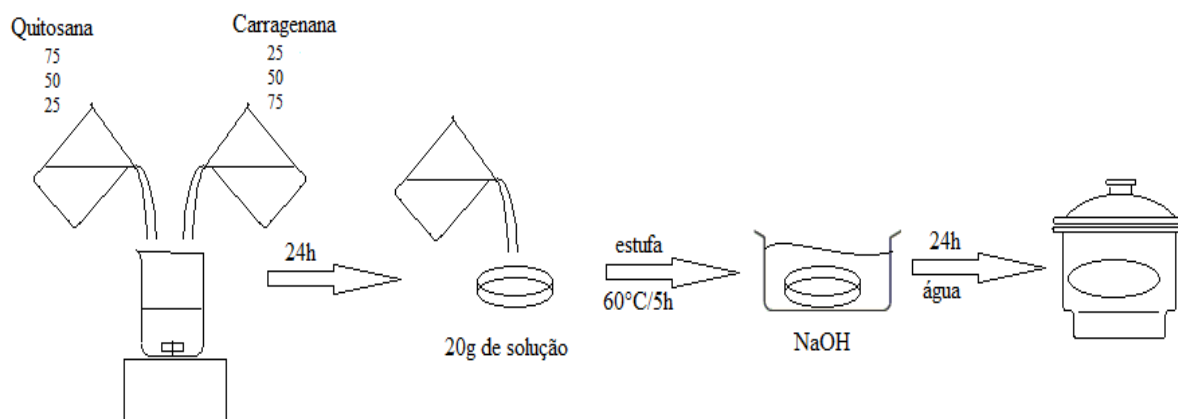
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.4 Blendas quitosana/carragenana

As blendas de quitosana e carragenana foram produzidas em três proporções diferentes de quitosana/carragenana: 25:75, 50:50 e 75:25 (v/v). Para cada blenda, tomou-se uma alíquota apropriada das soluções de quitosana natural e carragenana, misturando-as de forma a obter a proporção desejada. As soluções ficaram sob agitação por 24 h para completa homogeneização. Depois de homogeneizadas, foram despejados 20 g em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e levados para estufa a 60°C por 5 h ou até que o peso permanecesse

constante. Os filmes foram então imersos em solução 1 M de NaOH por 24 h. Em seguida, foram lavados com água destilada até que a água de lavagem atingisse pH 7, estendidos em placas de Petri de plástico e levados para dessecador a vácuo. Após secagem, foram estocados até o momento da utilização. Os procedimentos estão esquematizados na Figura 14.

Figura 14 - Esquema de preparo das blendas de quitosana e carragenana



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Modificação da solução de quitosana para os ensaios de revestimento

Foi realizada sulfonatação da quitosana em solução utilizando metodologia modificada de Amiji (1998). Para a produção da quitosana sulfonatada por via homogênea, foi utilizado o mesmo sistema reacional da preparação dos filmes de quitosana sulfonatada por via heterogênea. Foram misturados 50 mL da solução de quitosana natural com 50 mL de metanol, contendo 1% de trietanolamina (v/v), e a mistura ficou sob agitação por 5 h. Em seguida, foram adicionados 0,75 g de FFSA e a agitação continuou por mais 12h. Terminado este período, foram adicionados 0,5 g de NaBH_4 , para reduzir a base de Schiff formada, agitando-se por mais 1 h. Terminada a reação, a solução foi precipitada em metanol e filtrada. O filtrado foi lavado várias vezes com 2 L de metanol:acetona, na proporção de 1:1, para remover o excesso de FFSA. A massa obtida foi seca em dessecador a vácuo e posteriormente triturada. A partir do pó obtido, foi preparada uma solução de quitosana sulfonatada 2% seguindo a mesma metodologia utilizada para fazer solução de quitosana natural (item 3.2.1).

3.5 Ensaio de adesão plaquetária

3.5.1 Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis em laboratório de coleta de um posto de saúde da Prefeitura Municipal de Fortaleza, utilizando-se instrumentos e técnicas apropriadas. O sangue foi coletado em tubos Vacuette® de 3,5 mL, próprios para esta finalidade, da marca Greiner Bio-One (São Paulo, Brasil). Estes tubos contêm como agente anticoagulante uma solução de citrato de sódio 0,109 M/3,2%.

3.5.2 Adesão plaquetária

As amostras de sangue foram transferidas para 20 tubos Falcon de 10 mL, de forma que em cada tubo contivesse aproximadamente 7 mL de sangue. Em metade dos tubos, foi adicionada solução quinacrina de forma que a concentração final em cada tubo fosse de 20 µM. O sangue foi então incubado a 37°C por 30 minutos para promover a marcação das plaquetas. Foram utilizados quatro tubos para cada uma das amostras, sendo dois tubos com sangue sem quinacrina, utilizados nas leituras com microscopia de força atômica, e dois tubos com sangue com quinacrina, utilizados nas leituras de microscopia confocal. As amostras foram incubadas sob agitação suave a 37°C durante 15 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas com TRIS para retirada das plaquetas não aderidas. As amostras foram acondicionadas em placas de Petri e abrigadas da luz até o momento das análises.

3.5.3 Microscopia confocal

A leitura dos filmes, após o ensaio de adesão plaquetária, foi realizada no Centro de Biomedicina do Departamento de Medicina/UFC em microscópio Olympus Fluoview 1000 (Tokyo, Japão), utilizando Magnificação da objetiva de 60x e filtros Alexa Fluor 488, com emissão em 520 nm⁻¹ e excitação em 488 nm⁻¹, e DAPI, com emissão em 461 nm⁻¹ e excitação em 405 nm⁻¹. As imagens obtidas foram analisadas através do software Fiji ImageJ versão 1.48f, do Instituto Nacional de Saúde (Maryland, EUA).

3.5.4 Microscopia de força atômica (MFA)

A leitura das amostras foi realizada no Laboratório de Microscopia do Departamento de Física/UFC em um microscópio de força atômica Nanoscope Multimode IIIa da Bruker (Karlsruhe, Alemanha) em modo de contato. Foi utilizada sonda OTR8 da Bruker (Karlsruhe, Alemanha) com constante de mola de 0,57 N/m. A taxa de varredura foi de 1 Hz. As imagens foram adquiridas a pressão e temperatura ambiente com resolução de 512x512 linhas. Foram feitas imagens de altura, deflexão e fricção.

3.6 Ensaio de calcificação

3.6.1 Fluido corpóreo simulado (SBF)

O fluido corpóreo simulado (simulated body fluid, SBF) visa reproduzir, de forma similar, a concentração de sais presentes da porção aquosa do sangue humano. O SBF, também conhecido como solução Kokubo, foi desenvolvido por Kokubo *et al.* (1990) com a finalidade de reproduzir a formação de apatita em materiais bioativos em condições *in vitro*. Trata-se de uma solução multi-iônica saturada em equilíbrio. Para prepará-la, tomaram-se alíquotas de diversas soluções salinas, da solução tampão TRIS e da solução de ácido clorídrico conforme as quantidades apresentadas na Tabela 1. Durante a mistura das soluções, convém adicionar todas as soluções deixando a solução de CaCl_2 por último, e esta deve ser adicionada lentamente, observando se há turvamento da solução. Este turvamento indica o princípio da formação de núcleos de cálcio, o que poderia fornecer um resultado falso durante o teste de calcificação. O pH foi ajustado em 7,3 com TRIS e HCl.

3.6.2 Calcificação

No ensaio de calcificação foram utilizadas amostras de quitosana natural, carragenana, quitosana sulfonatada e dos três tipos de blendas (quitosana/carragenana 25:75, 50:50 e 75:25). Cada amostra foi acondicionada em um frasco plástico de aproximadamente

70 mL. Em seguida foram adicionados 50 mL de SBF em cada frasco. Os frascos com as amostras e soluções foram levados para um banho Dubnoff da Quimis (Brasil) ajustado para 37°C, com agitação de 50 rpm. Estes parâmetros visam simular o ambiente encontrado no interior de um vaso sanguíneo. As soluções de SBF foram trocadas com 48 h e 96 h a fim de evitar proliferação microbológica. Após decorrido um período de 7 dias, as amostras foram lavadas com tampão TRIS/HCl, liofilizadas e preparadas para análises de MEV e FTIR.

3.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (LRAC) da Unicamp. As amostras foram metalizadas com ouro utilizando um equipamento Sputter Coater Polaron, modelo SC7620, da VG Microtech (Uckfield, Inglaterra). A espessura da camada de ouro foi estimada em 92 Å. Para obtenção das micrografias e microanálise elementar foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo Leo 440i acoplado a um detector de energia dispersiva de raios X modelo 6070, ambos da LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra). A tensão de aceleração utilizada, tanto para as micrografias quanto para os espectros de raios X, foi de 20 kV e a corrente de feixe foi 50 pA para as micrografias e 600 pA para obtenção dos espectros de raios-X.

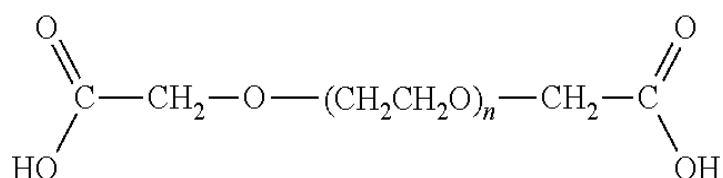
3.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foram realizadas análises de infravermelho das amostras antes e depois do ensaio de calcificação com a finalidade de comparar os espectros obtidos e verificar se ocorreram alterações significativas nas intensidades dos picos característicos de cada amostra ou surgimento de picos referentes a formação de fosfatos. As análises foram feitas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE), sendo conduzidas em espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier modelo Cary 660 da Agilent (Califórnia, EUA). As medidas foram feitas em modo de reflectância total atenuada (ATR) diretamente sobre os filmes. A faixa de comprimento de onda analisada foi de 4.000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Foram efetuadas 32 varreduras em cada amostra.

3.7 Ensaio de revestimento

O ensaio de revestimento foi realizado no Laboratório de Biomateriais e Bioengenharia da Université Laval, Québec, Canadá. Usou-se dopamina, para aminolizar a superfície, e polietileno glicol bis(carboximetil) éter (PEGb), mostrado na Figura 15, como agente reticulante entre os polímeros testados e a superfície de aço inoxidável revestida com dopamina. O esquema geral de reação é mostrado na Figura 16.

Figura 15 - Estrutura do polietileno glicol bis(carboximetil)



Fonte: Elaborada pelo autor

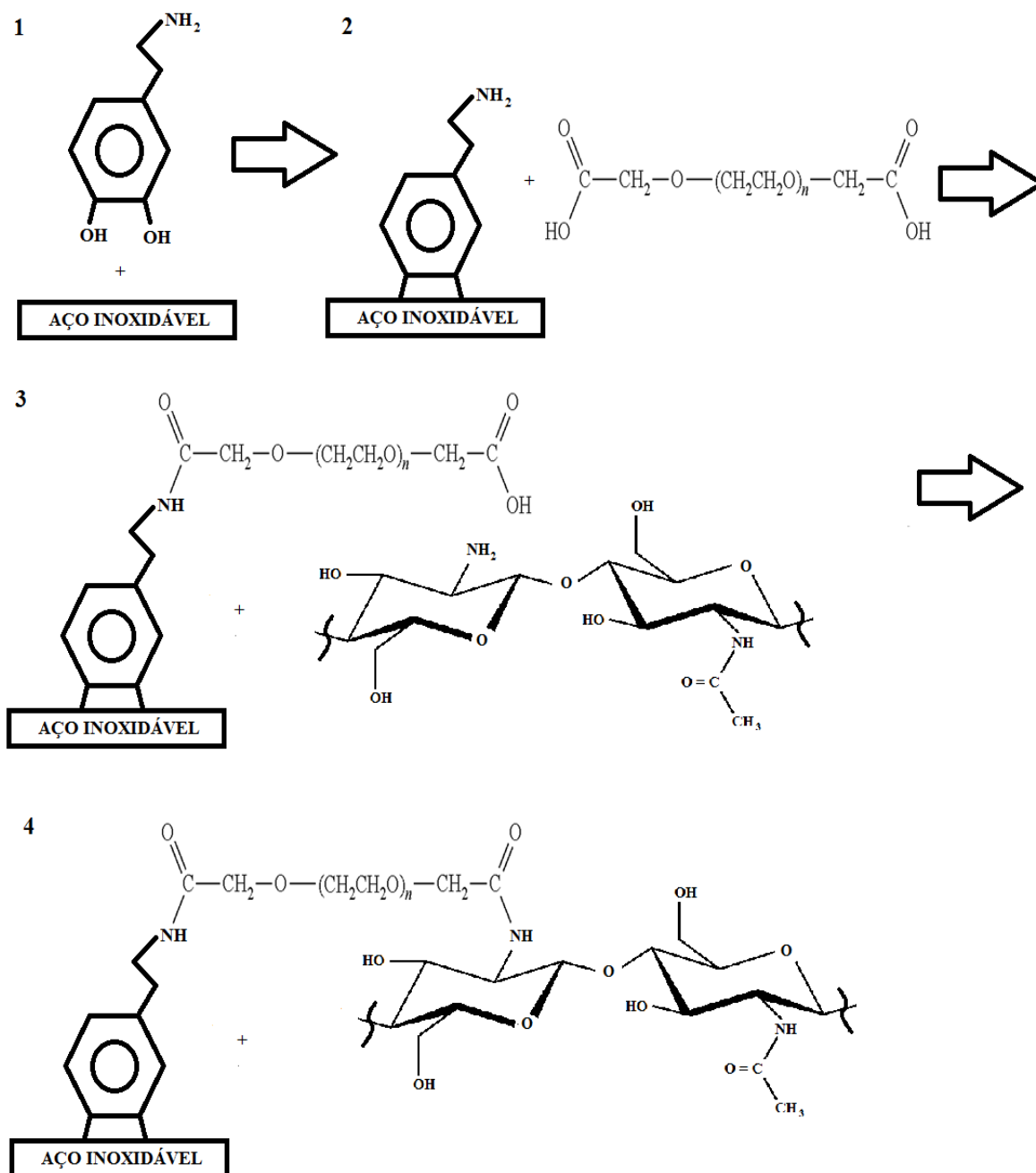
Para o ensaio de revestimento, o aço inoxidável foi cortado em discos com diâmetro de 12,7 mm e espessura de 0,5 mm. Previamente ao uso, os substratos foram lavados com acetona, água nanopura e metanol em banhos ultrassônicos sucessivos de 10 minutos cada. Entre cada banho, e ao final destes, as amostras foram secas com ar comprimido livre de partículas.

3.7.1 Eletropolimento do substrato metálico

A etapa de eletropolimento visa obter uma superfície metálica lisa, removendo imperfeições e compostos não-metálicos, gerando uma camada rica em óxidos e hidróxidos (HAÏDOPOULOS *et al.*, 2006; SAIDIN *et al.*, 2013). O eletropolimento foi realizado em sistema de célula eletrolítica com alimentador externo com controle da densidade de carga, de forma que a voltagem permanecesse constante em 2V durante todo o processo de eletropolimento. A solução eletrolítica utilizada consiste em uma mistura de glicerol:H₃PO₄:H₂O, na proporção de 50:35:15. A amostra a ser eletropolida foi utilizada como anodo enquanto que uma peça de aço semelhante foi utilizada como catodo. A distância

entre os dois eletrodos é de 60 mm. O diferencial de tensão é aplicado ao sistema durante seis minutos O eletropolimento foi seguido de um banho ácido em solução de H₂O:HNO₃:HF, com proporção de 88:10:2 respectivamente. As amostras foram condicionadas em placas de 24 poços.

Figura 16 - Diagrama esquemático ilustrando as etapas de revestimento para quitosana natural.



Elaborada pelo autor. (1) Aminolização da superfície com dopamina; (2) *Grafting* do PEGb na superfície aminolizada; (3) *Grafting* da quitosana na superfície modificada com PEGb; (4) Resultado final do revestimento com quitosana natural. O revestimento com quitosana sulfonatada segue as mesmas etapas e princípios.

3.7.2 Aminolização da superfície metálica

Visando efetuar uma ligação covalente da quitosana com o substrato metálico, é necessária a aminolização da superfície e utilização de um agente reticulante. Para a aminolização da superfície metálica foi utilizada a âncora biomimética dopamina, conforme o seguinte procedimento: 20 mg de dopamina foram dissolvidos em 10 mL de tampão MES 0,1M, o pH foi ajustado para 8,6 com solução de NaOH 0,1M e 2 mL desta solução foram colocados sobre os substratos eletropolidos na placa de 24 poços. A placa foi colocada ao abrigo da luz e permaneceu em repouso por 24 horas. Após este período, as amostras foram lavadas três vezes com água nanopura utilizando-se um sistema de vórtex por 1 minuto a cada lavagem, foram secas e dispostas em placa de 24 poços.

3.7.3 Grafting do PEGb

Devido à natureza nucleofílica da dopamina e da quitosana, faz-se necessária a utilização de um agente reticulante para fazer a ligação entre as duas moléculas. Neste estudo, o agente reticulante escolhido foi o PEGb. Foi preparada uma solução de PEGb 0,5g/L, a qual foram adicionados 3 mg/mL de EDAC. Foram colocados 2 mL desta solução sobre as amostras revestidas com dopamina e a placa foi colocada em agitador oscilante por 3h para ativação e *grafting* do PEGb. Após este período, as amostras foram lavadas três vezes com água nanopura utilizando-se um sistema de vórtex por 1 minuto a cada lavagem, foram secas e dispostas em placa de 24 poços.

3.7.4 Grafting dos polímeros

O procedimento a seguir foi utilizado tanto para a quitosana natural quanto para a sulfonada. Na descrição será utilizado apenas o termo quitosana, que se referirá aos dois tipos de polímeros. Sobre as amostras modificadas com PEGb foram adicionados 3 mg de EDAC, diluídos em 0,5 mL de tampão MES 0,1M, e 1,5 mL de solução de quitosana. A placa foi colocada em agitador oscilatório por 3h para homogeneização durante o *grafting* da quitosana. Decorrido o tempo, as amostras foram lavadas três vezes com água nanopura utilizando-se um

sistema de vórtex por 1 minuto a cada lavagem, foram secas e guardadas sob vácuo até o momento das análises de XPS, MFA e ângulo de contato.

3.7.5 Caracterização da superfície

3.7.5.1 Espectroscopia de Foto-Elétrons de Raios-X (XPS)

As análises XPS foram realizadas nas amostras após cada modificação da superfície utilizando-se equipamento PHI 5600-ci da Physical Electronics (Minnesota, EUA) para gravar os espectros. Uma fonte de raios-X monocromática de alumínio (1486,6 eV) 300 W foi utilizada juntamente com um neutralizador de carga para gravar espectros de pesquisa enquanto que uma fonte de raios-X monocromática de magnésio (1253,6 eV) foi usada para gravar espectros de alta resolução. A detecção foi realizada em ângulo de 45°, em uma área de 0,005 cm², em três pontos diferentes em cada amostra. Esta técnica visa determinar a composição química da superfície estudada. Alterações na composição química da superfície podem ser um indicativo de que o polímero foi enxertado com sucesso.

3.7.5.2 Microscopia de Força Atômica (MFA)

As amostras foram avaliadas através da microscopia de força atômica empregando equipamento Dimension 3100 da Veeco (New York, EUA) em modo tapping. Foram realizadas imagens de 20x20 µm e em três pontos diferentes de cada amostra. As imagens foram obtidas a pressão e temperatura ambiente, com resolução de 256x256 linhas e taxa de varredura de 1 Hz, para as micrografias de 20x20 µm, e 0,5 Hz, para as micrografias de 2x2 µm. Nesta técnica é empregada uma haste que oscila na direção z não tocando a superfície da amostra, sendo mantida à distância de décimos ou centésimos de Angstroms da mesma. As variações na frequência de ressonância da haste são utilizadas como medidas de mudanças no gradiente de força, que reflete as alterações na interação entre a agulha e a amostra, fornecendo dados sobre sua rugosidade média. As imagens foram tratadas com o software WSxM 5.0 Develop 7.0, da Nanotec Eletronica S.L. (HORCAS *et al.* 2007).

3.7.5.3 Determinação do ângulo de contato (AC)

As análises foram realizadas em equipamento Video Contact Angle System VCA-2500 XE da AST Products Inc. (Massachusetts, EUA) para verificar a molhabilidade da superfície. O líquido de medição utilizado foi água deionizada em gotas de 1 μ L. O cálculo dos ângulos de contato foi realizado em modo estático em cinco regiões diferentes para cada amostra. Com esta técnica é possível quantificar alterações na superfície levando-se em conta sua molhabilidade. Superfícies mais polares apresentam um menor ângulo de contato e, conseqüentemente, uma maior molhabilidade devido ao espalhamento do líquido de medição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterizações dos filmes

Os filmes apresentaram um aspecto macroscópico homogêneo com uma superfície lisa. O filme de quitosana apresentou a maior transparência entre os filmes estudados. O filme de quitosana sulfonatada apresentou uma coloração levemente amarelada produzida pela adição de FFSA. Esta coloração pode ser atribuída à presença de grupos imina que não foram reduzidos pelo borohidreto de sódio, podendo ser mais um indício de que houve reação de substituição. Nas blendas, pode ser observado um aumento da opacidade conforme o aumento da quantidade de carragenana na composição. Isto está relacionado com a formação de fibras entre as cadeias de quitosana e carragenana devido, respectivamente, a interação dos grupos amino (positivo) e sulfato (negativo) presentes em suas cadeias. O aspecto geral dos filmes pode ser observado na Figura 17.

Carneiro *et al.* (2013) estudaram o grau de intumescimento em filmes de quitosana, κ -carragenana e blendas quitosana/carragenana. Seus resultados mostram que os filmes de quitosana apresentam um menor intumescimento que os filmes de carragenana e as blendas quitosana/carragenana. Isto se deve ao fato de que, em pH 7,4, os grupos amino da quitosana estão parcialmente protonados. Desta forma, a repulsão entre estes grupos contribui com o intumescimento da quitosana, mesmo que esta não tenha absorvido uma grande quantidade de água. O filme de carragenana apresentou o maior grau de intumescimento devido à repulsão existente entre seus grupos sulfatos, o que levou a absorção de água até seis vezes maior que a quitosana. As blendas apresentaram valores intermediários entre a quitosana e a carragenana, sendo que o valor aumentava de acordo com o acréscimo de carragenana em sua composição. Isto foi explicado como resultado da repulsão eletrostática originada pelos grupos sulfato da carragenana.

4.1.1 Espessura

A medição da espessura foi feita utilizando-se paquímetro digital com precisão de 0,005 mm. Para cada filme, foram realizadas quatro medidas em recortes quadrados retirados

do centro do filme. Os valores médios, assim como o desvio padrão, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Espessura média dos filmes estudados

Filme	Espessura (mm)
Quitosana natural	0,050 ± 0,008
Quitosana sulfonatada	0,073 ± 0,005
Quitosana/carragenana 75:25	0,040 ± 0,014
Quitosana/carragenana 50:50	0,025 ± 0,010
Quitosana/carragenana 25:75	0,018 ± 0,005

Fonte: Elaborada pelo autor

O filme de quitosana sulfonatada apresenta uma espessura maior em relação ao filme de quitosana natural devido ao aumento no espaçamento entre as cadeias de quitosana (LIMA *et al.*, 2013). Este aumento é causado pelo efeito repulsivo gerado pelos grupos sulfonatos inseridos no polímero. Para as blendas, podemos observar uma diminuição da espessura conforme se aumenta a quantidade de carragenana na composição do filme. Este efeito pode ser explicado pela maior interação entre as cadeias de quitosana e carragenana, o que leva a exclusão de água e, conseqüentemente, redução do volume ocupado pelo filme.

4.1.2 Grau de substituição

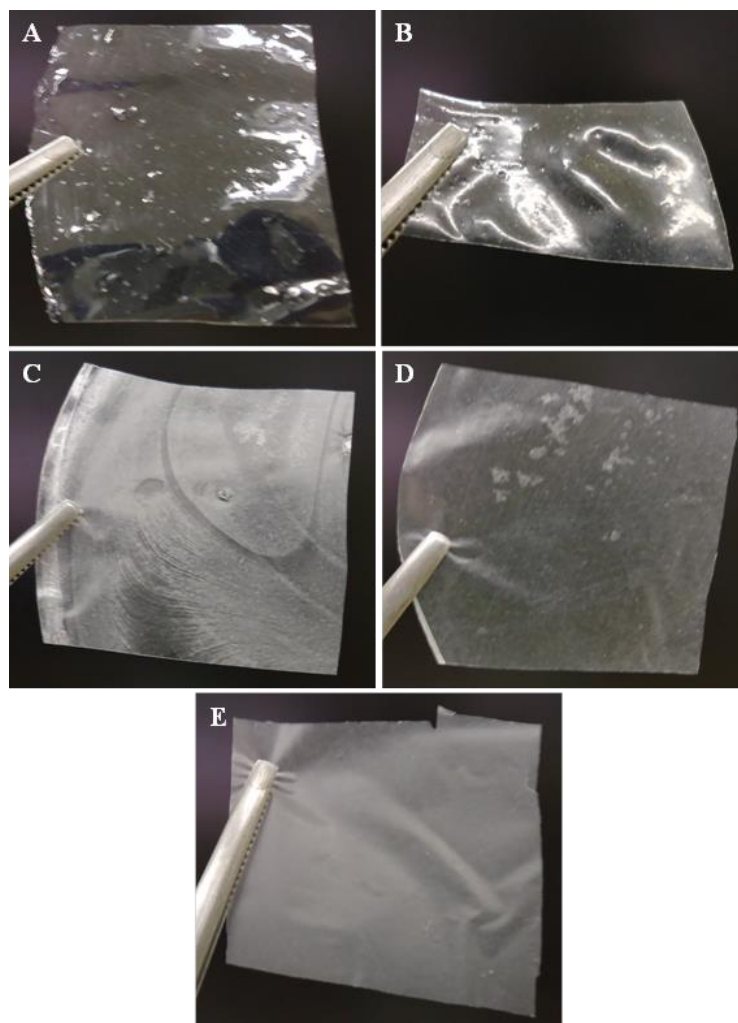
O grau de substituição (GS) dos filmes de quitosana sulfonatada foi obtido através da aplicação da seguinte fórmula proposta por Pires (2013):

$$GS = \frac{167 \times \%S}{3.200 - 182,13 \times \%S}$$

onde 167 é a massa molar média da quitosana 85% desacetilada (MA, 2008), %S é a porcentagem de enxofre na amostra determinada por análise elementar, 3.200 são 100 vezes a massa atômica do enxofre e 182,13 é a massa molecular do FFSA menos 16 devido a perda de um oxigênio durante a reação de sulfonatação. Todas as massas estão expressas em g/mol. O valor utilizado para %S, 3,5%, foi determinado em estudo prévio por Lima *et al.* (2013), que realizou a sulfonatação diretamente sobre o filme de quitosana. O grau de substituição encontrado para esses parâmetros foi de 0,23. O valor encontrado na literatura para este

mesmo tipo de reação, porém realizada em solução, é de 0,23-0,26, determinado por alcalinometria (MUZZARELLI, 1992; AMIJI, 1998).

Figura 17 - Aparência dos filmes utilizados nos experimentos



Fonte: Elaborada pelo autor. (A) Quitosana natural; (B) Quitosana sulfonatada; (C) Blenda quitosana/carragenana 75:25; (D) Blenda quitosana/carragenana 50:50; (E) Blenda quitosana/carragenana 25:75.

4.2 Ensaio de adesão plaquetária

O sangue utilizado permaneceu sem coagular durante todo o ensaio. A temperatura durante o ensaio ficou em $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram utilizados pedaços de filmes de aproximadamente 2,0x2,0 cm. Devido à sensibilidade da quinacrina, e para evitar que ela

perdesse a fluorescência, o preparo da solução e a incubação foram feitas no escuro. Os filmes foram transportados dentro de placas de Petri e estas foram colocadas em recipiente opaco e fechado para proteger da luz. Os filmes de quitosana sulfonatada e a blenda quitosana/carragenana 25:75 permaneceram translúcidos após o ensaio, enquanto que os filmes de quitosana natural, blenda quitosana/carragenana 50:50 e blenda quitosana/carragenana 75:25, apresentaram uma leve coloração avermelhada. Nas blendas podemos observar que quanto maior a quantidade de quitosana presente, maior a quantidade de material sanguíneo presente no filme, isto se deve ao caráter trombogênico da quitosana. A aparência dos filmes após o ensaio pode ser vista na Figura 18.

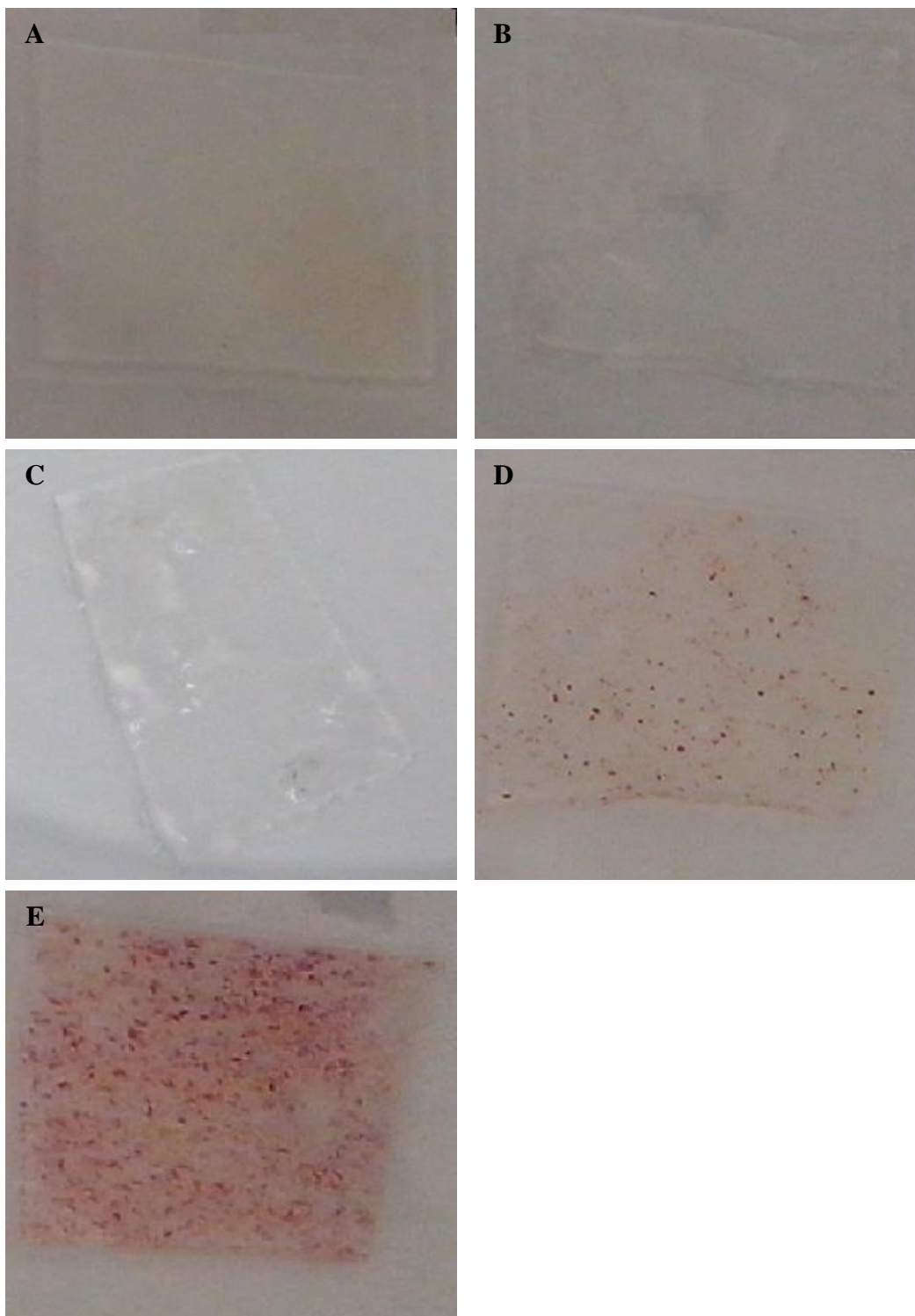
4.2.1 Microscopia confocal

As micrografias realizadas das amostras foram efetuadas em campos de 211,97x211,97 μm , totalizando uma área de 44.931,28 μm^2 . A partir das micrografias, realizou-se a contagem de partículas utilizando-se o software Fiji ImageJ. Apesar de possuir várias vantagens, a quitosana é reconhecidamente trombogênica (AMIJI, 1998; JAYAKUMAR *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2013). Em condições ácidas, a quitosana natural torna-se carregada positivamente, o que pode atrair as proteínas plasmáticas negativamente carregadas, levando à adesão de plaquetas e, conseqüentemente, a formação de trombos (HOVEN *et al.*, 2007). Devido a isto, pode-se perceber que o filme de quitosana natural apresentou uma quantidade maior de plaquetas aderidas na superfície do que os outros filmes. De fato, a quantidade de plaquetas impediu a contagem destas, pois muitas já se encontravam formando trombos.

A blenda quitosana/carragenana 25:75 foi o filme que apresentou uma menor quantidade de plaquetas aderidas entre os filmes estudados. Isso pode ser explicado devido à presença de grupos SO_3 presentes na estrutura da carragenana (OPOKU, QIU e DOCTOR, 2006) e uma menor quantidade de quitosana em sua composição (CARNEIRO *et al.*, 2013). Grupos sulfatos são citados na literatura como capazes de diminuir a adsorção de proteínas plasmáticas (albumina sérica humana, fibrinogênio e IgG majoritariamente) que são responsáveis pelo início da cascata de coagulação (HOVEN *et al.*, 2007). Estes grupos são utilizados por vários pesquisadores na tentativa de sintetizar uma substância não tóxica com propriedades anticoagulantes próximas às da heparina, um dos produtos mais utilizados como

anticoagulante, e que tenham um custo de produção mais baixo, pois a heparina é muito cara devido às etapas de purificação que se fazem necessárias para obtê-la (JAYAKUMAR *et al.*, 2007).

Figura 18 - Aspecto dos filmes após ensaio de adesão plaquetária



Fonte: Elaborada pelo autor. (A) Quitosana natural; (B) Quitosana sulfonatada; (C) Blenda quitosana/carragenana 25:75 (v/v); (D) Blenda quitosana/carragenana 50:50 (v/v); (E) Blenda quitosana/carragenana 75:25 (v/v).

Carneiro *et al.* (2013) e Lima *et al.* (2013) realizaram estudos de adsorção de proteínas utilizando filmes de quitosana, natural e sulfonatada, e blendas de quitosana e carragenana. Os resultados obtidos por Carneiro *et al.* (2013) mostram que o aumento de quitosana na composição das blendas leva a uma maior interação da quitosana (efeito atrativo) do que da carragenana (efeito repulsivo) com as proteínas plasmáticas. Lima *et al.* (2013) demonstram que a modificação química da quitosana diminui a disponibilidade de grupos aminos protonados, além de aumentar a carga negativa da quitosana. Estes dois efeitos combinados levam a uma menor adsorção de proteínas pela quitosana sulfonatada quando comparada com a quitosana natural.

Periyah *et al.* (2013) estudaram o efeito de vários derivados de quitosana na indução da adesão e agregação plaquetária. Os resultados encontrados mostram que oligoquitosana, uma forma de quitosana com cadeia mais curta, induziu a formação de coágulos de forma superior quando comparada com outros derivados. A quitosana é capaz de ativar a rota intrínseca de coagulação. Além disso, os resultados sugerem que a relação entre a quitosana e a adesão e agregação plaquetária existe de uma maneira dependente de concentração, dose e tempo. Isto ocorre porque os efeitos da quitosana na coagulação não são apenas interações físicas (propriedades de superfície), mas também são relacionados com a estrutura química da quitosana, em especial os grupos amino. Os grupos amino são importantes para a agregação plaquetária e, por consequência, a formação de trombos (OKAMOTO *et al.*, 2003).

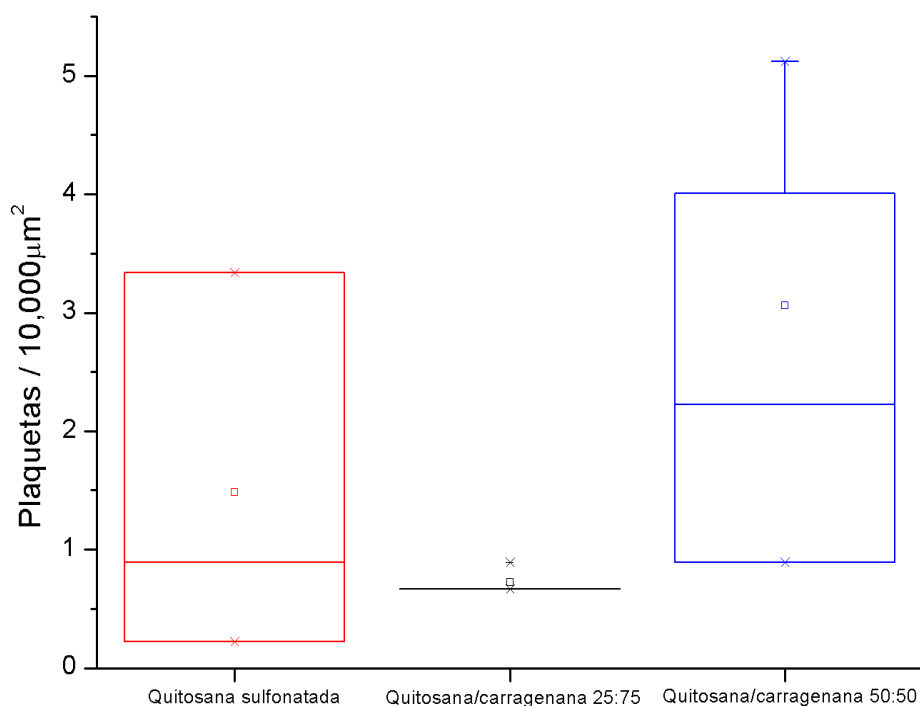
A quitosana sulfonatada apresentou uma grande redução no número de plaquetas aderidas quando comparada com a quitosana natural. Isto pode ser explicado pela presença dos grupos SO_3 , presentes na estrutura do anel de furano, que são descritos na literatura como capazes de reduzir a adsorção de proteínas responsáveis pelo início da cascata de coagulação (HOVEN *et al.*, 2007; AMIJI, 1998). Estes grupos são utilizados para se obter superfícies negativamente carregadas similares a da heparina (JAYAKUMAR *et al.*, 2007), um dos anticoagulantes mais utilizados. Lima *et al.* (2013) demonstraram que a modificação da quitosana diminui a disponibilidade de grupos amino protonados e aumentam a carga negativa total da quitosana. Este fato pode contribuir para a diminuição da adsorção de proteínas plasmáticas e do número de plaquetas aderidas.

O mecanismo pelo qual a heparina atua na cascata de coagulação é baseado na adsorção de antitrombina, que neutraliza a amidólise da trombina e o fator Xa, através da antitrombina-III (KEUREN *et al.*, 2003). Alguns estudos sobre a amidólise da trombina

avaliaram a influência da carragenana na inibição da trombina. Os resultados obtidos mostraram que a carragenana inibe a amidólise da trombina tanto através da antitrombina-III quanto que diretamente (KINDNESS, LONG e WILLIAMSON, 1980). Jurd *et al.* (1995) estudaram a influência do conteúdo de sulfato de polissacarídeos sulfatados na coagulação sanguínea. Os resultados obtidos mostraram que os grupos sulfatos desempenham um papel importante como anticoagulante potencializando a expressão do cofator heparina II, um inibidor de serino proteases, que inibe a trombina e o fator IIa. Embora este mecanismo não diminua a adesividade plaquetária, ele inibe fortemente a agregação plaquetária, o que vem a reduzir a formação de coágulos (SHANMUGAM e MODY, 2000).

Os resultados obtidos seguem o padrão apresentado, sendo as blendas quitosana/carragenana 25:75 e 50:50 e a quitosana sulfonatada os filmes que apresentaram uma menor quantidade de plaquetas aderidas. A contagem de partículas para cada amostra, quando possível, é mostrada na Figura 19.

Figura 19 - Contagem de plaquetas



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Microscopia de força atômica

Técnicas de microscopia óptica são amplamente utilizadas para visualização de células em superfícies. Apesar de serem técnicas simples, o limite de difração torna-se a grande desvantagem desses métodos. Com o intuito de superar essa dificuldade, muitos pesquisadores passaram a utilizar microscopia eletrônica de varredura (MEV) para visualização de material biológico na superfície de biomateriais (BUSCH *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2014; PERIAYAH *et al.*, 2013; YE *et al.*, 2010). Embora seja uma técnica avançada e eficaz, a MEV requer preparo das amostras que não garantem a viabilidade celular (KARAGKIOZAKI *et al.*, 2009; KARAGKIOZAKI *et al.*, 2008). A microscopia de força atômica (MFA) desponta como um método não destrutivo que permite analisar em tempo real a interação de plaquetas com o biomaterial sem a necessidade de preparação mais elaborada. Desta forma, é possível visualizar, em resolução nanométrica, as plaquetas em seu estado nativo, sem marcadores, e em seu ambiente por horas sem que haja dano às plaquetas.

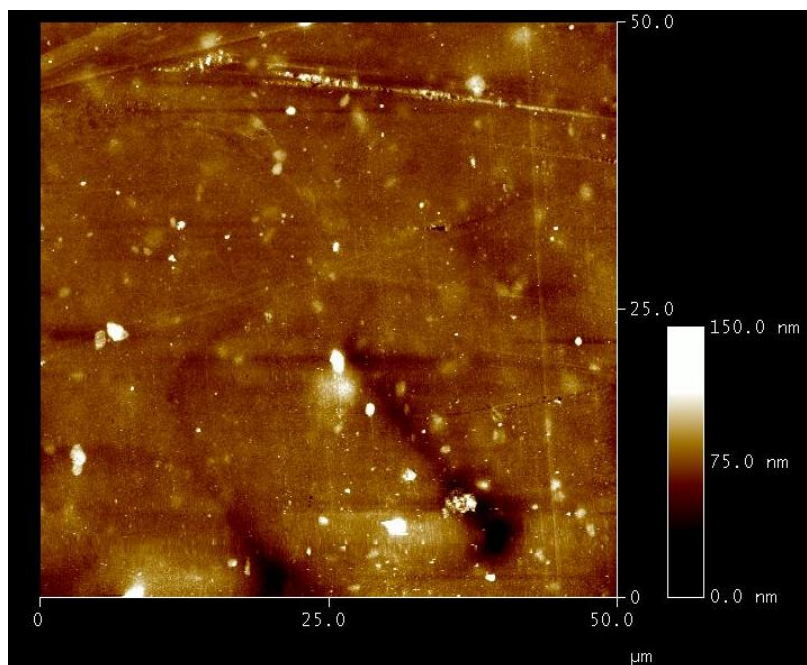
Foram feitas imagens dos filmes estudados antes e após o ensaio de adesão plaquetária. Pelas imagens obtidas, pode-se verificar resultados que corroboram os encontrados na microscopia confocal. Em todas as imagens obtidas foi possível verificar a presença de trombos na amostra de quitosana natural. Este resultado está de acordo com o apresentado no item 4.3.1 e mais uma vez ratifica o efeito trombogênico da quitosana. A Figura 20 mostra a superfície da quitosana natural antes do contato com o sangue. Pode-se observar uma superfície regular, com rugosidade de $134,375 \pm 105,922$ nm. Comparando com a Figura 21, obtida após o contato da quitosana natural com o sangue, pode-se observar alterações tanto na topografia quanto com a rugosidade, que aumentou para $1.086,655 \pm 189,779$ nm devido à deposição de material biológico.

Enquanto a quitosana natural apresentou um grande aumento na rugosidade após o contato com sangue, a quitosana sulfonatada mostrou um aumento mais ameno, tendo sua rugosidade aumentada de $141,05 \pm 144,73$ nm para $202,37 \pm 12,70$ nm após o ensaio de adesão plaquetária. Através da Figura 22 pode-se constatar a presença de leves ‘depressões’ na superfície da quitosana sulfonatada, o que gera uma superfície mais rugosa que a quitosana natural. Este aumento da rugosidade pode estar relacionado com os efeitos de repulsão e atração da cadeia polimérica devido à sulfonatação (LIMA *et al.*, 2013).

A Figura 23 mostra leve aumento destas ‘depressões’ na superfície do filme de quitosana sulfonatada. Essa alteração pode ser atribuída ao material plasmático que pode ter

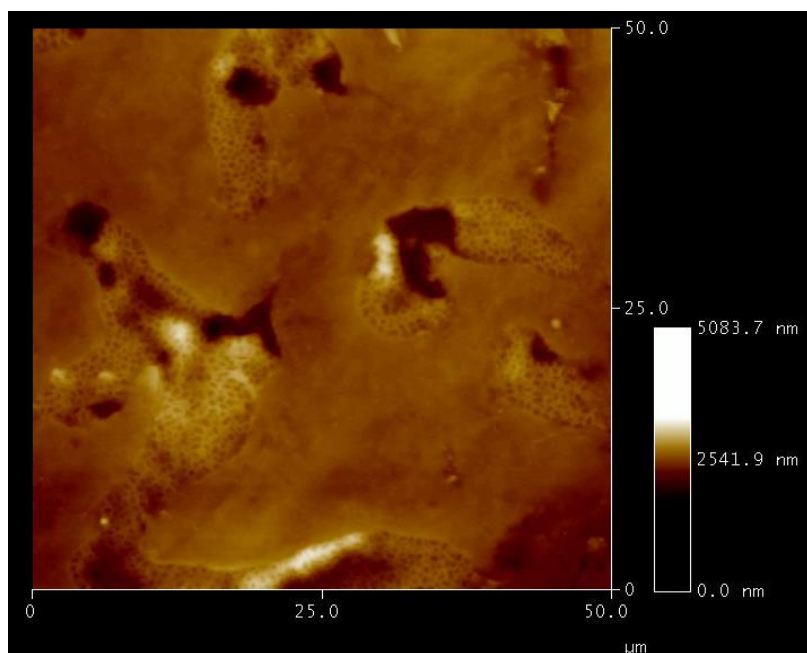
se depositado sobre a superfície do filme. Este material, porém, não representa a adesão de plaquetas ou a formação de trombos, como podemos verificar através das imagens de fricção.

Figura 20 - Quitosana natural antes do contato com sangue



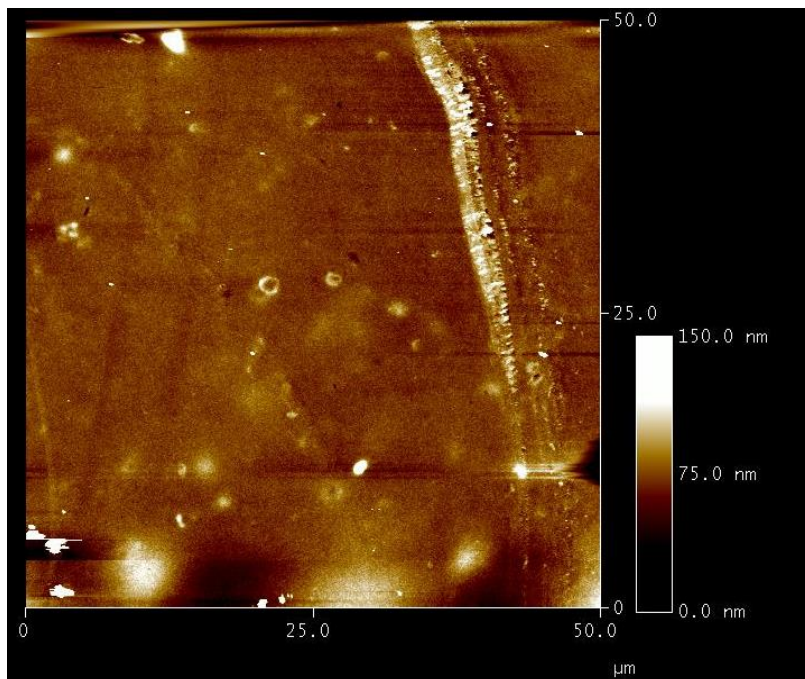
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 - Quitosana natural após contato com sangue



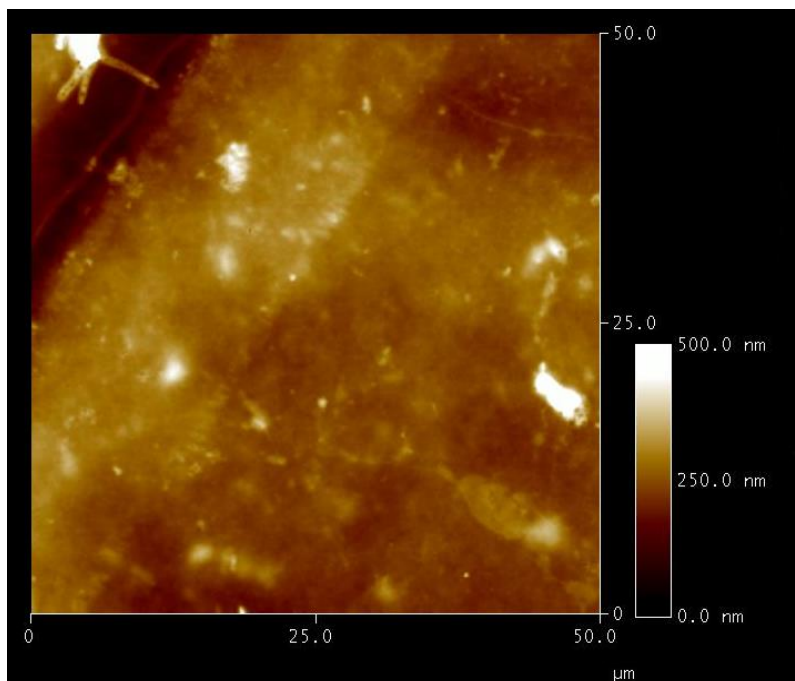
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 - Quitosana sulfonatada antes do contato com sangue



Fonte: Elaborada pelo autor.

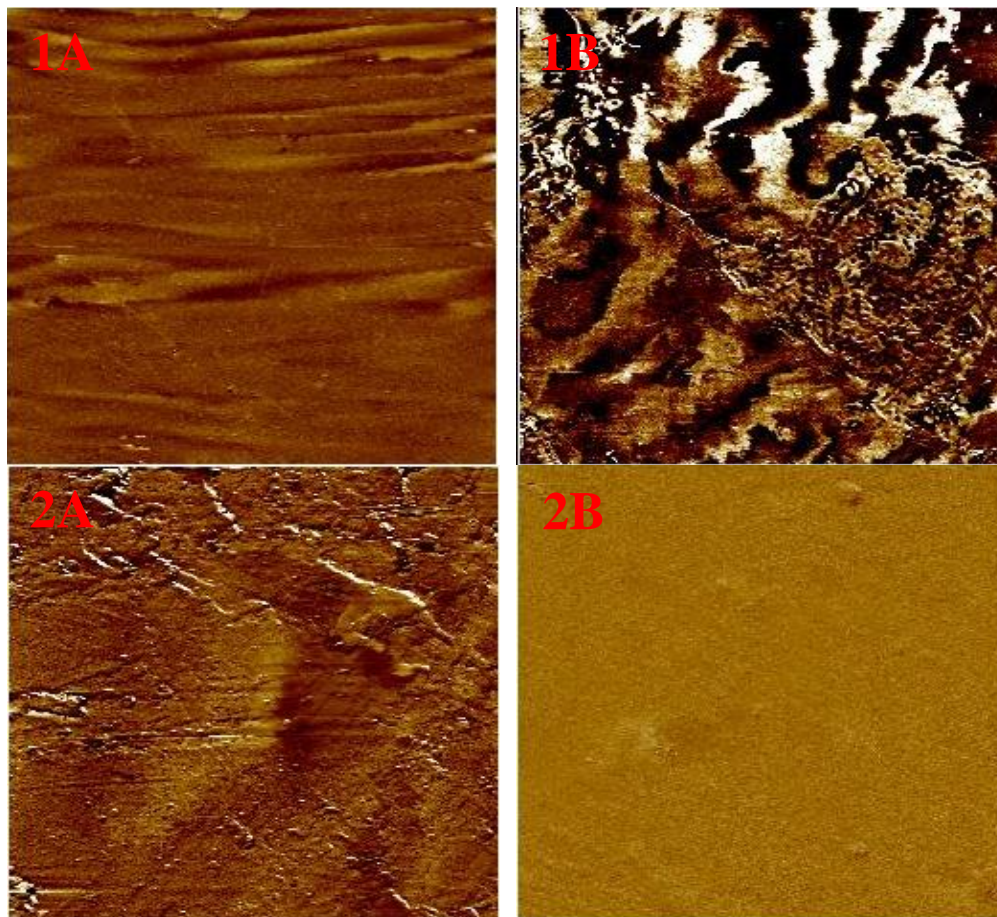
Figura 23 - Quitosana sulfonatada após contato com sangue



Fonte: Elaborada pelo autor.

Um comparativo entre as imagens de fricção das amostras de quitosana (Figura 24), natural e sulfonatada, antes e após a adesão plaquetária, deixa claro o comportamento esperado neste tipo de imagem quando há a presença de plaquetas aderidas.

Figura 24 - Comparação entre imagens de fricção da quitosana, natural e sulfonatadas, antes e após contato com sangue



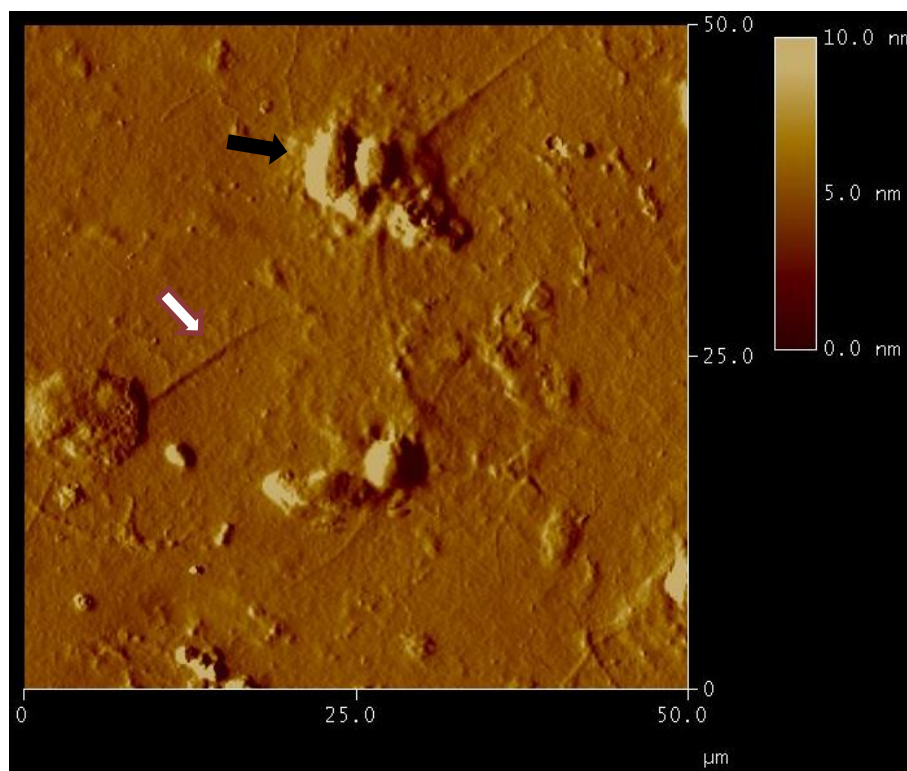
Fonte: Elaborada pelo autor. (1) Quitosana natural; (2) Quitosana sulfonatada; (A) Antes do contato com sangue; (B) Após contato com sangue. Micrografias com 10 μ m de lado.

Ao percorrer a amostra, a sonda provoca pequenas torções no cantilever de acordo com a resistência encontrada na superfície. As imagens geradas por estas torções possuem um padrão de linhas que seguem praticamente a mesma direção (Figura 24-1A). Quando há a presença de plaquetas ou trombos na superfície, a sonda passa a gerar torções mais severas no cantilever, como resultado tem-se o desenho de linhas em várias direções e com intensidades diferentes (Figura 24-1B). Este padrão não é observado nas imagens referentes à quitosana sulfonatada. No entanto, é preciso ressaltar que, embora a Figura 24-2B mostre que pequeno aumento da rugosidade da quitosana sulfonatada pode estar relacionado com a deposição de

material sanguíneo sem que haja a formação de trombos, foram encontradas plaquetas aderidas à superfície dos filmes de quitosana sulfonatada.

A Figura 25 mostra plaquetas em estado ativado. É possível observar as projeções de actina citoplasmática, essencial para a mudança morfológica e agregação (KARAGKIOZAKI *et al.*, 2009). As plaquetas, em sua forma natural, não ativada, são caracterizadas por sua forma discoide e ausência de pseudópodes. Ao entrarem em contato com a superfície do biomaterial e ativarem, elas começam a projetar o hialoplasma formando pseudópodes, que são chamados de filópodes. Com essa modificação em seu formato, as plaquetas aumentam sua área e expõem uma superfície de fosfolipídeos para fatores de coagulação que necessitam destes, além de liberarem grânulos através da degranulação, o que irá recrutar e ativar plaquetas adicionais (KARAGKIOZAKI *et al.*, 2008).

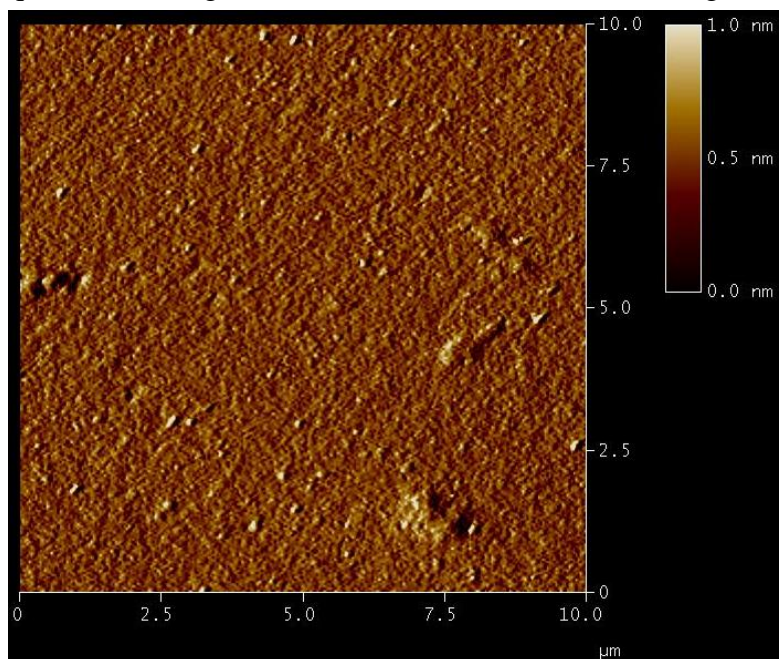
Figura 25 - Imagem de deflexão da quitosana sulfonatada mostrando agregados plaquetários e filópodes



Fonte: Elaborada pelo autor. A seta preta indica um agregado de plaquetas. A seta branca mostra um filópode originado em um agregado plaquetário.

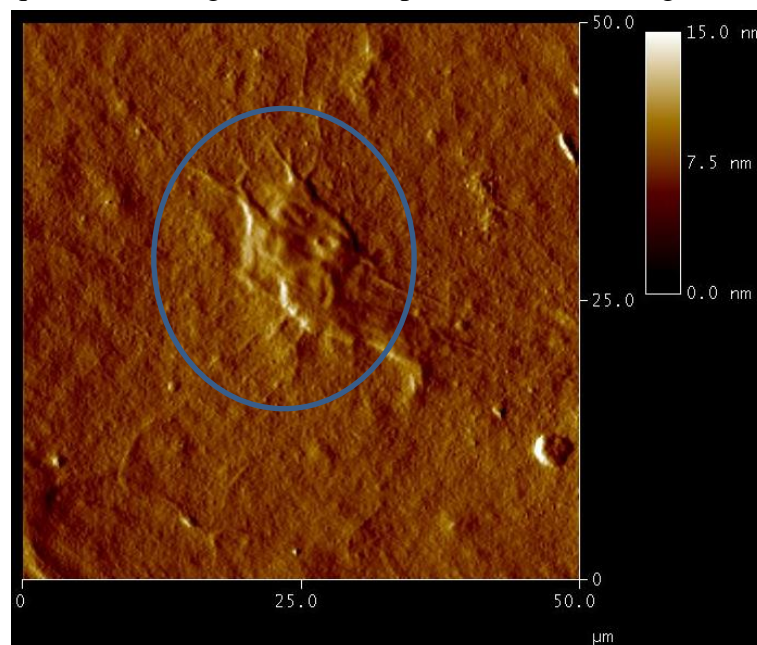
As Figuras 26 e 27 trazem imagens de deflexão da blenda quitosana/carragenana 75:25 antes e após contato com sangue. É possível verificar a presença de plaquetas ativadas na superfície do filme (Figura 27).

Figura 26 - Imagem de deflexão para a blenda quitosana/carragenana 75:25 antes do contato com sangue



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 27 - Imagem de deflexão para a blenda quitosana/carragenana 75:25 após contato com sangue

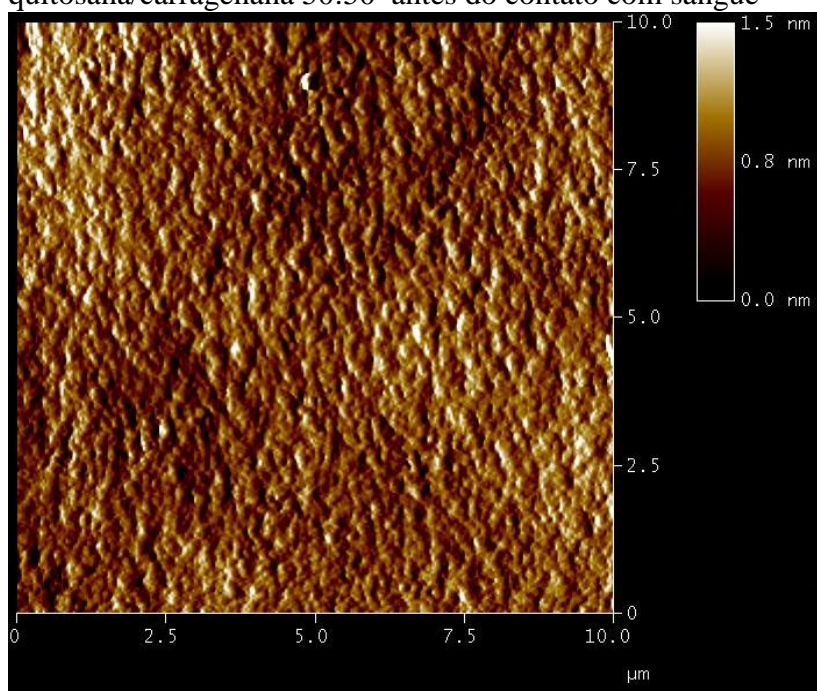


Fonte: Elaborada pelo autor. O círculo azul destaca a presença de quatro plaquetas em estado ativado. É possível ver a alteração de formato e aparecimento dos filópodes.

Em seus trabalhos, Karagkiozaki *et al.* (2009, 2008) realizaram o estudo de adesão plaquetária em superfícies de um filme de carbono amorfo hidrogenado e nitreto de titânio. Nos resultados, é possível observar estruturas semelhantes às apresentadas aqui, plaquetas ativadas com a projeção de filópodes.

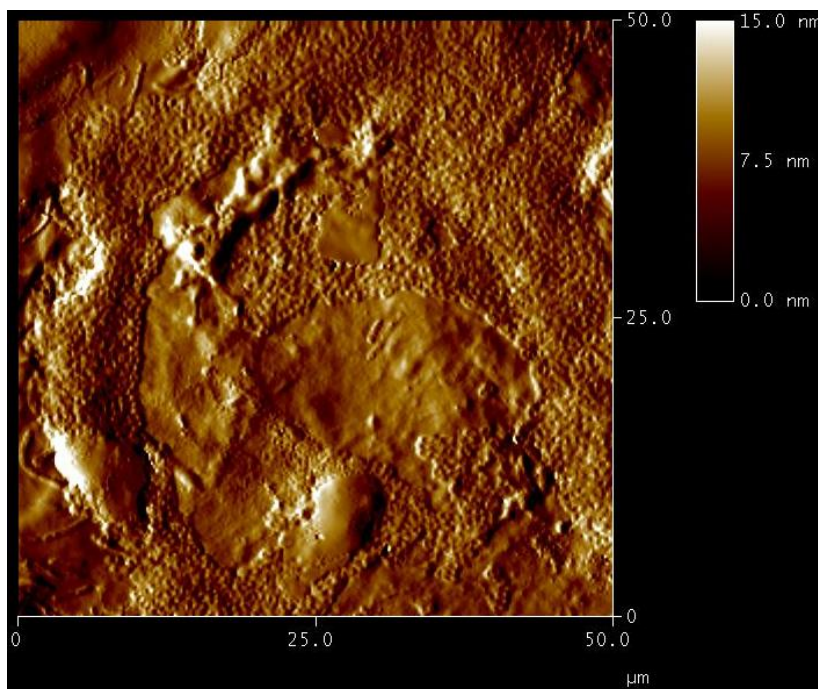
As Figuras 28 e 29 trazem a blenda quitosana/carragenana 50:50 antes e após contato com o sangue, respectivamente. É possível observar uma grande deposição de material biológico. A Figura 30 traz a imagem de fricção resultante da Figura 29. As setas indicam estruturas que possivelmente sejam plaquetas. O formato discoide e ausência de filópodes da estrutura indicada pela seta vermelha sugere uma plaqueta que está apenas aderida a superfície, enquanto que a estrutura indicada pela seta preta pode ser uma plaqueta iniciando o estado de ativação.

Figura 28 - Imagem de deflexão para blenda quitosana/carragenana 50:50 antes do contato com sangue



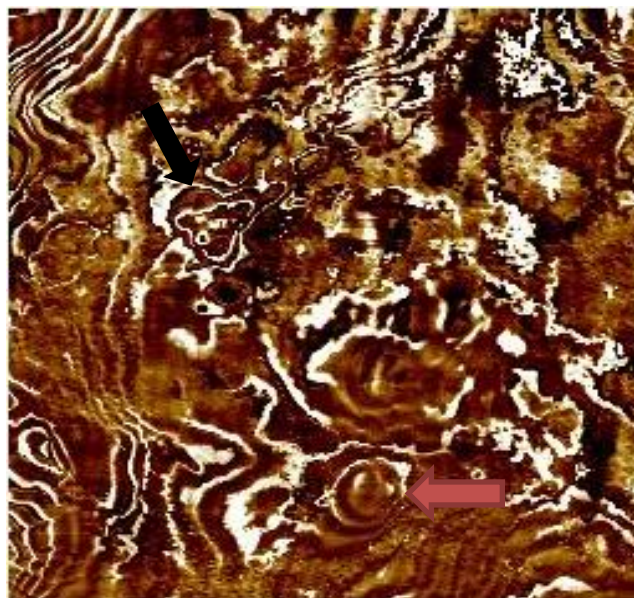
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 - Imagem de deflexão para blenda quitosana/carragenana 50:50 após contato com sangue



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 30 - Imagem de fricção da blenda quitosana/carragenana 50:50 após contato com sangue



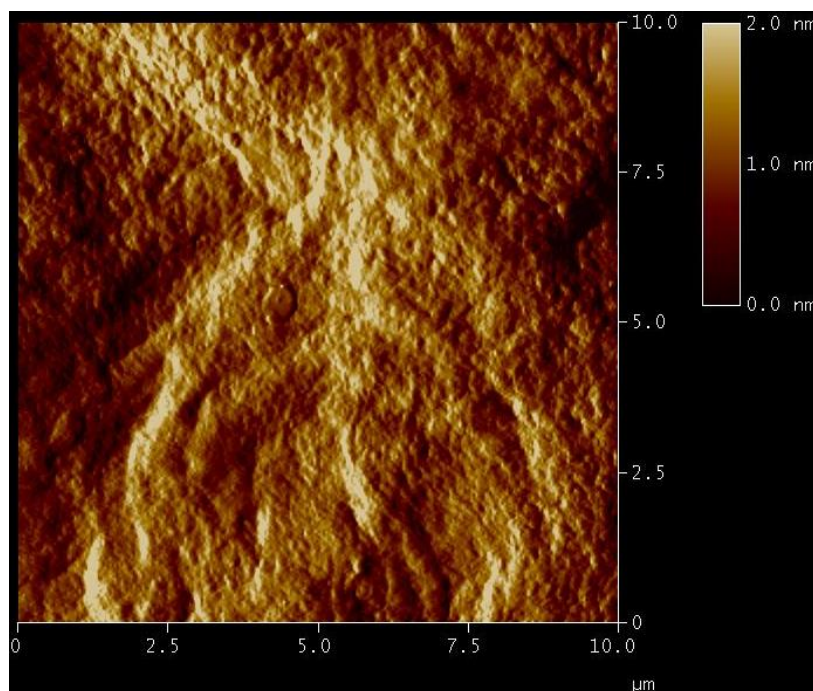
Fonte: Elaborada pelo autor. A seta vermelha indica uma possível plaqueta em estado não ativado (morfologia circular). A seta preta indica uma plaqueta ativada (morfologia ameboide).

As Figuras 31 e 32 são referentes à blenda quitosana/carragenana 25:75 antes e após contato com sangue, respectivamente. De forma similar à blenda quitosana/carragenana 50:50, pode-se observar uma grande deposição de material sanguíneo sobre a superfície. Ao analisarmos a imagem de fricção (Figura 33), pode-se ver que não se trata de um trombo, sendo possivelmente proteínas. De fato, os resultados apresentados por Carneiro *et al.* (2013) mostram que este é o comportamento esperado pelas blendas estudadas.

A κ -carragenana possui um alto grau de intumescimento, o que aumenta a porosidade e área superficial, gerando canais que favorecem a penetração de proteínas. Aliado a isso, temos a rugosidade destes filmes que aumenta de acordo com a quantidade de carragenana em sua composição. A coacervação entre os grupos sulfato e amino ocasiona a combinação das cadeias, com exclusão de água e redução do volume ocupado pelos polímeros, levando a formação de poros localizados.

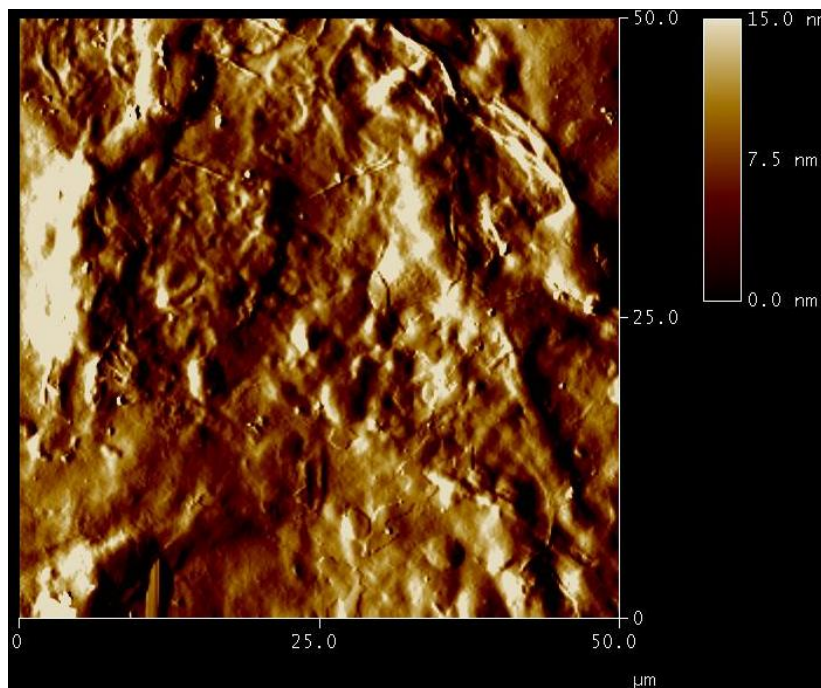
Os resultados obtidos para a adesão plaquetária analisada por MFA estão condizentes com aqueles encontrados nas análises por confocal. O filme de quitosana apresentou trombos em sua superfície, enquanto que as outras amostras apresentaram plaquetas, sendo algumas ativadas, sem, contudo, estarem formando trombos.

Figura 31 - Imagem de deflexão da blenda quitosana/carragenana 25:75 antes do contato com sangue



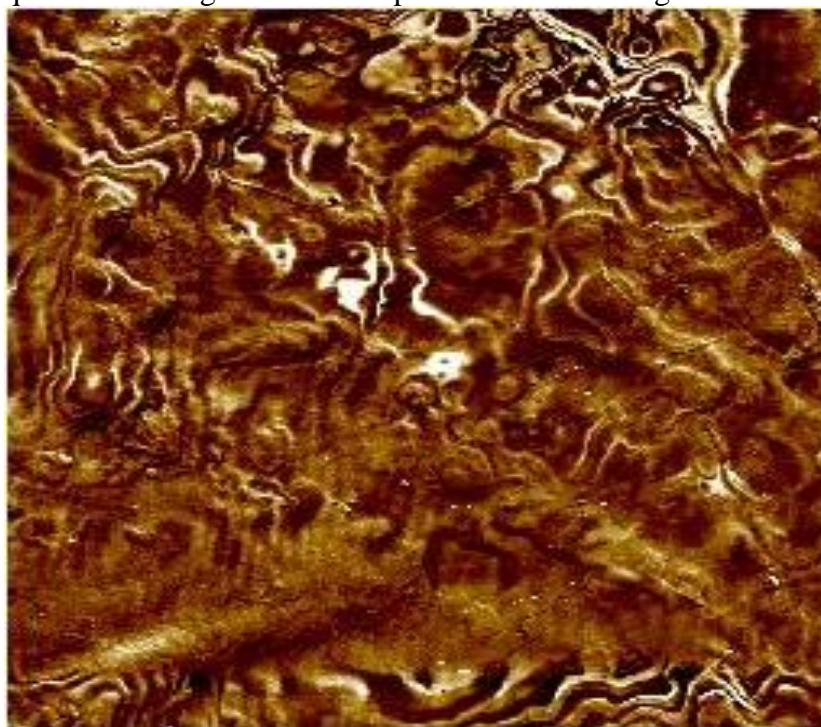
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 32 - Imagem de deflexão da blenda quitosana/carragenana 25:75 após contato com sangue



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 33 - Imagem de fricção da blenda quitosana/carragenana 25:75 após contato com sangue



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Ensaio de calcificação

Foram realizados testes com as amostras de quitosana, quitosana sulfonatada, carragenana e três tipos de blendas quitosana/carragenana: 25:75, 50:50, 75:25 (v/v).

Durante a primeira troca de SBF do ensaio de calcificação, foi observado que o filme de carragenana, preparado com KCl como agente de reticulação, se dissolvia no SBF quando submetido às condições do ensaio. Inicialmente, imaginou-se que isto ocorria devido à força iônica presente na solução de SBF, pois esta apresenta uma grande variedade de sais dissolvidos que poderiam deslocar os íons K^+ responsáveis pela insolubilidade do filme de carragenana.

Então se procedeu a utilização de glutaraldeído e epicloridrina como agentes de reticulação. Os filmes reticulados com epicloridrina e glutaraldeído foram deixados em repouso de 24h em solução de SBF para verificar se ocorreria solubilidade dos filmes. Os filmes reticulados com glutaraldeído com tempos de contato de 2, 5, 10 e 15 minutos não apresentaram estabilidade no SBF e se dissolveram. Os filmes reticulados com glutaraldeído com tempos de contato de 30 e 60 minutos permaneceram insolúveis, assim como o filme reticulado com epicloridrina. Optou-se por utilizar o filme reticulado com glutaraldeído com tempo de contato de 60 minutos para se ter uma margem de segurança maior quanto à estabilidade da reticulação.

Ao se proceder ao ensaio de calcificação, os filmes de carragenana reticulados tanto com epicloridrina quanto com glutaraldeído também se dissolveram. A variável diferente entre o teste de solubilidade feito com os filmes reticulados com glutaraldeído e o ensaio de calcificação foi a temperatura, 25°C e 37°C, respectivamente.

Na literatura, a carragenana é reportada como um gel termorreversível (PHILLIPS e WILLIAMS, 2009) capaz de formar um gel firme e rígido quando resfriada, sobretudo na presença de íons de potássio. Em temperaturas elevadas, o polímero está presente como serpentinas aleatórias. Conforme vai arrefecendo, a carragenana passa a formar duplas hélices, seguida pela agregação destas duplas hélices de modo a formar uma rede polimérica infinita (FARAHNAKY *et al.*, 2013). A agregação é intensificada com a adição de íons potássio que diminui a repulsão entre as cadeias e promove a agregação das duplas hélices, mantendo-se sólida na temperatura ambiente. Porém, a rede de gel é capaz de se dissolver quando a temperatura chega a apenas 5°C acima da temperatura de gelificação (PHILLIPS e WILLIAMS, 2009). Além disso, a presença de íons de sódio em concentrações elevadas é

capaz de induzir a transição conformacional na κ -carragenana, revertendo a conformação de dupla hélice para serpentina aleatória (FARAHNAKY *et al.*, 2013). No caso estudado, a solução de carragenana geleificava ao atingir a temperatura ambiente (25°C) e o ensaio foi conduzido a 37°C, perfazendo uma diferença de 12°C, com uma concentração de Na⁺ de 142 mol/L, o que foi suficiente para dissolver os filmes. Por este motivo, nos outros ensaios não foram utilizados filmes de carragenana.

Este efeito não foi observado nas blendas de quitosana e carragenana devido à interação eletrostática que ocorre entre os grupos amino da quitosana e os grupos sulfato da carragenana (PHILLIPS e WILLIAMS, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2012).

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

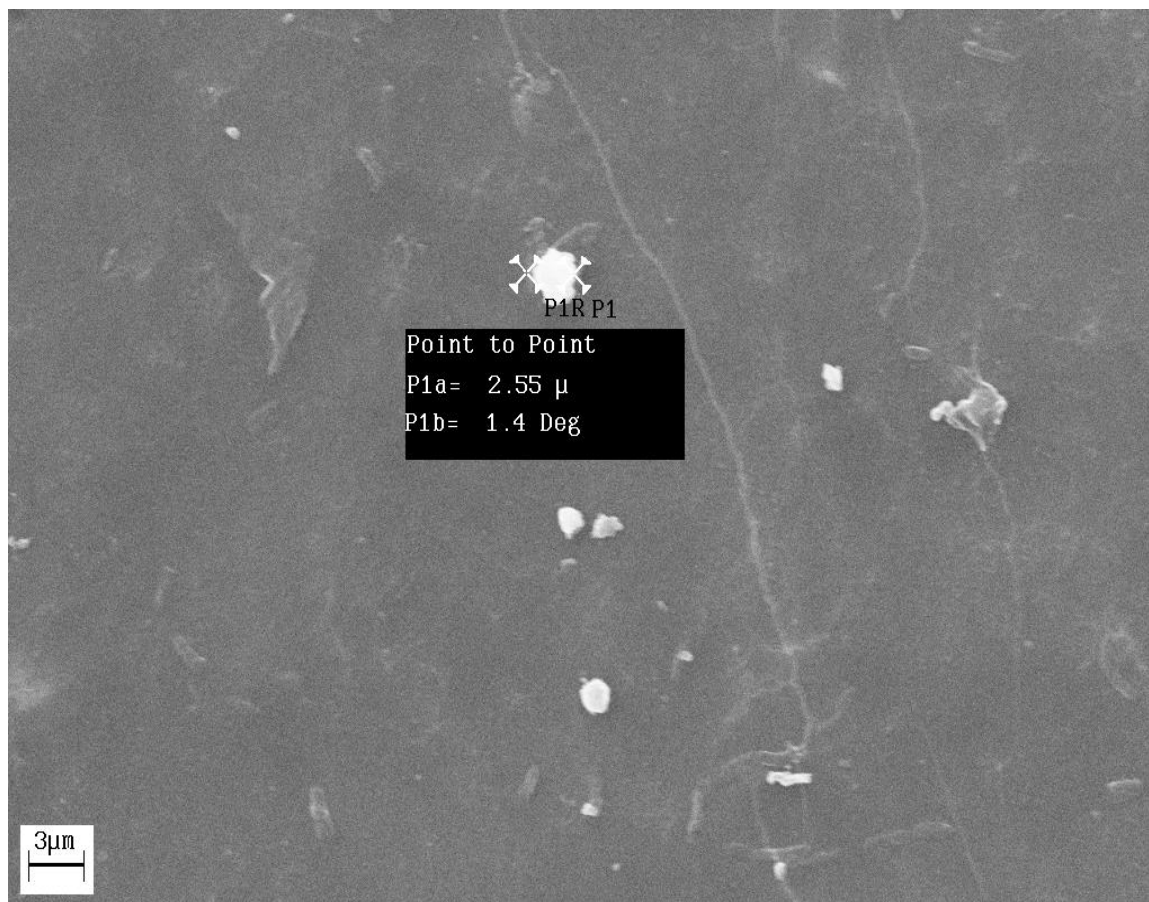
Pelas micrografias, é possível observar a formação de depósitos sobre os filmes estudados. Estes depósitos apresentam tamanho de aproximadamente 2,5 μm (Figura 34), podendo, em alguns casos, apresentarem tamanhos maiores. A forma arredondada dos depósitos, bem como sua estrutura e tamanho, são condizentes com aqueles encontrados em outros estudos de calcificação *in vitro* (BEPPU, 1999; AIMOLI, 2007; WESKA, 2009).

Através das micrografias é possível observar depósitos bem definidos formados nos filmes de quitosana natural e sulfonatada (Figuras 35 e 36). As blendas apresentaram nenhum ou poucos depósitos formados (Figuras 37, 38 e 39).

4.3.2 Microanálise elementar

A análise de EDS mostrou a presença de Na, C, K e O para todas as amostras, além de S para as amostras das blendas e quitosana. Foram realizadas medidas de EDS pontual e por área nas amostras de quitosana, tanto natural quanto sulfonatada. Nas amostras das blendas foram realizadas apenas análises pontuais. Os resultados para a porcentagem de cálcio obtida para os filmes de quitosana natural e sulfonatada encontram-se na Tabela 3.

Figura 34 - Tamanho médio dos depósitos formados durante ensaio de calcificação



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Microanálise elemental de cálcio por área e pontual

	% Ca			
	Área		Pontual	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Quitosana natural	0,125	0,08	12,79	8,61
Quitosana sulfonatada	0,093	0,03	5,54	8,13

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise pontual, o valor percentual de cálcio obtido para a quitosana natural é de 2,3 vezes o valor encontrado para a quitosana sulfonatada, enquanto que na análise por área, o valor obtido para a quitosana natural é aproximadamente 1,3 vezes maior do que o valor da quitosana sulfonatada. Esta diferença pode estar relacionada à quantidade de NaCl adsorvido na superfície dos filmes analisados mostrando (AIMOLI, 2007). Através da análise de EDS, foi possível verificar que a maioria dos depósitos formados não continha fósforo, o que pode indicar que não houve formação de hidroxiapatita, que é a fase mineral encontrada

no processo de calcificação de próteses e aparelhos implantados (BEPPU, 1999), sendo os depósitos possivelmente de cloreto de sódio, carbonato de cálcio ou magnésio, quando estes elementos estão presentes. A quantificação percentual de carbono foi excluída em todas as análises.

As Figuras de 40 a 44 mostram os pontos selecionados para as análises pontuais de EDS. Nos pontos analisados para a blenda quitosana/carragenana 50:50 não foi indicada a presença de cálcio ou de fósforo. Nestes pontos, foram encontrados apenas oxigênio, sódio e cloro. Os depósitos, quando encontrados, são basicamente NaCl. Para as amostras de quitosana sulfonatada e blenda quitosana/carragenana 75:25 foram encontrados, além daqueles presentes na blenda quitosana/carragenana 50:50, os elementos cálcio e magnésio. As médias para estes dois elementos foram, respectivamente, 5,54% e 1,88% para quitosana sulfonatada e 10,93% e 0,55% para blenda quitosana/carragenana 75:25.

Nas amostras de quitosana natural e blenda quitosana/carragenana 25:75 foi possível observar a presença de fósforo, em adição aos elementos encontrados nas outras amostras. Os valores médios para cálcio e fósforo nestas amostras foram, respectivamente, 12,79% e 1,49% para a quitosana natural e 6,02% e 5,33% para a blenda quitosana/carragenana 25:75.

A razão Ca/P para os pontos das amostras que mostraram a presença de fósforo foi de 0,11, para a blenda quitosana/carragenana 25:75, e 2,78, para a quitosana natural. Na Tabela 4, estão relacionados valores da razão Ca/P para diversos tipos de fosfatos de cálcio.

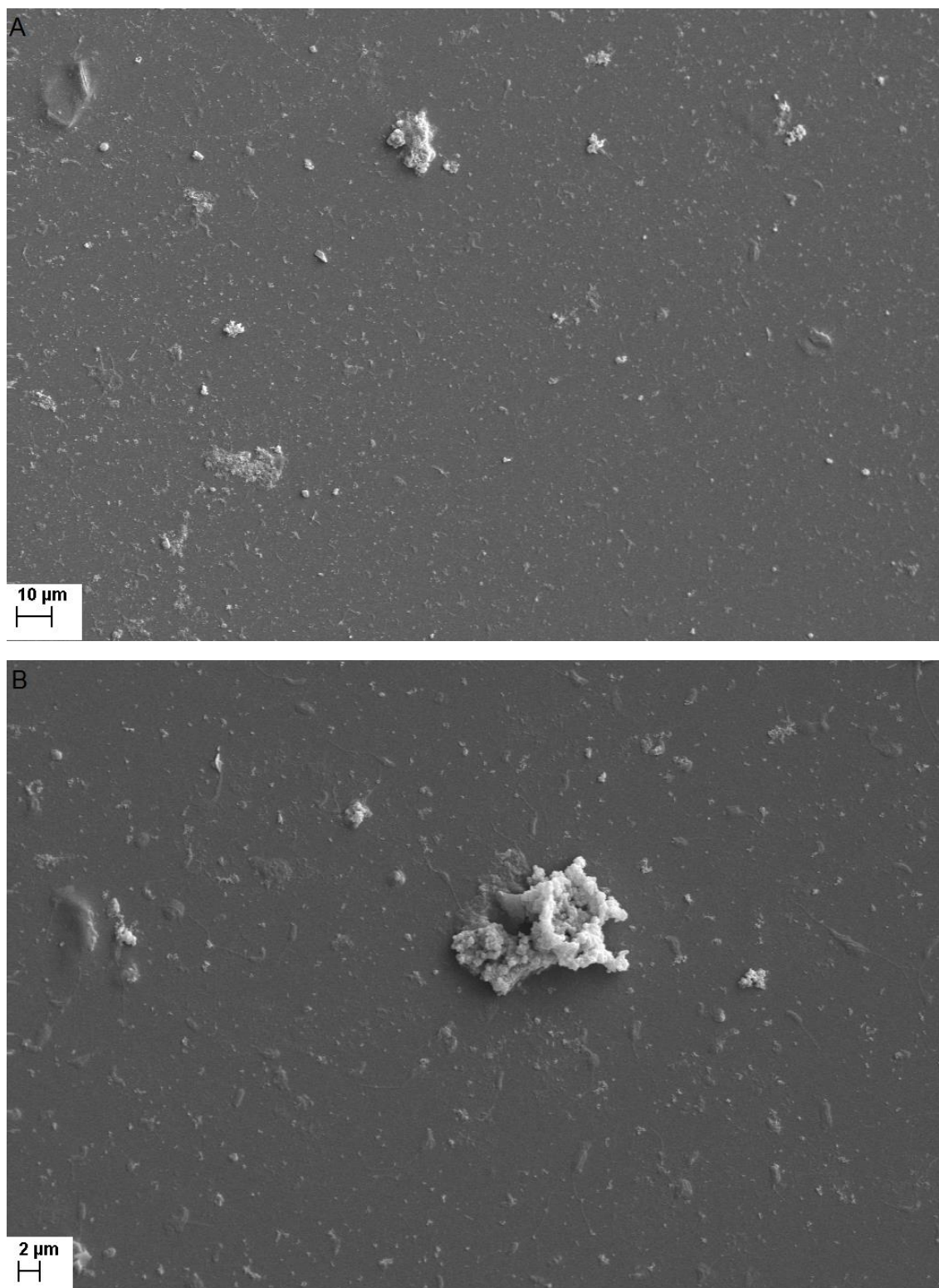
Tabela 4 - Razão Ca/P para diversos tipos de fosfatos de cálcio

Razão Ca/P	Nome	Fórmula
2,0	Fosfato tetracálcio	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
1,67	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1,50	Fosfato tricálcio (α , β , γ)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,33	Fosfato octacálcio	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,00	Fosfato dicálciodihidratado ou Brushita	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,00	Fosfato dicálcio anidro ou Monetita	CaHPO_4
1,00	Pirofosfato de cálcio (α , β , γ)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
1,00	Pirofosfato de cálcio dihidratado	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,7	Fosfato heptacálcio	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$
0,5	Metafosfato de cálcio (α , β , γ)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$

Fonte: Aimoli, 2007.

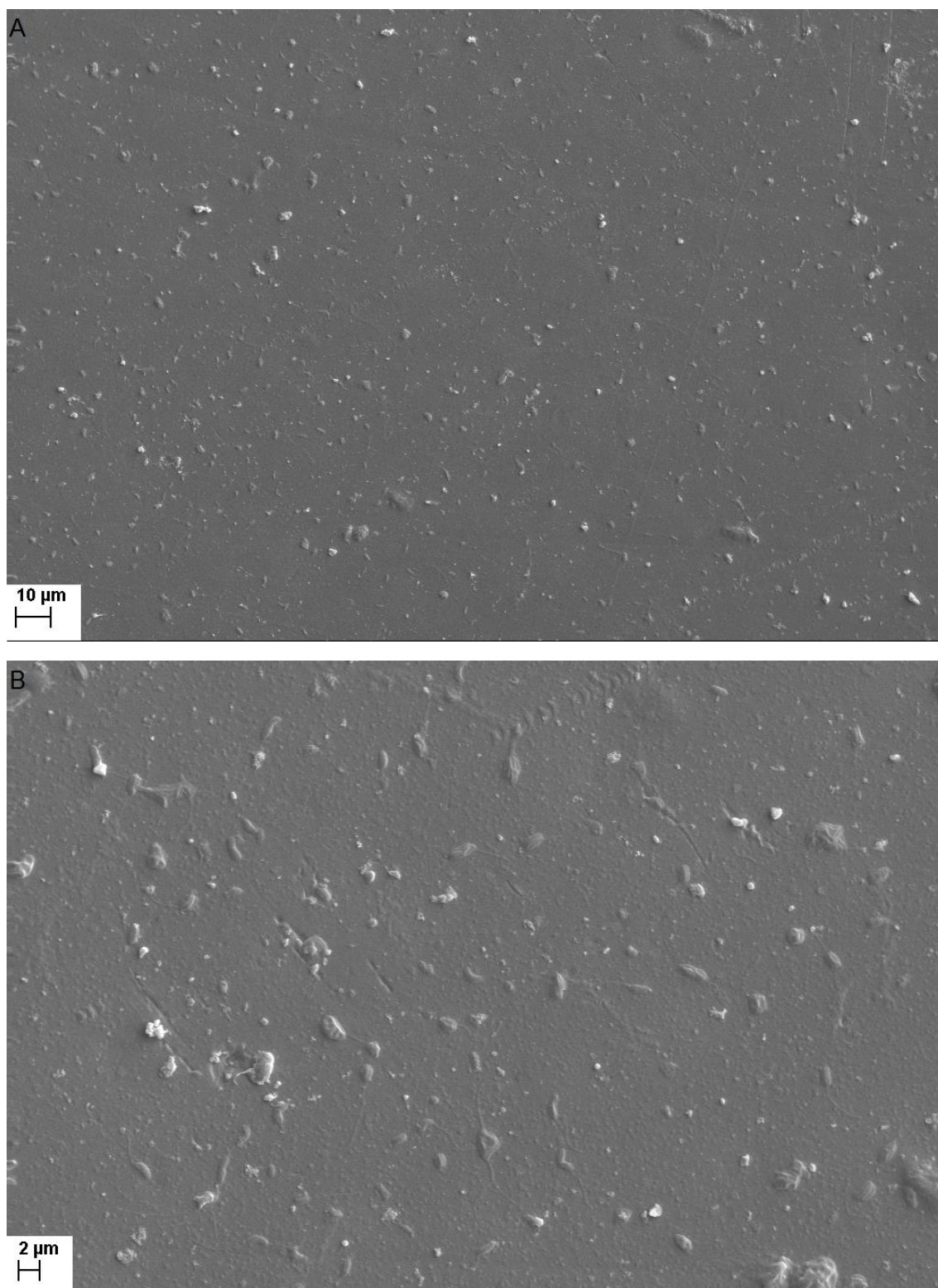
Pelo valor obtido da razão Ca/P da quitosana natural, pode-se ter a presença de hidroxiapatita entre os depósitos formados.

Figura 35 - Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de quitosana natural após calcificação em SBF



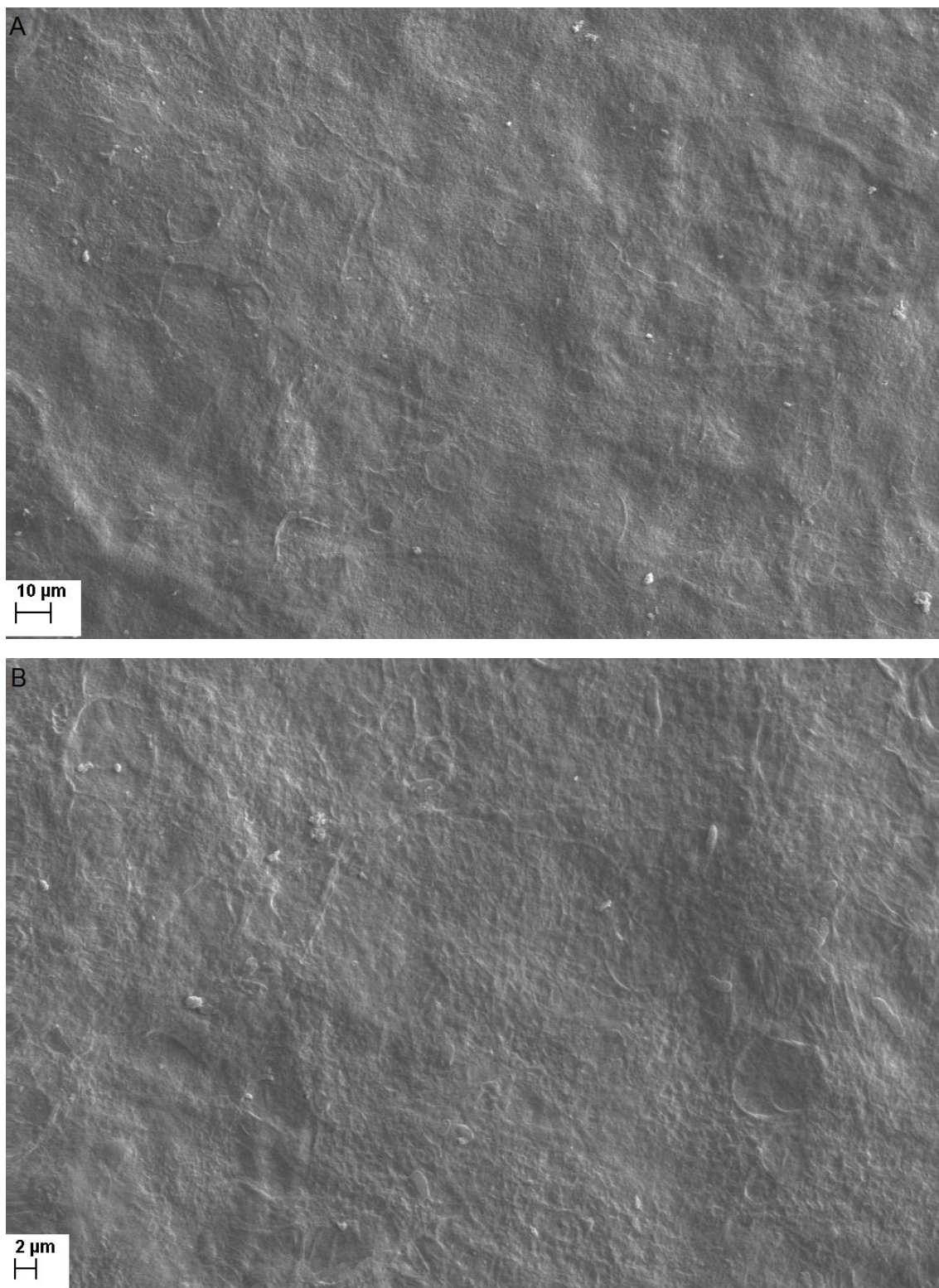
Fonte: Elaborada pelo autor. (A) Magnificação de 1.000 vezes. (B) Magnificação de 3.000 vezes.

Figura 36 - Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de quitosana sulfonada após calcificação em SBF



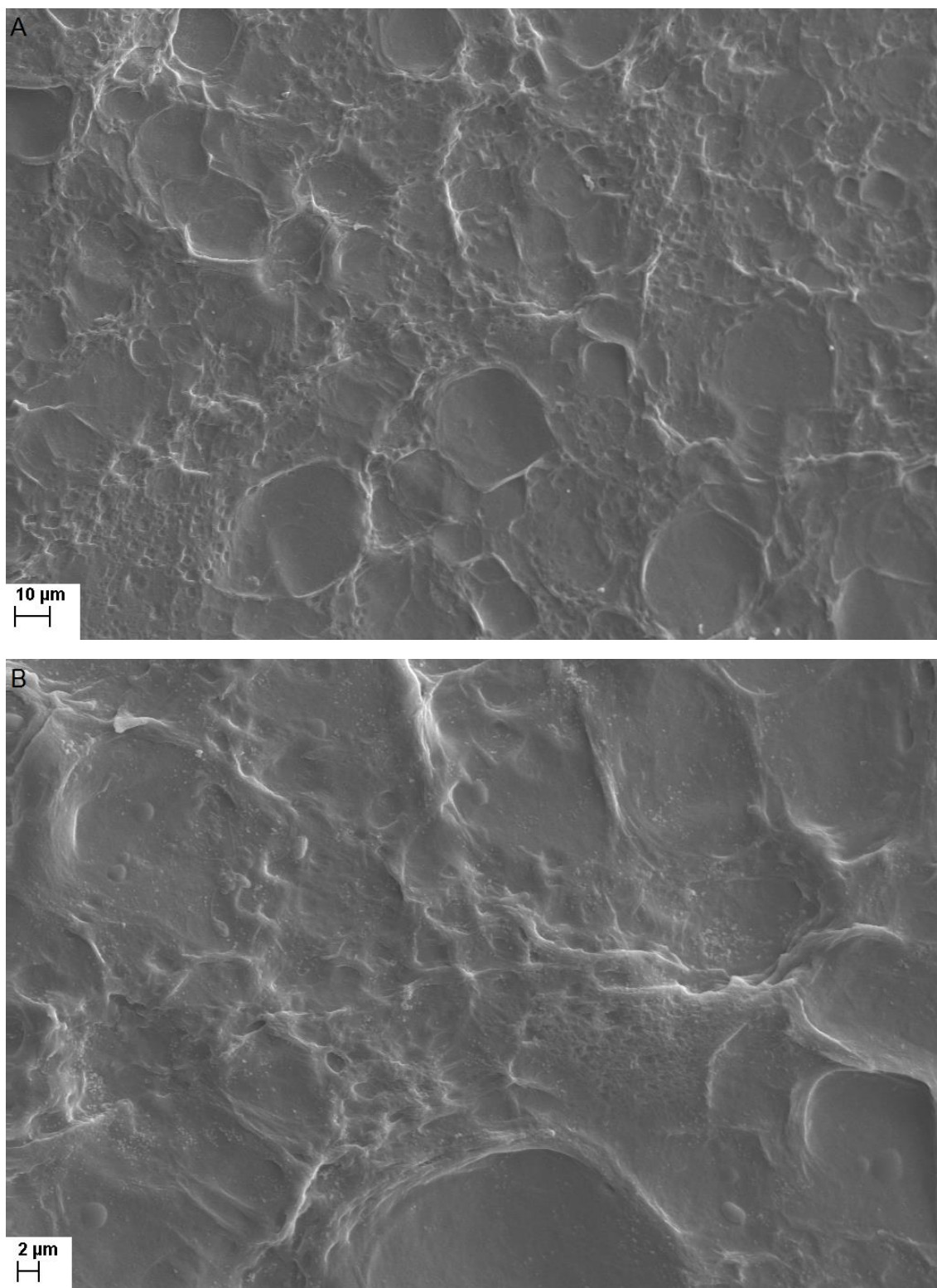
Fonte: Elaborada pelo autor. (A) Magnificação de 1.000 vezes. (B) Magnificação de 3.000 vezes.

Figura 37 - Micrografias eletrônicas de varredura da blenda quitosana/carragenana 25:75 (v/v) após calcificação em SBF



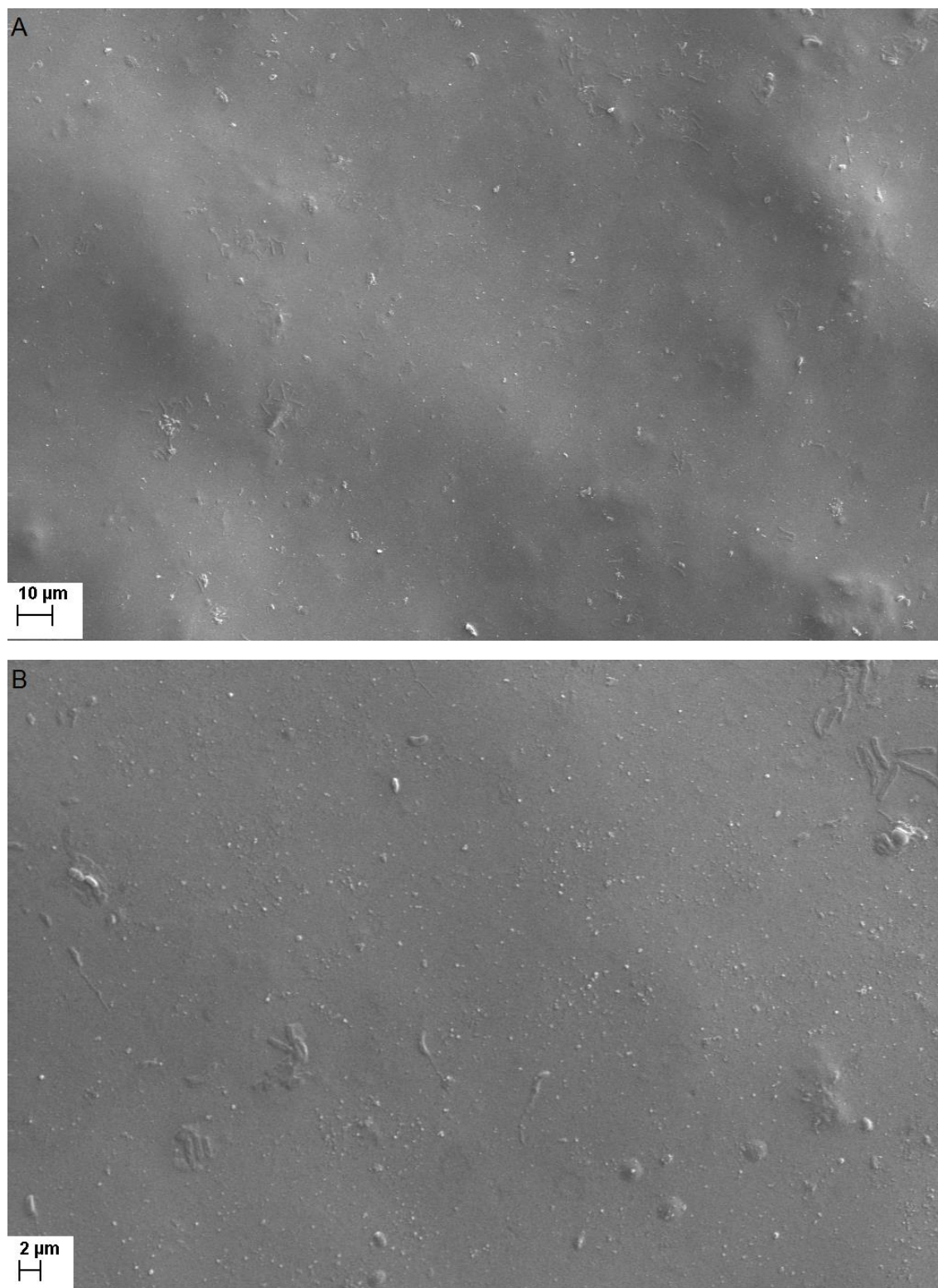
Fonte: Elaborada pelo autor.(A) Magnificação de 1.000 vezes. (B) Magnificação de 3.000 vezes.

Figura 38 - Micrografias eletrônicas de varredura da blenda quitosana/carragenana 50:50 (v/v) após calcificação em SBF



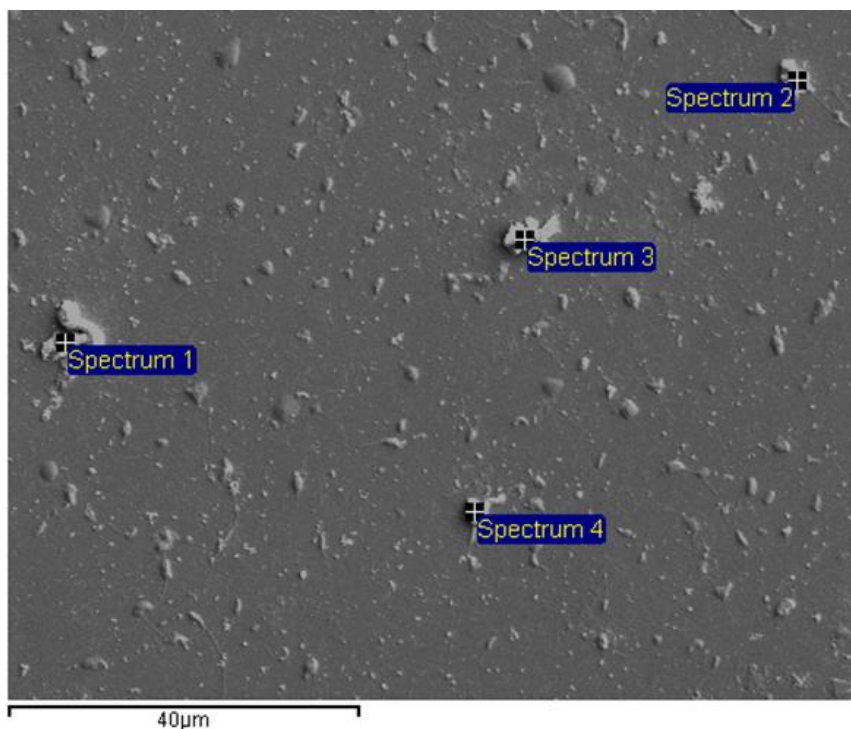
Fonte: Elaborada pelo autor. (A) Magnificação de 1.000 vezes. (B) Magnificação de 3.000 vezes.

Figura 39 - Micrografias eletrônicas de varredura da blenda quitosana/carragenana 75:25 (v/v) após calcificação em SBF



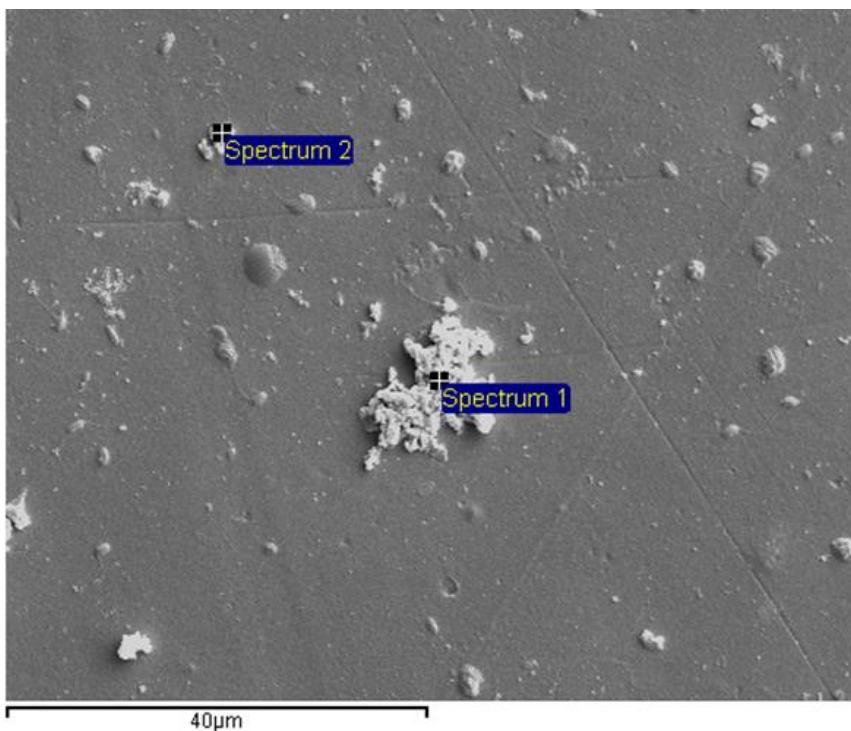
Fonte: Elaborada pelo autor. (A) Magnificação de 1.000 vezes. (B) Magnificação de 3.000 vezes.

Figura 40 - Pontos selecionados para análise de EDS da quitosana natural



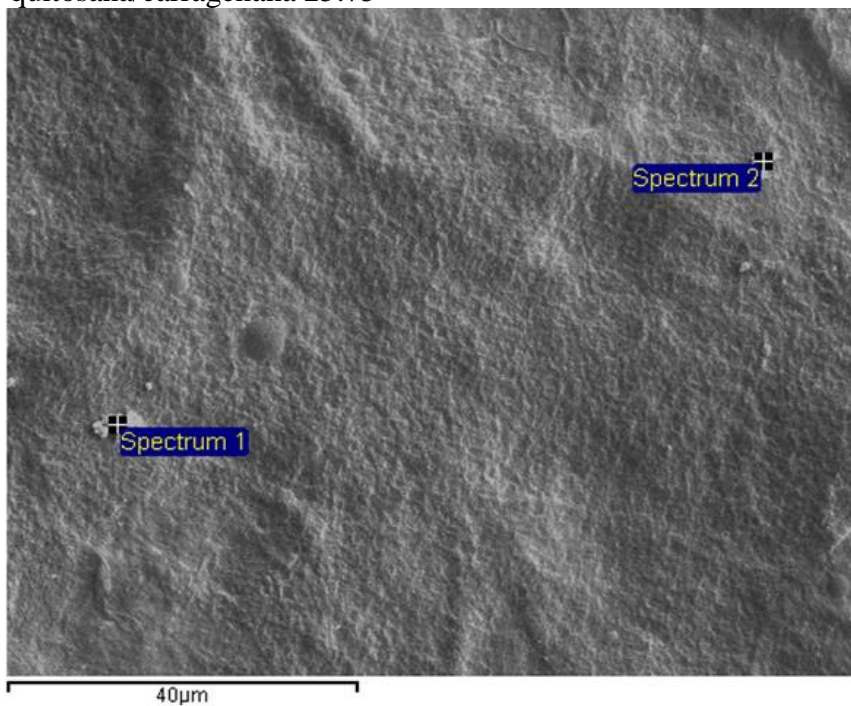
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 41 - Pontos selecionados para análise de EDS da quitosana sulfonatada



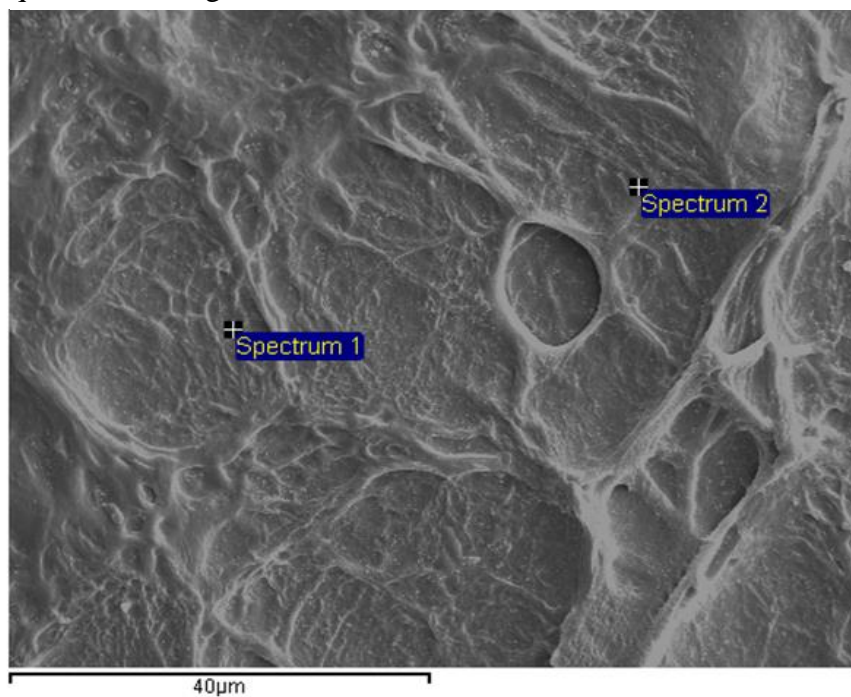
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 42 - Pontos selecionados para análise de EDS da blenda quitosana/carragenana 25:75



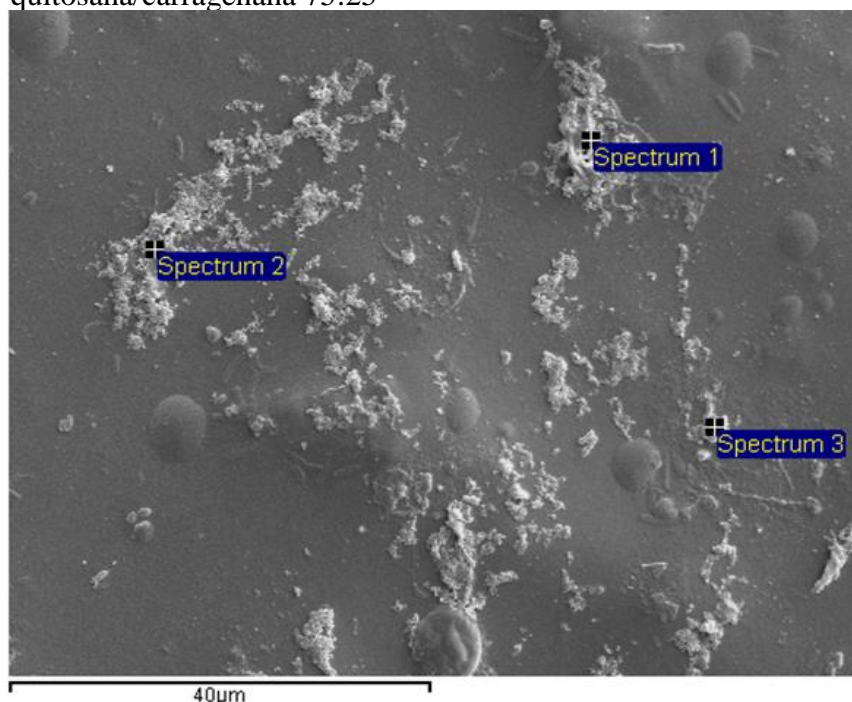
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 43 - Pontos selecionados para análise de EDS da blenda quitosana/carragenana 50:50



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 44 - Pontos selecionados para análise de EDS da blenda quitosana/carragenana 75:25



Fonte: Elaborada pelo autor.

O fenômeno de calcificação ainda não está bem elucidado. Pesquisas apontam que a quitosana pode promover a calcificação devido à natureza nucleófila do átomo de nitrogênio (AIMOLI, TORRES e BEPPU, 2006). Por apresentar um par de elétrons livre, o nitrogênio estaria livre para se ligar ao cálcio formando um sítio de nucleação. Outro fato importante é a capacidade da quitosana em agir como um quelato para cátions (FURLAN, FÁVERE e LARANJEIRA, 1996), o que poderia contribuir com o processo de nucleação do cálcio e promoção da calcificação. Aimoli e Beppu (2006) citam a quitosana como um bom substrato para a deposição tanto em soluções ricas em fósforo, quanto naquelas pobres neste elemento. Diversos trabalhos podem ser encontrados na literatura versando sobre a capacidade da quitosana de promover osteoindução e osteocondução de forma ordenada (MUZZARELLI *et al.*, 1994; YUAN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009; MORALES *et al.*, 2014).

Embora a quitosana seja bastante utilizada na regeneração óssea, por oferecer sítios para nucleação do cálcio, alguns estudos apontam que a quitosana pode ser utilizada como um agente anticalcificante de tecidos moles. Chanda (1994) realizou estudo *in vivo* do efeito da quitosana sobre a calcificação de pericárdio bovino previamente tratado com glutaraldeído. Os grupos aldeído livres presentes no glutaraldeído são apontados como um

dos fatores que acarretam a calcificação do pericárdio bovino, sendo a rugosidade da sua superfície o outro (CHANDA, 1994; NOGUEIRA *et al.*, 2010). No estudo de Chanda (1994), foi verificado que os grupos amino livres, presentes na estrutura da quitosana, podem se ligar com os aldeídos da superfície da bioprótese, além de preencher os espaços dentre as fibrilas de tropocolágeno diminuindo a rugosidade da superfície. Estes dois fatores seriam responsáveis pela diminuição da calcificação. Nogueira *et al.* (2010), realizando estudo comparativo entre pericárdio bovino não tratado e tratado com quitosana, chegaram a resultados similares ao de Chanda (1994). A quitosana foi capaz de reduzir a calcificação quando comparados os pericárdios com e sem tratamento prévio com quitosana, ou seja, os pericárdios que foram tratados com quitosana apresentaram menor susceptibilidade a formar depósitos de cálcio. O resultado foi atribuído à ação da quitosana em preencher as irregularidades da superfície tornando-a menos susceptível a deposição de cálcio. Nos filmes de quitosana, a natureza catiônica dos grupos amino, presentes em sua estrutura, é apontada como responsável por diminuir o efeito de calcificação através de repulsão eletrônica. (CHANDA, 1994; PARK *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2001).

Alguns estudos mostram que grupos carregados positivamente, tais como o grupo amino, e íons, como Al^{3+} e Fe^{3+} , são capazes de inibir o crescimento de cristais de hidroxiapatita e repelem os íons de cálcio, dificultando sua deposição sobre a superfície do biomaterial. Pathak *et al.* (1990) compararam o efeito de duas matrizes poliméricas (Biomer e Silastic 6605-41), com e sem liberação controlada de Fe^{3+} e Al^{3+} , sobre a calcificação de pericárdio bovino. Os resultados mostraram uma calcificação menor do pericárdio revestido (calcificação de 91,16% para Biomer e 96,67% para Silastic 6605-41) quando comparado com o natural (calcificação 100%). Os resultados com a liberação controlada dos íons mostraram uma redução em mais de 80% para a matriz de Silastic 6605-41 liberando qualquer um dos íons estudados. A matriz de Biomer apresentou redução na calcificação de 38% e 60% com a liberação de Fe^{3+} e Al^{3+} , respectivamente.

Desta forma, o filme de quitosana natural apresenta um mecanismo de retardo da calcificação através da repulsão eletrônica entre seus grupos amino e os íons de cálcio responsáveis pela formação dos núcleos de calcificação.

Nas blendas, temos a presença dos grupos sulfatos provenientes da estrutura da carragenana. Estes grupos possuem natureza aniônica e como tal apresentam afinidade por cargas positivas. Desta forma, seria esperado que eles atraíssem os átomos de cálcio e promovessem a calcificação. Porém, não foi o ocorrido. Como já foi demonstrado, as blendas

apresentaram poucos ou nenhum depósito de cálcio. Existem estudos que podem explicar este fenômeno. Park *et al.* (1997) utilizaram óxido de polietileno sulfonado (PEO-SO₃) para modificar a superfície de tecido bioprostético, observando que esta modificação foi capaz de reduzir o efeito da calcificação em válvula aórtica porcina. O mecanismo de ação envolvido não estava elucidado no primeiro momento. Em outro estudo, Lee *et al.* (2001) enxertaram PEO-SO₃ e heparina em pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e obtiveram resultados que mostram a influência dos grupos sulfatados na calcificação. Estes resultados apontam que, assim como na PEO-SO₃ e heparina, os grupos sulfato, presentes na carragenana, e sulfonatos, presentes na quitosana sulfonada, causam uma redução localizada do pH, aumentando a solubilidade dos compostos de cálcio formados, retardando, assim, a formação dos núcleos de cálcio nos estágios iniciais da calcificação (LEE *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 1997).

De fato, pode-se observar que as blendas e a quitosana sulfonada são menos propensas a formar depósitos de cálcio do que a quitosana natural. Isto pode ser explicado pela forma sinérgica com a qual os dois mecanismos acima citados (repulsão eletrônica dos íons Ca²⁺ pelos grupos amino e diminuição localizada do pH gerada pelos grupos sulfatados) agem nestes filmes, enquanto apenas a repulsão eletrônica age nos filmes de quitosana natural.

4.3.3 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

Foram realizadas análises de FTIR para todas as amostras antes e após o ensaio de calcificação. Para a quitosana natural, pode-se observar a presença de bandas em torno de 1642 cm⁻¹, associado ao carbonil (C=O-NHR), em 1569 cm⁻¹, referente à vibração proveniente dos grupos amino (-NH₂), em 1372 cm⁻¹, devido a deformação assimétrica angular do da ligação CH, em 1151 cm⁻¹, característico da ligação glicosídica β (1-4) entre os monômeros da quitosana, em 1057 cm⁻¹, devido a vibração de alongamento da ligação C-O-C presente no anel glicosídico, e em 1022 cm⁻¹ referente a ligação C-N. Para as blendas, além destas bandas, pode-se observar a presença de bandas em 1247 cm⁻¹, referente a vibração e alongamento da ligação S=O presente nos grupos sulfatos, em torno de 1060 cm⁻¹, atribuído a ligação glicosídica α (1-3) entre os monômeros da carragenana, em 930 cm⁻¹, devido ao monômero de 3,6-anidrogalaactose, e em 846 cm⁻¹, referente ao monômero de galactose-4-

sulfato. Na quitosana sulfonatada, pode-se observar as mesmas bandas encontradas na quitosana natural com adição da banda em 817 cm^{-1} atribuída a ligação C-O-S.

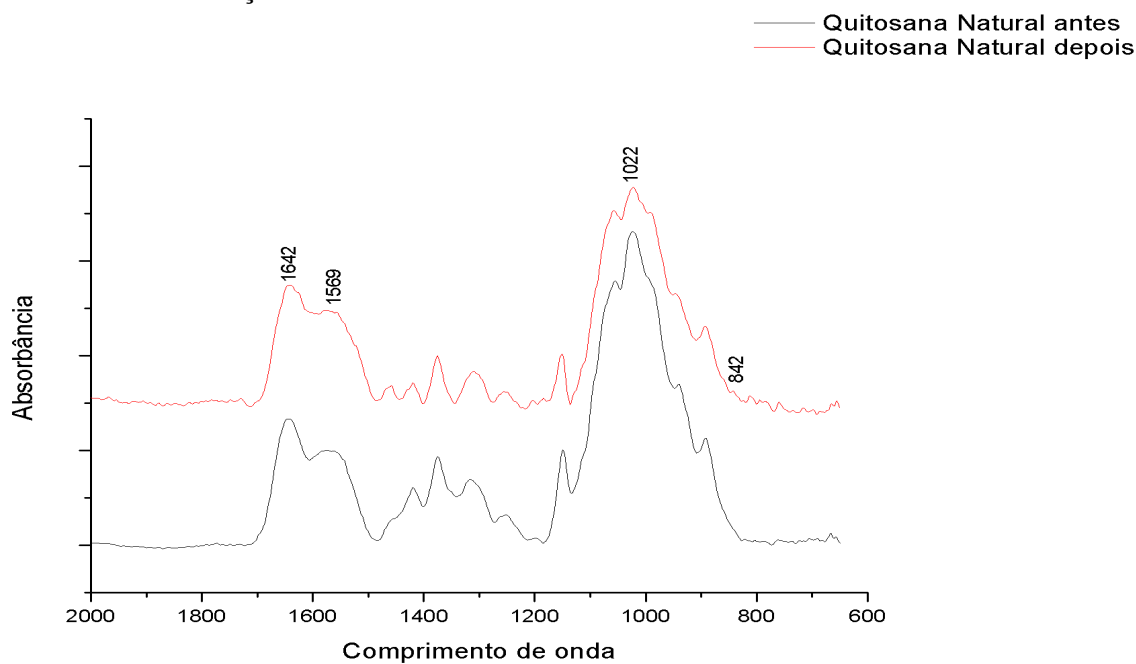
As Figuras 45 a 49 trazem a comparação entre os espectrogramas de cada amostra antes e após o ensaio de calcificação. Através delas podemos observar que não há mudanças nas principais bandas das amostras, porém há o surgimento de uma banda em 842 cm^{-1} no espectrograma da quitosana natural depois da calcificação (AIMOLI e BEPPU, 2006). Este pico indica a presença de HPO_4^{2-} na amostra, o que reforça o resultado obtido na análise de EDS.

Na literatura é relatado que o fosfato de cálcio produz uma banda de absorção entre 1200 e 1000 cm^{-1} resultante do estiramento do grupo $\text{PO}_4^{-3}(\nu\text{P-O})$ e da deformação antissimétrica do grupo PO_3^{-2} . Os sinais ν_2 , ν_3 e ν_4 do grupo PO_4^{-3} ocorrem em 560 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} e 602 cm^{-1} , respectivamente (AIMOLI, 2007; BASKAR, BALU e KUMAR, 2011). A ausência dessas bandas características nos espectros obtidos retifica que não houve formação de fosfato de cálcio nas amostras analisadas.

Ao serem comparados os espectrogramas obtidos para as amostras com um espectrograma típico da hidroxiapatita, como o encontrado em Ratner *et al.* (2004), pode-se observar a ausência da larga banda de absorção entre 1200 e 1000 cm^{-1} característica dos fosfatos. Além disso, seria esperada a presença de bandas de absorção largas e mal formadas características dos fosfatos amorfos de cálcio, devido aos íons que não sofrem distorções regulares como aconteceria em um retículo cristalino (AIMOLI e BEPPU, 2006). Nas amostras analisadas, apenas a quitosana natural apresentou a formação de fosfatos, evidenciando o comportamento calcificante bastante relatado na literatura.

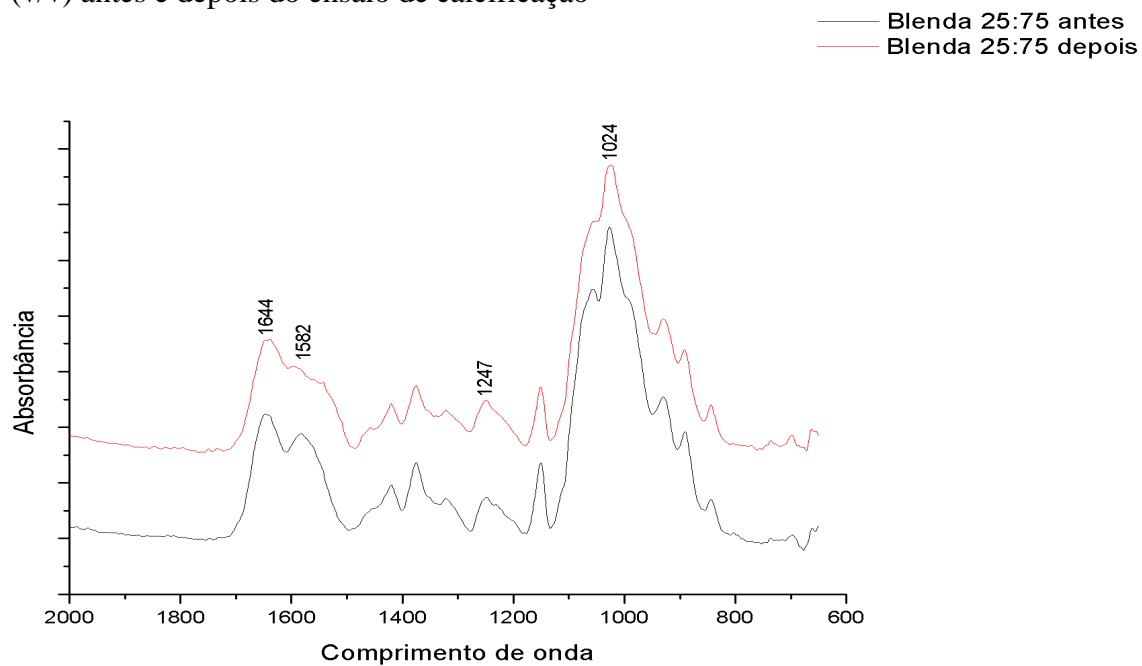
Ao serem comparados os espectrogramas obtidos para as amostras com um espectrograma típico da hidroxiapatita, pode-se observar a ausência da larga banda de absorção entre 1200 e 1000 cm^{-1} característica dos fosfatos. Além disso, seria esperada a presença de bandas de absorção largas e mal formadas características dos fosfatos amorfos de cálcio, devido aos íons que não sofrem distorções regulares como aconteceria em um retículo cristalino (AIMOLI e BEPPU, 2006).

Figura 45 – Espectrogramas de infravermelho da quitosana natural antes e depois do ensaio de calcificação



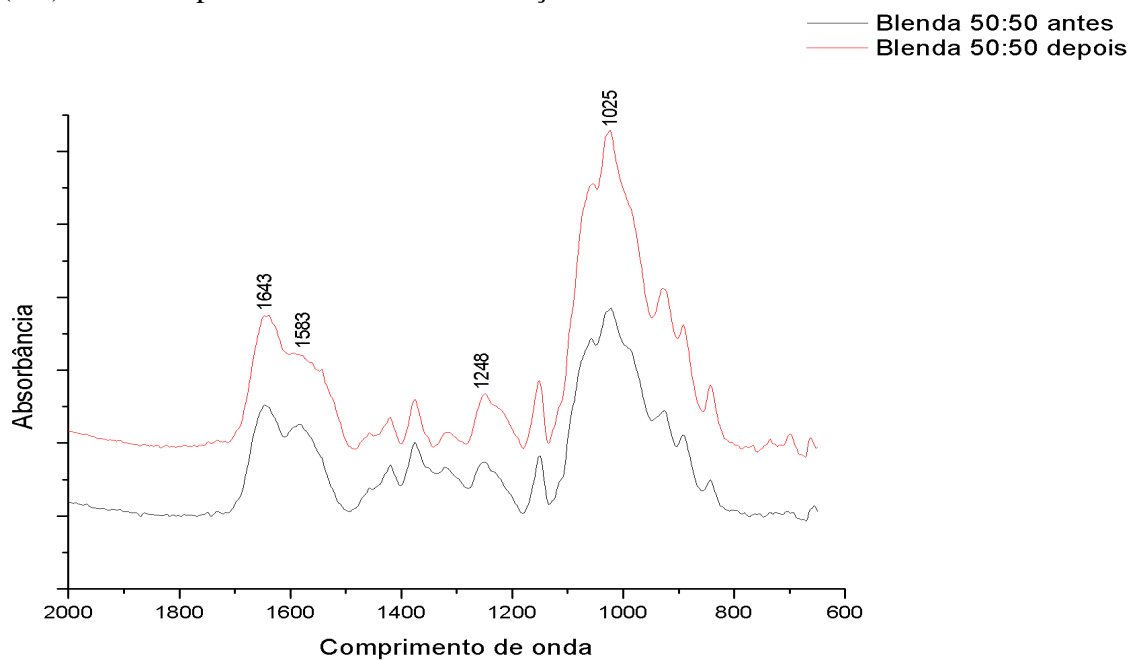
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 46 - Espectrogramas de infravermelho da blenda quitosana/carragenana 25:75 (v/v) antes e depois do ensaio de calcificação



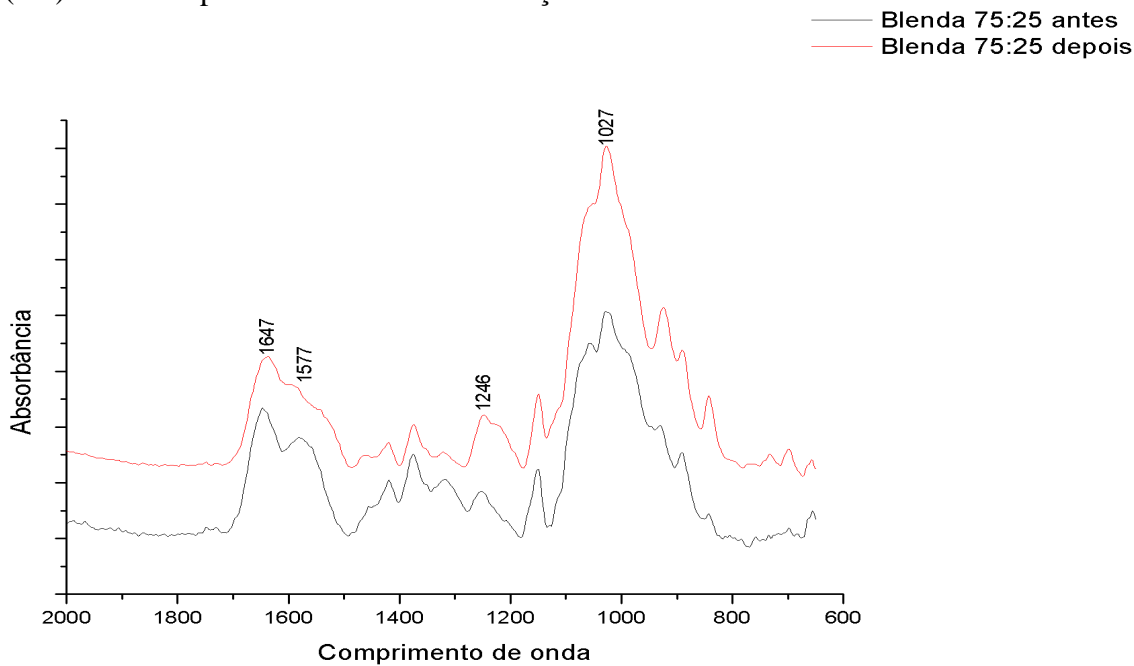
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 47 – Espectrogramas de infravermelho de blenda quitosana/carragenana 50:50 (v/v) antes e depois do ensaio de calcificação



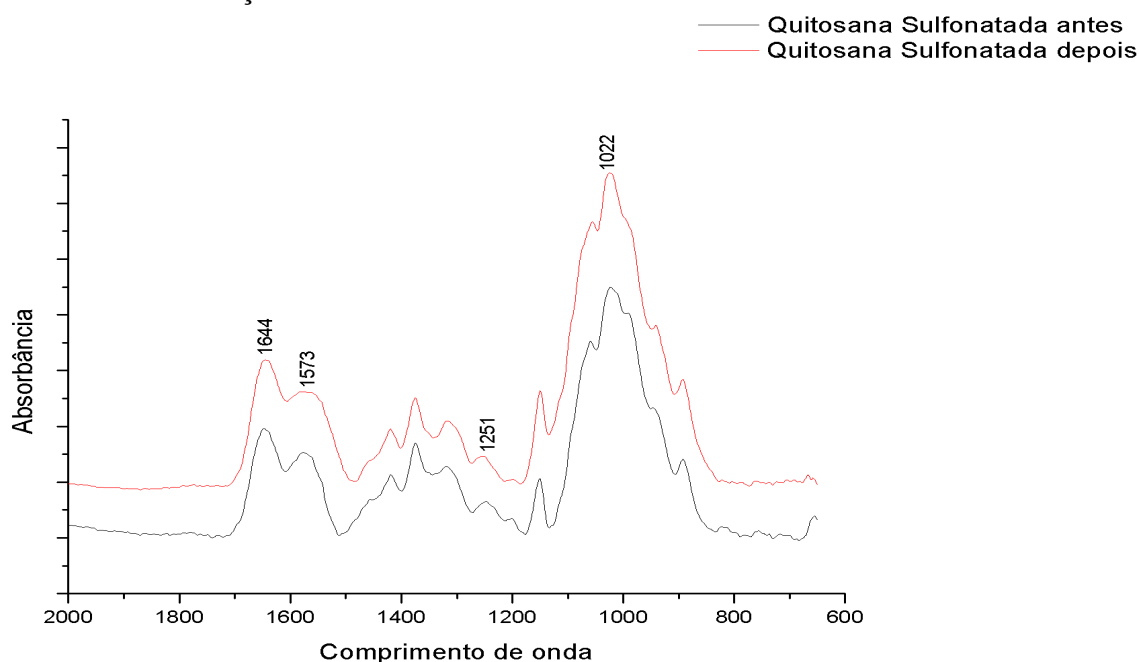
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 48 - Espectrogramas de infravermelho da blenda quitosana/carragenana 75:25 (v/v) antes e depois do ensaio de calcificação



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 49 - Espectrogramas de infravermelho da quitosana sulfonatada antes e depois do ensaio de calcificação



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Ensaio de revestimento

Os resultados de revestimento foram realizados no Laboratoire de Biomateriaux et Bioingénierie da Université Laval. As análises de XPS, MFA e ângulo de contato foram realizadas nas amostras após cada etapa de modificação de superfície.

4.4.1 Espectroscopia de Foto-Elétrons de raios-X (XPS)

A composição química do aço inoxidável eletropolido, do aço após o recobrimento com dopamina, da superfície após o *grafting* de PEGb e dos polímeros são mostradas na Tabela 5.

A análise de XPS mostra que após a formação do filme de polidopamina não há detecção de elementos metálicos. Isto se deve ao fato da dopamina se autopolimerizar nas condições do experimento (ausência de luz, pH 8,6), formando um filme aderente de polidopamina capaz de recobrir homogeneamente a superfície metálica, o que é evidenciado pela porcentagem atômica similar a composição teórica da dopamina: 72,7% de C, 18,2% de

O e 9,1% de N (SAIDIN *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2013; FAURE *et al.*, 2013). Além disso, o surgimento de sinal em 397 eV, referente ao sinal N1s, o aumento do sinal C1s e a diminuição do sinal O1s, concomitantemente, contribuem para a afirmação de que a dopamina foi depositada com sucesso sobre a superfície metálica.

Tabela 5 - Composição química por XPS das amostras de aço inoxidável eletropilada e após reação com dopamina PEGb e quitosana natural e sulfonatada

Amostra	Porcentagem atômica (%)					
	C	O	N	S	Cr	Fe
SS	25,8 ± 5,14	53,2 ± 1,44	-	-	11,3 ± 2,08	9,7 ± 2,46
SS-Dopa	69,6 ± 0,60	23,4 ± 0,40	7,0 ± 0,15	-	< 0,1	< 0,1
SS-Dopa-PEGb	70,3 ± 0,65	22,6 ± 0,66	6,9 ± 0,06	-	< 0,1	< 0,1
SS-Dopa-PEGb-Chi	61,7 ± 1,46	31,1 ± 1,15	7,1 ± 0,25	-	< 0,1	< 0,1
SS-Dopa-PEGb-SChi	67,0 ± 0,65	24,9 ± 0,45	7,0 ± 0,17	0,9 ± 0,06	< 0,1	< 0,1

Fonte: Elaborada pelo autor. SS – aço inoxidável; SS-Dopa – aço inoxidável recoberto com dopamina; SS-Dopa-PEGb – aço inoxidável recoberto com dopamina e grafting de PEGb; SS-Dopa-PEGb-Chi – aço inoxidável recoberto com dopamina e grafting de PEGb e quitosana natural; SS-Dopa-PEGb-SChi – aço inoxidável recoberto com dopamina e grafting de PEGb e quitosana sulfonatada.

A análise de composição química não mostrou diferenças entre a superfície revestida de dopamina e a superfície após a modificação com PEGb, devido a estrutura do PEGb ser composta apenas de C e O e ao fato de que o PEGb não se liga formando uma camada sobre a superfície de dopamina, mas se liga para formar hastes sobre a superfície. Porém, a curva ajustada do espectro de alta resolução de C1s da superfície recoberta com dopamina apresenta picos em 285,0 e 286,5 eV, referentes aos pares de ligações C-C; C-H e C-O; C-N, respectivamente. O surgimento de um pico em 288,8 eV, referente a ligação C=ONH, no espectro de alta resolução de C1s indica a ligação entre o grupo amino da dopamina e o grupo carboxil do PEGb.

Ao se comparar a superfície modificada por dopamina com a superfície da quitosana natural após o *grafting* observa-se uma redução na porcentagem atômica de carbono de 70,3 ± 0,65 para 61,7 ± 1,46 um aumento na porcentagem atômica de oxigênio de 22,6 ± 0,66 para 31,1 ± 1,15. Estas alterações mostram que o polímero foi fixado com sucesso sobre a superfície. Além disso, há um deslocamento na curva ajustada do espectro de alta resolução

de C 1s, com redução do pico em 285,0 eV e aumento do pico em 286,5 eV, indicando uma diminuição das ligações C-C; C-H, presentes em grande quantidade na dopamina e no PEGb, com aumento simultâneo das ligações C-O; C-N, que estão presentes em grande número nos anéis glicosídicos que formam a quitosana.

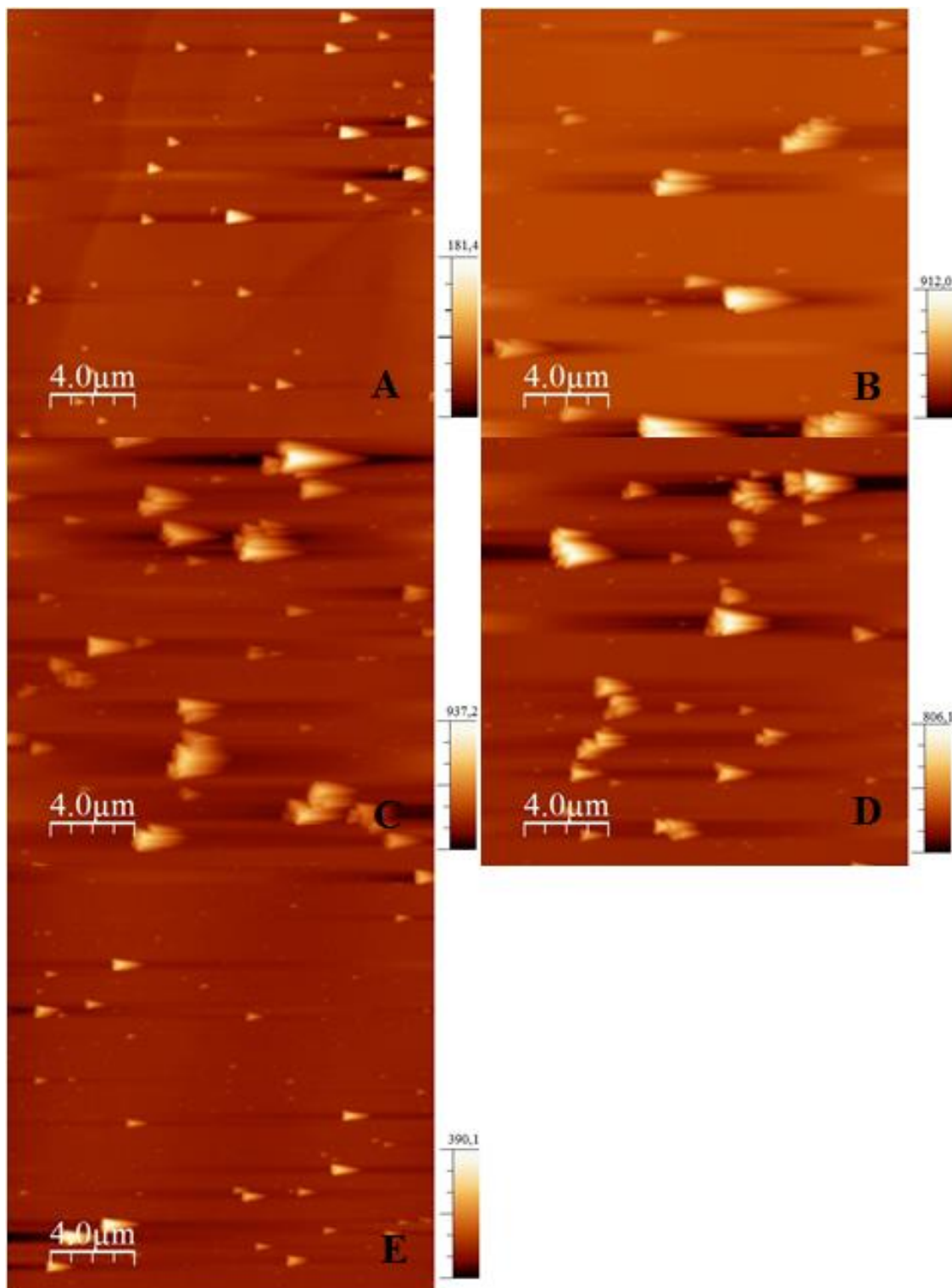
Entre as quatro estruturas usadas no *grafting* (dopamina, PEGb, quitosana natural e quitosana sulfonatada), a quitosana sulfonatada é a que mais se diferencia das outras devido a presença do grupo sulfonato em sua estrutura. Esta diferença facilita a visualização de mudanças na composição química da superfície. O surgimento de um sinal em 168 eV no espectro de pesquisa é atribuído ao sinal S2p. A composição química da superfície após o *grafting* da quitosana sulfonatada mostra uma variação nas concentrações de carbono e oxigênio quando comparada com a composição química da superfície modificada com PEGb, porém estas variações são mais sutis do que aquelas da quitosana natural. Contudo, tem-se a contribuição do enxofre na composição química, apresentando um percentual de $0,9 \pm 0,06$.

4.4.2 Microscopia de Força Atômica

A morfologia de superfície do aço inoxidável eletropolido, do aço após o recobrimento com dopamina, da amostra após o *grafting* de PEGb e com os polímeros são mostradas na Figura 50. A rugosidade RMS para cada amostra é apresentada na Tabela 6.

O processo de eletropolimento produziu uma superfície suavemente polida e hidrofílica onde é possível observar os limites de grãos (Figura 50A). A altura máxima observada na superfície de aço inoxidável eletropolida foi de 181,4 nm e a altura média foi de 46,6 nm. A rugosidade RMS para esta superfície foi de 15,17 nm. Após a deposição e polimerização da dopamina sobre a superfície, pode-se observar um aumento na altura máxima para 912,0 nm e altura média de 304,4 nm. Este aumento na altura pode estar relacionado com a forma através da qual a dopamina se autopolimeriza, formando uma rede polimérica complexa com grupos catecóis livre, o que por sua vez forma nódulos densos por toda a superfície de dopamina (FAURE *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2014). O aumento da rugosidade RMS para 56,51 nm evidencia a ligação da dopamina com a superfície metálica. Não é mais possível perceber os contornos de grão. Quando é feito o *grafting* do PEGb, a altura máxima sobe para 937,2 nm porém a altura média cai para 204,5 nm. A rugosidade RMS sobe ainda mais atingindo 70,34 nm, a maior observada durante o experimento.

Figura 50 - Morfologia das superfícies após eletropolimento, recobrimento com dopamina, grafting com PEGb e quitosana natural e sulfonatada



Elaborada pelo autor. A – aço inoxidável; B – aço inoxidável recoberto com dopamina; C – aço inoxidável recoberto com dopamina e *grafting* de PEGb; D – aço inoxidável recoberto com dopamina e *grafting* de PEGb e quitosana natural; E – aço inoxidável recoberto com dopamina e *grafting* de PEGb e quitosana sulfonatada.

Tabela 6 – Rugosidade RMS das amostras de aço inoxidável antes e após reação com dopamina, PEGb e quitosana natural e sulfonatada

Amostra	Rugosidade RMS	Desvio padrão
SS	15,17	7,81
SS-Dopa	56,51	5,74
SS-Dopa-PEGb	70,34	7,37
SS-Dopa-PEGb-Chi	65,02	4,15
SS-Dopa-PEGb-SChi	18,41	3,65

Fonte: Elaborada pelo autor. SS – aço inoxidável; SS-Dopa – aço inoxidável recoberto com dopamina; SS-Dopa-PEGb – aço inoxidável recoberto com dopamina e grafting de PEGb; SS-Dopa-PEGb-Chi – aço inoxidável recoberto com dopamina e grafting de PEGb e quitosana natural; SS-Dopa-PEGb-SChi – aço inoxidável recoberto com dopamina e grafting de PEGb e quitosana sulfonatada.

O grafting da quitosana natural ocasiona uma redução na altura máxima para 806,1 nm e da altura média para 187,3 nm. A rugosidade RMS após a formação da camada de quitosana foi de 65,02. Já para a quitosana sulfonatada, a altura máxima encontrada foi de 390,1 nm, menos da metade da altura máxima observadas nas superfícies de dopamina, PEGb e quitosana natural, e altura média de 81,1 nm, bem inferior às alturas médias das três superfícies anteriores. Esta diferença pode ser resultante de conformação das cadeias de quitosana para se acomodar sobre a superfície (MARTIN *et al.*, 2008). A rugosidade RMS para a quitosana sulfonatada foi de 18,41. É importante ressaltar as diferenças morfológicas quando são comparadas as superfícies de filmes e as superfícies após *grafting*. Enquanto a quitosana natural forma um filme menos rugoso do que a quitosana sulfonatada, o mesmo padrão não é observado quando os polímeros são fixados pelo *grafting*. Isto talvez ocorra pela mobilidade que o polímero tem em solução, podendo se arranjar de forma a diminuir a repulsão dos grupos sulfonatos presente na estrutura. Esta repulsão é apontada como responsável pelo aumento da rugosidade em filmes de quitosana sulfonatada (LIMA *et al.*, 2013).

As alterações de rugosidade estão de acordo com o apresentado pela literatura. Yuan *et al.* (2013) observaram um aumento na rugosidade da superfície metálica após o *grafting* de quitosana natural quando comparada com a superfície sem tratamento. Saidin *et al.* (2013) mostram em seu estudo que sucessivas modificações na superfície de uma amostra de aço inoxidável trazem variações na rugosidade dessas superfícies.

4.4.3 Ângulo de contato

Foram realizadas medidas de ângulo de contato da superfície de aço inoxidável logo após o eletropolimento, após a formação da camada de dopamina, após utilização do PEGb e após o *grafting* dos polímeros. Os valores médios obtidos em cada uma destas etapas estão na Tabela 7.

Tabela 7 - Ângulo de contato das amostras de aço inoxidável antes e após reação com dopamina, PEGb e quitosana natural e sulfonatada

Amostra	Ângulo de contato	Desvio Padrão
SS	24,6	2,26
SS-Dopa	66,2	1,12
SS-Dopa-PEGb	60,6	2,22
SS-Dopa-PEGb-Chi	67,2	0,67
SS-Dopa-PEGb-SChi	55,7	0,74

Fonte: Elaborada pelo autor. SS – aço inoxidável; SS-Dopa – aço inoxidável recoberto com dopamina; SS-Dopa-PEGb – aço inoxidável recoberto com dopamina e *grafting* de PEGb; SS-Dopa-PEGb-Chi – aço inoxidável recoberto com dopamina e *grafting* de PEGb e quitosana natural; SS-Dopa-PEGb-SChi – aço inoxidável recoberto com dopamina e *grafting* de PEGb e quitosana sulfonatada.

Através da análise de ângulo de contato verifica-se um aumento da hidrofobicidade da amostra de aço inoxidável quando é realizado o recobrimento com dopamina. O eletropolimento utiliza uma solução eletrolítica para retirar a camada de passivação do aço inoxidável e criar uma camada rica em grupos hidroxil. Estes grupos são altamente polares, sendo responsáveis pelo baixo ângulo de contato (YUAN *et al.*, 2013). Ao ser formada a de dopamina sobre o substrato, evidencia-se a diminuição da hidrofobicidade, indicando a modificação da superfície. Esta redução da hidrofobicidade deve-se ao modo como o catecol presente na dopamina se liga à superfície metálica, ligando-se aos grupos hidroxil e deixando a superfície rica em $-NH_2$, que é menos polar, além de gerar saliências na superfície (SAIDIN *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2013; FAURE *et al.*, 2013). Pode-se observar um aumento na hidrofobicidade da superfície após o tratamento com o PEGb. Isto evidencia que houve alteração na superfície. O PEGb possui grupos carboxílicos nas duas extremidades e estes grupos são bastantes polares. Ao se fazer o *grafting* de PEGb sobre a superfície de

dopamina, aumenta-se a polaridade da superfície e, com isso, sua hidrofiliçidade. Du, Gao e Li (2013) estudaram o efeito do grau de *grafting* de polietileno glicol monometil éter sobre a hidrofiliçidade de superfícies de polissulfona. Os resultados obtidos mostram que o ângulo de contato diminui com o aumento do grau de *grafting*, chegando à metade do valor inicial quando a quantidade de PEG chega a 48g/100g de polissulfona.

O ângulo de contato da amostra após *grafting* com quitosana foi maior do que o obtido para a superfície modificada pelo PEGb e bastante próximo aos encontrados para a superfície recoberta por dopamina. Isto mostra uma diminuição na hidrofiliçidade em relação à superfície modificada pelo PEGb, voltando a um patamar próximo ao da superfície de dopamina, causado pela presença dos grupos amino da quitosana. A quitosana é uma polibase fraca, sendo seu grau de protonação dependente do pH e da força iônica (YUAN *et al.*, 2013). Nas condições de *grafting*, o pH fica em torno de 4,7. Neste pH supõe-se que a quitosana esteja fracamente protonada, o que está de acordo com o aumento do ângulo de contato.

O resultado obtido para a quitosana sulfonatada mostra um decréscimo do ângulo de contato em relação à superfície modificada com PEGb. Este decréscimo sugere um aumento da hidrofiliçidade gerado pela presença de grupos sulfonatos, inseridos na estrutura da quitosana durante o processo de sulfonação. Desta forma, fica evidente que o *grafting* de quitosana sulfonatada.

5 CONCLUSÕES

Os filmes de quitosana sulfonatada e blendas de quitosana/carragenana, em especial a blenda com 75% de carragenana, apresentaram redução na formação de depósitos de cálcio e baixa adesão plaquetária quando comparados com os filmes de quitosana natural.

Através dos resultados obtidos pode-se considerar que:

- a) O filme de quitosana apresenta a maior transparência entre os filmes estudados e é mais espesso que os filmes de carragenana e blendas. A modificação da quitosana produz um filme levemente amarelado, devido ao agente sulfatante utilizado, com uma espessura superior ao filme de quitosana natural, devido ao efeito repulsivo gerado entre os grupos sulfonato introduzidos na estrutura. Embora apresente boas qualidades reportadas na literatura, tais como antitumoral, antiviral e anticoagulante, filmes de carragenana podem se dissolver na presença do sangue devido a temperatura deste no ambiente fisiológico. Este efeito não ocorre quando a carragenana está formando um complexo polieletrólítico com outro polímero que lhe confira estabilidade térmica, como a quitosana no caso estudado. Nas blendas, é observado que a opacidade aumenta ao mesmo tempo que a espessura do filme diminui, conforme a concentração de carragenana se eleva na composição, devido a maior interação entre os grupos amina da quitosana e os grupos sulfato da carragenana;
- b) A adesão plaquetária mostrou que o aumento da concentração de carragenana nas blendas diminui o efeito trombogênico da quitosana. A modificação da quitosana resultou em uma superfície mais hemocompatível quando comparada com a quitosana natural. Embora tenham apresentado plaquetas aderidas à superfície, tanto a quitosana sulfonatada quanto as blendas não apresentaram a formação de trombos. Isto está relacionado à presença de grupos sulfatados que conferem a estes polímeros características similares às da heparina;
- c) A quitosana natural apresenta um perfil pró-calcificante bem mais acentuado quando comparada com a quitosana sulfonatada. Isto é devido à disponibilidade do grupo amino livre, na forma natural, que funciona como um sítio de nucleação para o cálcio. A presença de grupos sulfato e sulfonatos nas

estruturas de carragenana e quitosana sulfonatada, respectivamente, causam um efeito de dissolução dos núcleos de cálcio formados nos estágios iniciais do processo de calcificação. Desta forma, pode-se dizer que estes grupos conferem uma propriedade anticalcificante a estes compostos;

- d) O revestimento de aço inoxidável usando dopamina como matriz orgânica gera um recobrimento homogêneo com espessura suficiente para impedir a detecção de metal por uma sonda de XPS. A utilização de PEGb como agente de *crosslink* permite tanto o *grafting* de quitosana natural quanto de quitosana sulfonatada. O *grafting* de quitosana sulfonatada forma uma camada mais suave do que a formada pela quitosana natural, possivelmente ocasionada por um melhor arranjo entre as cadeias a fim de minimizar o efeito repulsivo gerado pelos grupos sulfonatos.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Para trabalhos futuros podemos sugerir:

- a) Realização de testes de viabilidade e proliferação celular visando uma aplicação para os filmes estudados, seja esta em contato com o sangue, seja como suporte de cicatrização;
- b) Avaliar a biocompatibilidade dos filmes através de implante subcutâneo;
- c) Estudar outras proporções de blenda para otimizar o efeito anticoagulante e anticalcificante;
- d) Estudar rotas alternativas para o processo de revestimento de superfícies;
- e) Realizar ensaios de coagulabilidade e calcificação nas matrizes metálicas revestidas.

REFERÊNCIAS

- AIMOLI, C. G. **Investigação da adequação de membranas de quitosana quimicamente modificadas para uso como biomaterial: estudo da calcificação *in vitro***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Campinas, **2007**.
- AIMOLI, C. G., BEPPU, M. M. Precipitation of calcium phosphate and calcium carbonate induced over chitosan membranes: A quick method to evaluate the influence of polymeric matrices in heterogeneous calcification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 53, p. 15 – 22, **2006**.
- AIMOLI, C. G.; TORRES, M. A.; BEPPU, M. M. Investigations into the early stages of “*in vitro*” calcification on chitosan films. *Materials Science and Engineering: C*. v. 26, p. 78 – 86, **2006**.
- AMIJI, M. M. Permeability and blood compatibility properties of chitosan-poly(ethylene oxide) blend membranes for hemodialysis. *Biomaterials*. v. 16, p. 593 – 599, **1995**.
- AMIJI, M. M. Platelet adhesion and activation on an amphoteric chitosan derivative bearing sulfonate groups. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 10, p. 263 – 271, **1998**.
- AMIJI, M. M. Synthesis of anionic poly(ethylene glycol) derivative for chitosan surface modification in blood-contacting applications, *Carbohydrate Polymers*. v. 32, p. 193 – 199, **1997**.
- ARENAZ, B. *et al.* Effects of periodate and chondroitin 4-sulfate on proteoglycan stabilization of ostrich pericardium. Inhibition of calcification in subcutaneous implants in rats. *Biomaterials*. v. 25, p. 3359 – 3368, **2004**.
- AZEVEDO, V. V. C. *et al.* Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2.3, p. 27 – 34, **2007**.
- BALAN, V., VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *European Polymer Journal*. v. 53, p. 171 – 188, **2014**.

- BASKAR, D.; BALU, R.; KUMAR, T. S. S. Mineralization of pristine chitosan film through biomimetic process. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 49, p. 385 – 389, **2011**.
- BAUER, S. *et al.* Engineering biocompatible implant surfaces - Part I: Materials and surfaces. *Progress in Material Science*, v. 58, p. 261 – 326, **2013**.
- BEPPU M. M. **Estudo da calcificação “in vitro” de quitosana**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, **1999**.
- BERGER, J.; *et al.* Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 35-52, 2004.
- BONDU, S. *et al.* Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. *Carbohydrate Polymers*, v. 81, p. 448 – 460, **2010**.
- BUSCH, R. *et al.* New stent surface materials: The impact of polymer-dependent interactions of human endothelial cells, smooth muscle cells, and platelets. *Acta Biomaterialia*. v. 10, p. 688 – 700, **2014**.
- CANTOS, M. Pirates & peg legs: An historical look at amputation and prosthetics. *Proceedings of the 14th Annual History of Medicine Days*. p. 16 – 20, **2005**.
- CARNEIRO, T. N. *et al.* BSA and Fibrinogen adsorption on chitosan/k-carrageenan polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Bioscience*. v. 13, p. 1072 – 1083, **2013**.
- CHANDA, J. Anticalcification treatment of pericardial prostheses. *Biomaterials*. v. 15, p. 465 – 469, **1994**.
- CHANDRA, J., KURIBAYASHI, R., ABE, T. Heparin coupling in inhibition of calcification of vascular bioprostheses. *Biomaterials*. v. 20, p. 1753 – 1757, **1999**.
- CHANDRA, J., KURIBAYASHI, R., ABE, T. Prevention of calcification in glutaraldehyde-treated porcine aortic and pulmonary valves. *The Annals of Thoracic Surgery*. v. 64, p. 1063 – 1066, **1997**.
- CHANDRAN, K. B. Blood interfacing implants. *in* WONG, J. Y., BRONZINO, J. D. **Biomaterials**. 1st Edition. Boca Raton: CRC Press, 2007, 278p.

CHEN, N. X. *et al.* Adipocyte induced arterial calcification is prevented with sodium thiosulfate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 449, p; 151 – 156, **2014**.

CHUANG, W. Y. *et al.* Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast *in vitro*. *Biomaterials*. v. 20, p. 1479 – 1487, **1999**.

CIRILLO, A. *et al.* An artificial skin based on optoelectronic technology. *Sensors and Actuators A: Physical*, v. 212, p. 110 – 122, **2014**.

CROISIER, F., JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, p. 780 – 792, **2013**.

CZERNUSZKA, J. T.. Biomaterials under the microscope. *Materials World*, v. 4, p. 452 – 453, **1996**.

DASH, M. *et al.* Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981 – 1014, **2011**.

DEE, K. C., PULEO, D. A., BIZIOS, R. **An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions**. 1st Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002, 248p.

DON, T. M. *et al.* Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. *Carbohydrate Polymers*. v. 63, p. 331 – 339, **2006**.

DU, X. *et al.* Label-free dendrimer-like silica nanohybrids for traceable and controlled gene delivery. *Biomaterials*, v. 35, p. 5580 – 5590, **2014**.

DUCHEYNE, P. *et al.* **Comprehensive Biomaterials**. 1st Edition. Amsterdam: Elsevier Ltd, 2011, 3672p.

EBERLE, V. A. *et al.* Floating gastroretentive drug delivery systems: Comparison of experimental and simulated dissolution profiles and floatation behavior. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, p. 34 – 43, **2014**.

ENOCH, J. M. History is the light on the path to (the) future: the Burnt City, and the first known artificial eye. *Hindsight*. v. 38, p. 58 – 67, **2007**.

EVEN, M. P. *et al.* In vivo investigation of twin-screw extruded lipid implants for vaccine delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 87, p. 338 – 346, **2014**.

- FARAHNAKY, A. *et al.* Using power ultrasound for cold gelation of kappa-carrageenan in presence of sodium ions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 20, p. 173 – 181, **2013**.
- FARHATNIA, Y. *et al.* Evolution of covered stents in the contemporary era: clinical application, materials and manufacturing strategies using nanotechnology. *Biotechnology Advances*. v. 31, p. 524 – 542, **2013**.
- FAURE, E. *et al.* Catechols as versatile platforms in polymer chemistry. *Progress in Polymer Science*. v. 38, p. 236 – 270, **2013**.
- FURLAN, L.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Adsorption of calcium ions by graft copolymer of acrylic acid on biopolymer chitin. *Polymer*. v. 37, p. 843 – 846, **1996**.
- GALLYAMOV, M. O. *et al.* Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves. *Materials Science and Engineering C*. v. 37, p. 127 – 140, **2014**.
- GAMZAZADE, A. *et al.* Structural features of sulfated chitosans. *Carbohydrate Polymers*, v. 34, p. 113 – 116, **1997**.
- GE, B. *et al.* Preparation of chitosan–dopamine–multiwalled carbon nanotubes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 137, p. 547 – 554, **2009**.
- GORBET, M. B., SEFTON, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. v. 25, p. 5681 – 5703, **2004**.
- HAÏDOPOULOS, M. *et al.* Development of an optimized electrochemical process for subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications. *Journal of Material Science: Mater Med*. v. 17, p. 647 – 657, **2006**.
- HANADA, K. *et al.* Fabrication of Mg alloy tubes for biodegradable stent application. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, p. 4746 – 4750, **2014**.
- HASAN, A. *et al.* Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *Journal of Biomechanics*, v. 47, p. 1949 – 1963, **2014**.
- HIRANO, S. *et al.* Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulant factors. *Carbohydrate Research*, v. 137, p. 205 – 215, **1985**.

HOLVOET, S. *et al.* Toward high-performance coatings for biomedical devices: study on plasma-deposited fluorocarbon films and ageing in PBS. *Materials*, v. 3, p. 1515 – 1532, **2010**.

HORCAS, I. *et al.* WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*, v. 78, p. 013705-1 – 013705-8, **2007**.

HOVEN, V. P. *et al.* Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydrate Polymers*. v. 68, p. 44 – 53, **2007**.

HU, X. *et al.* An in vitro assessment of titanium functionalized with polysaccharides conjugated with vascular endothelial growth factor for enhanced osseointegration and inhibition of bacterial adhesion. *Biomaterials*, v. 31, p. 8854 – 8863, **2010**.

HUGERTH, A.; LELHAM, N. C.; SUNDELOF, L. The effect of charge density and conformation on the polyelectrolyte complex formation between carrageenan and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 34, p.149-156, 1997.

IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans - Re-Evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. V. 71, p. 433 – 451, **1999**.

JAIN, S. *et al.* Nanotechnology: An emerging area in the field of dentistry. *Journal of Dental Sciences*, article in press, **2013**.

JAYAKUMAR R *et al.* Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 40, p. 175 – 181, **2007**.

JE, J. Y., PARK, P. J. KIM, S. K. Prolyl endopeptidase inhibitory activity of chitosan sulfates with different degree of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 553 – 556, **2005**.

JIN, W. *et al.* Grafting of HEMA onto dopamine coated stainless steel by ^{60}Co - γ irradiation method. *Radiation Physics and Chemistry*. v. 105, p. 57 – 62, **2014**.

JURD, K. M. *et al.* Anticoagulant properties of sulphated polysaccharides and a proteoglycan from *Codium fragile* ssp. *atlanticum*. *Journal of Applied Phycology*. v. 7, p. 339 – 345, **1995**.

- KARAGKIOZAKI, V. *et al.* Force atomic microscopy probing platelet activation behavior on titanium nitride nanocoatings for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. v. 5, p. 64 – 72, **2009**.
- KARAGKIOZAKI, V. *et al.* MFA study of the thrombogenicity of carbon-based coatings for cardiovascular applications. *Materials Science and Engineering: B*. v. 152, p. 16 – 21, **2008**.
- KASEMO, B., LAUSMAA, J. Surface properties and processes of the biomaterial-tissue interface. *Materials Science and Engineering C*, v. 1, p. 115 – 119, **1994**.
- KEUREN, J. F. W. *et al.* Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces. *Biomaterials*. v. 24, p. 1917 – 1924, **2003**.
- KINDNESS, G., LONG, W. F., WILLIAMSON, F. B. Anticoagulant effects of sulphated polysaccharides in normal and antithrombin III-deficient plasmas. *British Journal of Pharmacology*. v.69, p. 675 – 677, **1980**.
- KOHRI, M. *et al.* Size control of polydopamine nodules formed on polystyrene particles during dopamine polymerization with carboxylic acid-containing compounds for the fabrication of raspberry-like particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 449, p. 114 – 120, **2014**.
- KOKUBO T *et al.* Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Material Research*, v. 24, p. 331 – 343, **1990**.
- KONG, M. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, p. 51 – 63, **2010**.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1 – 27, **2000**.
- LABARRE, D. Improving blood-compatibility of polymeric surfaces. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. v. 15, p. 1 – 3, **2001**.
- LAÇIN, N. T. Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 67, p. 22 – 27, **2014**.
- LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T. Quitosana biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, v. 32, p. 672 – 678, **2009**.

- LAUTO, A. *et al.* Self-expandable chitosan stent: design and preparation. *Biomaterials*. v. 22, p. 1869 – 1874, **2001**.
- LEE, B. P. *et al.* Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. *Annual Review of Materials Research*, v. 41, p. 99 – 132, **2011**.
- LEE, E. J. *et al.* Membrane of hybrid chitosan-silica xerogel for guided bone regeneration. *Biomaterials*. v. 30, p. 743 – 750, **2009**.
- LEE, H. *et al.* Physical and bioactive properties of multi-layered PCL-silica composite scaffolds for bone tissue regeneration. *Chemical Engineering Journal*, v. 250, p. 399 – 408, **2014**.
- LEE, W. K. *et al.* Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO or heparin after glutaraldehyde fixation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. v. 58, p. 27 – 35, **2001**.
- LEWIS, F. *et al.* Study of the adhesion of thin plasma fluorocarbon coatings resisting plastic deformation for stent applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*. v. 41, p. 1 – 7, **2008**.
- LI, G. *et al.* The effect of coimmobilizing heparin and fibronectin on titanium on hemocompatibility and endothelialization. *Biomaterials*. v. 32, p. 4691 – 4703, **2011**.
- LIMA, P. H. L. *et al.* Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and κ -carrageenan films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 111, p. 719 – 725, **2013**.
- LIN, W. C., YU, D. G., YANG, M. C. Blood compatibility of novel poly(γ -glutamic acid)/polyvinyl alcohol hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 47, p. 43 – 49, **2006**.
- LIU, Z. *et al.* Interactions between solubilized polymer molecules and blood components. *Journal of Controlled Release*, v. 160 (1), p. 14–24, 2012.
- MA, Z., MAO, Z., GAO, C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 60, p. 137 – 157, **2007**.
- MARTIN, H. J. *et al.* An XPS study on the attachment of triethoxysilylbutyraldehyde to two titanium surfaces as a way to bond chitosan. *Applied Surface Science*. v. 254, p. 4599 – 4605, **2008**.

- MENG, S. *et al.* The effect of a layer-by-layer chitosan–heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of coronary stent system. *Biomaterials*. v. 30, p.2276 – 2283, **2009**.
- MORADI, O.; MODARRESS, H.; NOROOZI, M. Experimental study of albumin and lysozyme adsorption onto acrylic acid (AA) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 271, p. 16-19, 2004.
- MORALES, J. G. *et al.* Subchondral chitosan/blood implant-guided bone plate resorption and woven bone repair is coupled to hyaline cartilage regeneration from microdrill holes in aged rabbit knees. *Osteoarthritis and Cartilage*. v. 22, p. 323 – 333, **2014**.
- MUZZARELLI, R. A. A. *et al.* Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*. v. 15, p. 1075 – 1081, **1994**.
- MUZZARELLI, R. A. A. Modified chitosans carrying sulfonic acid groups. *Carbohydrate Polymers*. v. 19, p. 231 – 236, **1992**.
- NAM, J. A. *et al.* Successful stabilization of functionalized hybrid graphene for high-performance antimicrobial activity. *Acta Biomaterialia*, v. 9, p. 7996 – 8003, **2013**.
- NELKEN, N., SCHNEIDER, P. A., Advances in stent technology and drug-eluting stents. *Surg Clin N Am*. v. 84, p. 1203 – 1236, **2004**.
- NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Fifth Edition, W. H. Freeman, 2008, 1100p.
- NISHIMURA, S. I. *et al.* Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: Specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates. *Carbohydrate Research*, v. 306, p. 427 – 433, **1998**.
- NOGUEIRA, G. M. *et al.* Bovine pericardium coated with biopolymeric films as an alternative to prevent calcification: *In vitro* calcification and cytotoxicity results. *Materials Science and Engineering C*. v. 30, p. 575 – 582, **2010**.
- OGURA, Y. *et al.* Optical performance of hydrophobic acrylic intraocular lenses with surface light scattering. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 40, p. 104 – 113, **2014**.

- OKAMOTO, Y. *et al.* Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*. v. 53, p. 337 – 342, **2003**.
- OPOKU, G., QIU, X., DOCTOR, V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of *kappa* carrageenan. *Carbohydrate Polymers*. v. 65, p. 134 – 138, **2006**.
- ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos & Aplicações**, Guanabara Koogan, 2012, 552p.
- PARK, K. D. *et al.* Novel anti-calcification treatment of biological tissues by grafting of sulphonated poly(ethylene oxide). *Biomaterials*, v. 18, p. 47 – 51, **1997**.
- PARK, S. N., JO, N. R., JEON, S. H. Chitosan-coated liposomes for enhanced skin permeation of resveratrol. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 20, p. 1481 – 1485, **2014**.
- PARK, S. Y. *et al.* Biopolymer composite films based on k-carrageenan and chitosan. *Materials Research Bulletin*, v. 36, p. 511-519, 2001.
- PATHAK, Y. V. *et al.* Prevention of calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium through controlled release polymeric implants: studies of Fe³⁺, Al³⁺, protamine sulphate and levamisole. *Biomaterials*. v. 11, p. 718 – 723, **1990**.
- PAVALOIU, R. D. *et al.* Composite films of poly(vinyl alcohol)–chitosan–bacterial cellulose for drug controlled release. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 68, p. 117 – 124, **2014**.
- PERIAYAH, M. H. *et al.* *In vitro* capacity of different grades of chitosan derivatives to induce platelet adhesion and aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 52, p. 244 – 249, **2013**.
- PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hydrocolloids**. 2nd Edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. 2009. 901p.
- PICULELL, L. *et al.* Organisation and association of k-carrageenan helices under different salt conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 21, p. 141 – 153, **1997**.
- PINHAS, M. D. *et al.* Modified chitosan: A step toward improving the properties of antibacterial food packages. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 1, p. 160 – 169, **2014**.

PINHEIRO, A. C. *et al.* Interactions between κ -carrageenan and chitosan in nanolayered coatings — Structural and transport properties. *Carbohydrate Polymers*. v. 87, p. 1081 – 1090, **2012**.

POLAK, R. *et al.* Inhibition of calcification of bovine pericardium after treatment with biopolymers, E-beam irradiation and in vitro endothelization. *Materials Science and Engineering C*. v. 37, p. 85 – 90, **2013**.

PRAJAPATI, V. D. *et al.* Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 105, p. 97 – 112, **2014**.

RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. 2nd Edition. Oxford: Elsevier Academic Press, 2004, 864p.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603 – 632, **2006**.

RODRIGUES, S.; COSTA, A. M. R.; GRENHA, A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effects of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 282-289, 2012.

RUAN, R. *et al.* Transdermal delivery of human epidermal growth factor facilitated by a peptide chaperon. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 62, p. 405 – 409, **2013**.

SAIDIN, S. *et al.* Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilisation on metallic biomaterials surface. *Materials Science and Engineering: C*. v. 33, p. 4715 – 4724, **2013**.

SAKIYAMA, T.; *et al.* Preparation of a polyelectrolyte complex gel of chitosan and κ -carrageenan and its pH sensitive swelling. *J.Appl. Polym. Sci.*, v. 50, p. 2021-2025, 1993.

SCHOEN, F. J., LEVY, R. J. Pathological calcification of biomaterials. *in* RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. 2nd Edition. Oxford: Elsevier Academic Press, 2004, 864p.

SETH, A. *et al.* Performance of magnetic chitosan–alginate core–shell beads for increasing the bioavailability of a low permeable drug. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, article in press, **2014**.

- SHAIKH, M. *et al.* Non-vascular drug eluting stents as localized controlled drug delivery platform - Preclinical and clinical experience. *Journal of Controlled Release*. v. 172, p. 105 – 117, **2013**.
- SHANMUGAM, M., MODY, K. H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science*. v. 79, p. 1672 – 1683, **2000**.
- SHANTHI, C., RAO, K. P. Chitosan modified poly(glycidyl methacrylate–butyl acrylate) copolymer grafted bovine pericardial tissue—anticalcification properties. *Carbohydrate Polymers*. v. 44, p. 123 – 131, **2001**.
- SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science*, v. 36 (6), p. 1254-1276, 2011.
- SOYSAL, S. A., KOFINAS, P., LO, Y. M. Effect of complexation conditions on xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 202-209, 2009.
- SURESH, S., SRIVASTAVA, V. C., MISHRA, M. Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, v. 3, p. 32 – 51, **2012**.
- TAPIA, C. *et al.* Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan-alginate and chitosan-carrageenan as prolonged diltiazem chloride release systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 65-75, 2004.
- THOMAS, D., THOMAS, S. Chemical modification of chitosan and its biomedical application *in* DUFRESNE, A., THOMAS, S. POTHAN, L. A. **Biopolymer Nanocomposites: Processing, Properties, and Applications**. First Edition, p. 33 – 51, John Wiley & Sons, 2013.
- TOUZIN, M. *et al.* Study on the stability of plasma-polymerized fluorocarbon ultra-thin coatings on stainless steel in water. *Surface & Coatings Technology*. v. 202, p. 4884 – 4891, **2008**.
- VIEBKE, C., PICULELL, L., NILSSON, S. On the mechanism of gelation of helix-forming biopolymers. *Macromolecules*. v. 27, p. 4160 – 4166, **1994**.

- VYAVAHARE, N. R. *et al.* Current progress in anticalcification for bioprosthetic and polymeric heart valves. *Cardiovascular Pathology*. v. 6, p. 219 – 229, **1997**.
- WESKA, R. F. **Estudo da esterilização e da calcificação *in vitro* de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, **2009**.
- YAMADA, Y. *et al.* A nanocarrier system for the delivery of nucleic acids targeted to a pancreatic beta cell line. *Biomaterials*, v. 35, p. 6430 – 6438, **2014**.
- YAMANO, S. *et al.* The effect of a bioactive collagen membrane releasing PDGF or GDF-5 on bone regeneration. *Biomaterials*, v. 35, p. 2446 – 2453, **2014**.
- YE, S. H. *et al.* Simple surface modification of a titanium alloy with silanated zwitterionic phosphorylcholine or sulfobetaine modifiers to reduce thrombogenicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 79, p. 357 – 364, **2010**.
- YI, H. *et al.* Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 2881 – 2894, **2005**.
- YUAN, H. *et al.* Experimental study of natural hydroxyapatite/chitosan composite on reconstructing bone defects. *Journal of Nanjing Medical University*. v. 22, p. 372 – 375, **2008**.
- YUAN, S. *et al.* Enhancing antibacterial activity of surface-grafted chitosan with immobilized lysozyme on bioinspired stainless steel substrates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 106, p. 11 – 21, **2013**.
- ZEMMOURI, H. *et al.* Chitosan Application for Treatment of Beni-Amrane's Water Dam. *Energy Procedia*, v. 36, p. 558 – 564, **2013**.
- ZHANG, S. *et al.* Effect of ultraviolet irradiation combined with chitosan coating on preservation of jujube under ambient temperature. *LWT – Food Science and Technology*, v. 57, p. 749 – 754, **2014**.
- ZHAO, Q.; *et al.* Polyelectrolyte complex membranes for pervaporation, nanofiltration and fuel cell applications. *Journal of Membrane Science*, v. 397, p. 19-45, 2011.
- ZHOU, X. *et al.* A facile preparation of poly(ethylene oxide)-modified medical polyurethane to improve hemocompatibility. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 441, p. 34 – 42, **2014**.

ZHU, A., CHEN, T. Blood compatibility of surface-engineered poly(ethylene terephthalate) via o-carboxymethylchitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 50, p. 120 – 125, **2006**.