



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

**ANAFTÁLIA FELISMINO MORAES**

**QUITOSANA SULFATADA: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA  
HEMOCOMPATIBILIDADE**

**FORTALEZA**

**2016**

ANAFTÁLIA FELISMINO MORAES

QUITOSANA SULFATADA: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA  
HEMOCOMPATIBILIDADE

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M818q Moraes, Anaftália Felismino.  
Quitosana sulfatada: caracterização e estudo da hemocompatibilidade / Anaftália Felismino Moraes. –  
2016.  
93 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

1. Quitosana sulfatada. 2. Hemocompatibilidade. 3. Atividade antitrombogênica. I. Título.

CDD 660

---

QUITOSANA SULFATADA: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA  
HEMOCOMPATIBILIDADE

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

Aprovada em: 24.03.2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Morsyleide de Freitas Rosa  
EMBRAPA Agroindústria Tropical

À Deus, o Mestre dos mestres.

## AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento a Deus, que me sustentou com Sua Destra quando minhas forças esvaíram-se, que restaurou minhas forças sempre que precisei para continuar buscando meus objetivos e sonhos, mesmo quando muitas vezes pareciam impossíveis de serem realizados.

Ao Prof. Rodrigo Vieira, pela orientação e conhecimentos transmitidos ao longo do curso de mestrado que foram essenciais para minha formação profissional, pelo incentivo, por não medir esforços para que este trabalho se concretizasse e por acreditar em mim na realização desta pesquisa.

Ao Clayton Campelo, por me fornecer um grande suporte no início da pesquisa com seu conhecimento e paciência, assim como pelas trocas de ideias no decorrer deste tempo que também foram de grande importância. Agradeço ainda pela amizade que ficou.

Minha grande gratidão à Janelene, técnica de laboratório, pelas inúmeras ajudas concedidas a mim no laboratório Núcleo de Pesquisa em Lubrificantes-NPL, e pelo apoio nesses dois anos de mestrado.

À Embrapa, na pessoa da Dra. Morsyleide, por abrir as portas e conceder a utilização de equipamentos essenciais para o desenvolvimento da pesquisa e realização de análises, assim como a todas as profissionais que ajudaram com as análises feitas: À Ana Cassales, Tigressa e Lorena.

À professora Kalyne, pelos conhecimentos transmitidos, por abrir as portas do seu laboratório para a realização de ensaios biológicos que foram de grande importância para esta pesquisa, juntamente com a técnica de laboratório: Lyara. Muito obrigada.

À Universidade de Málaga, através do Juan, pela análise elementar e FTIR realizados.

Aos técnicos da central analítica da UFC, pelas caracterizações de MEV.

À doutoranda Niedja, pelas realizações de algumas caracterizações feitas em Recife que muito contribuíram para este trabalho, e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Fernando, pela realização da análise Cromatografia de Permeação em Gel.

Aos doutorandos Ítalo e João Paulo, pelas preciosas ajudas na utilização do liofilizador quando precisei e por todas as outras ajudas desde as mais simples que foram de igual importância. Agradeço ainda pela amizade construída ao longo deste tempo.

À doutoranda Camila, pelas discussões sobre determinados assuntos, pelas ajudas concedidas e pela amizade que ficou.

À Dra. Arcelina, meu grande agradecimento pelas preciosas discussões sobre as análises de RMN, pela dedicação na análise de viscosimetria e por todas as outras grandes e importantes ajudas a mim concedidas. Agradeço também pela amizade que ficou.

À Dra. Fábiana, pelas importantes discussões de ensaios de hemocompatibilidade e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos bolsistas de iniciação científica Lidianie Souto e Nonato Fernandes, por todas as ajudas oferecidas na pesquisa no decorrer deste período. À Luana Dias, pelas preciosas ajudas com o inglês quando precisei e pela amizade que ficou apesar do pouco tempo de contato que tivemos.

À Rosiene, Erika, Larissa, Leandro e Rosana, que foram companheiros de caminhada e que contribuíram cada um de uma forma no desenvolvimento desta pesquisa.

À toda equipe da administração do NPL, pelas ajudas concedidas na compra de materiais quando necessário.

Agradeço a todos os demais colegas que compõem o Grupo de Pesquisas em Separação por Adsorção-GPSA, por serem sempre prestativos no auxílio do uso de equipamentos e reagentes.

Aos meus pais, Lourdes e Valber, pelo apoio e paciência com minhas ausências devido à dedicação à pesquisa e por todo o incentivo que me concederam.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Obrigada!

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.”

(Jean Cocteau)

## RESUMO

Dispositivos médicos de contato com o sangue podem induzir diversos efeitos biológicos no paciente, tais como a formação de trombos e ativação do sistema complemento. Uma estratégia para evitar esses efeitos adversos é o revestimento dessas superfícies com polímeros hemocompatíveis e não imunogênicos. Com isso, este estudo objetivou desenvolver filmes de quitosana sulfatada com propriedades hemocompatíveis para aplicações biomédicas. Filmes de quitosana natural (QN) e sulfatada (QS) foram caracterizados por Análise Elementar, espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR), Ressonância Magnética Nuclear de Próton e Carbono ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN), Viscosimetria, Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), Microscopia Eletrônica de Varredura com Energia Dispersiva de raios-X (MEV/EDX), Difração de Raio-X (DRX) e Análise termogravimétrica (TGA). Para estudar a hemocompatibilidade dos filmes realizou-se o ensaio de adsorção de proteínas globulares (BSA e Fibrinogênio), adesão plaquetária, atividade anticoagulante e citotoxicidade por LDH (enzima lactato desidrogenase). Na análise elementar pode-se verificar a presença de enxofre nos filmes sulfatados. Através do FTIR-ATR pode-se confirmar a modificação com o surgimento de duas novas bandas em  $1206\text{ cm}^{-1}$  (S=O) e  $794\text{ cm}^{-1}$  (C-S-O), referentes a grupos sulfatos. O filme QS6 apresentou maior grau de sulfatação (GS=1.37) e foi selecionado para as análises subsequentes. A análise de RMN $^1\text{H}$  mostrou um grau de desacetilação (GD) de 77% e 58%, respectivamente para a QN e QS. Através da análise de RMN $^{13}\text{C}$ , observou-se uma quitosana parcialmente 2,N-3,6,O-sulfatada. A massa molecular (MM) das amostras foi 78.093 Da e 5.050 Da, para a QN e QS, respectivamente, determinadas por viscosimetria. Superfícies homogêneas e lisas foram observadas através das imagens do MEV/EDX. O difratograma mostrou picos semicristalinos para a QN e estrutura amorfa para a QS. Através da TGA, observou-se que a quitosana sulfatada teve uma redução da sua resistência térmica, comparada com a QN. Os resultados da hemocompatibilidade mostraram que a modificação química da quitosana foi capaz de reduzir a adsorção de BSA (36.8%) e fibrinogênio (20%) e principalmente a adesão plaquetária (93.7%) em relação à QN, observada nas imagens de MEV e microscopia óptica. Apenas a QS mostrou atividade anticoagulante na fase intrínseca (72.15s, 200 $\mu\text{g/mL}$ ) em relação a QN (26.57s, 200 $\mu\text{g/mL}$ ). Foi observado ainda a atoxicidade dos polímeros. Estes resultados indicaram que a QS apresentou características promissoras de hemocompatibilidade para dispositivos médicos de contato com o sangue.

**Palavras-chave:** Quitosana sulfatada, hemocompatibilidade, atividade antitrombogênica.

## ABSTRACT

Medical devices designed to be used in contact with blood can induce several biological effects in the patient, such as the thrombus formation and complement system activation. An strategy to avoid these adverse effects is the coating of the surfaces with hemocompatible and not immunogenic polymers. This study aimed to develop sulfated chitosan films with hemocompatible characteristics for biomedical applications. Natural (NC) and sulfated chitosan (SC) films were characterized by Elemental Analysis, Infrared spectroscopy (FTIR-ATR), Proton and Carbon Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -NMR), Viscometry, Gel Permeation Chromatography (GPC), Scanning Electron Microscopy with EDX (SEM/EDX), X-ray diffraction (XRD) and Thermogravimetric analysis (TGA). The films hemocompatibility was analyzed studying the globular protein adsorption (BSA and fibrinogen), platelet adhesion, anticoagulant activity and cytotoxicity by LDH (lactate dehydrogenase). The elemental analysis demonstrated the sulfur presence in the sulfated films. The FTIR-ATR results confirmed the sulfation reaction, with the appearance of two new bands at  $1206\text{cm}^{-1}$  (S = O) and  $794\text{cm}^{-1}$  (C-S-O), assigned at sulfur group. The film QS6 with the highest sulfation degree (GS = 1.37) was selected to perform the following analyzes. The  $^1\text{H}$ NMR analysis showed deacetylation degree (DD) of 77% and 58% for the natural and sulfated chitosan, respectively.  $^{13}\text{C}$ NMR analysis showed that chitosan was partially sulfated, obtaining 2, N-3,6,O-sulfated chitosan. The mass molecular (MM) of QN and QS were 78.093 Da and 5.050 Da, respectively, determined by viscometry. Homogeneous and smooth surfaces were observed by SEM/EDX images. The XRD showed semi-crystalline peaks for natural chitosan, while an amorphous structure was observed for sulfated chitosan. The TGA analyses revealed a reduction in the thermal stability to sulfated chitosan compared to natural chitosan. The hemocompatibility results showed that chemical modification on chitosan chain was able to decrease the BSA (36.8%) and fibrinogen (20%) adsorption and mainly the platelet adhesion (93.7%) in relation to QN, either by SEM and optical microscopy images. Only the QS presented anticoagulant activity in the intrinsic pathway (72.15s,  $200\mu\text{g/mL}$ ) compared with the QN (26.57s,  $200\mu\text{g/mL}$ ). It was also observed atoxicity of the studied polymers. These results indicate that sulfated chitosan films have hemocompatibility properties promising to blood-materials devices.

**Keywords:** Sulfated chitosan, hemocompatibility, Antithrombogenic activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Implante de <i>stent</i> .....	19
Figura 2	– Estrura da quitina e quitosana.....	21
Figura 3	– Estruturas da quitosana sulfatada e heparina.....	23
Figura 4	– Classificação dos polissacarídeos sulfatados.....	26
Figura 5	– Estrutura da heparina.....	28
Figura 6	– Dinâmica de adsorção de proteínas em superfícies revestidas com polímeros.....	30
Figura 7	– Mecanismo de adsorção de proteínas em biomateriais.....	31
Figura 8	– Processo de obtenção do filme de quitosana natural.....	36
Figura 9	– Processo de sulfatação da quitosana e obtenção do filme.....	38
Figura 10	– FTIR-ATR dos filmes de quitosana natural (QN), quitosana sulfatada com 2mL (QS2), 4mL (QS4), 6mL (QS6) e 8 mL (QS8) de ácido clorossulfônico.....	51
Figura 11	– Espectros de RMN <sup>1</sup> H da QN (A) e QS6 (B).....	53
Figura 12	– Espectros de RMN <sup>13</sup> C da QN (A) e QS6 (B).....	56
Figura 13	– Aspecto visual dos filmes de QN (A) e QS6 (B).....	59
Figura 14	– Micrografias horizontal e transversal por MEV dos filmes de QN (A), QS6 (B) e QS6 reticulada com glutaraldeído 2,5% (C) com aumento de 1000X, barra de 50µm.....	61
Figura 15	– EDX do filme de QN (A) e distribuição dos elementos (B).....	62
Figura 16	– EDX do filme de QS6 (A) e distribuição dos elementos (B).....	63
Figura 17	– EDX do filme de QS6 reticulado com 2,5% de glutaraldeído (A) e distribuição dos elementos (B).....	64
Figura 18	– DRX com ângulo de difração 2θ de quitosana natural (a) e quitosana sulfatada (b).....	66
Figura 19	– Curvas termogravimétricas: A) TGA e B) DTG da quitosana natural (a) e quitosana sulfatada (b).....	67
Figura 20	– Imagens da microscopia óptica da adesão plaquetária em filme de QN (A) e QS6R (B), com aumento de 40X.....	72

Figura 21 – MEV de plaquetas aderidas nos filmes de QN (A) e QS6R (B).....	72
Figura 22 – Tempo de tromboplastina parcial ativada da QN e QS.....	75
Figura 23 – Tempo de protrombina da QN e QS.....	76
Figura 24 – Efeito da citotoxicidade da quitosana natural sobre neutrófilos humanos.....	77
Figura 25 – Efeito da citotoxicidade da quitosana sulfatada sobre neutrófilos humanos.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aplicações de polissacarídeos sulfatados na área biomédica e farmacológica.....	27
Tabela 2	Atividades do sistema complemento.....	35
Tabela 3	Análise elementar dos filmes de QN, QS2, QS4, QS6 e QS8. GS: Grau de substituição.....	49
Tabela 4	Deslocamentos químicos do $^{13}\text{C}$ para QN e QS6 em ppm.....	57
Tabela 5	Dados obtidos a partir das curvas termogravimétricas para QN e QS6.....	68

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Adsorção de BSA e Fibrinogênio em QN e QS6 reticulada com 2,5% de glutaraldeído.....	69
Gráfico 2	Número de plaquetas aderidas nos filmes de QN (A) e QS6R (B) calculadas a partir do MEV.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GD	Grau de desacetilação
GS	Grau de sulfatação
QN	Quitosana natural
QS	Quitosana sulfatada
QS2	Quitosana sulfatada com 2 mL de ácido clorossulfônico
QS4	Quitosana sulfatada com 4 mL de ácido clorossulfônico
QS6	Quitosana sulfatada com 6 mL de ácido clorossulfônico
QS8	Quitosana sulfatada com 8 mL de ácido clorossulfônico
QS6R	Quitosana sulfatada com 6 mL de ácido clorossulfônico e reticulada com glutaraldeído 2.5%.
MM	Massa Molecular
BSA	<i>Bovine Serumalbumin</i>
FTIR-ATR	Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier com modo de Reflectância Total Atenuada
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
MEV/EDX	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrometria de energia dispersiva de raios-X
DRX	Difração de Raio-X
TGA	Análise Termogravimétrica
LDH	Enzima lactato desidrogenase
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
GlicN	Unidade N-Glicosamina
GlicNAc	Unidade N-acetil-Glicosamina
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Hidreto
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
ADP	Adenosina Difosfato
DMF	N.N-Dimetilformamida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Biomateriais.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1</b>	<i>Stents.....</i>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Polímeros biomédicos.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Quitosana.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Modificação química da quitosana.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Polissacarídeos sulfatados.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.1</b>	<i>Heparina.....</i>	<b>27</b>
<b>2.6</b>	<b>Hemocompatibilidade.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.1</b>	<i>Adsorção de proteínas e adesão de plaquetária.....</i>	<b>30</b>
<b>2.6.2</b>	<i>Coagulação do sangue.....</i>	<b>32</b>
<b>2.6.3</b>	<i>Resposta do sistema complemento.....</i>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Procedimento para obtenção do filme de quitosana natural.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Procedimento para obtenção do filme de quitosana sulfatada.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>Caracterizações.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.1</b>	<i>Análise elementar.....</i>	<b>39</b>
<b>3.3.2</b>	<i>Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	<b>39</b>
<b>3.3.3</b>	<i>Determinação da Massa Molecular.....</i>	<b>40</b>
<b>3.3.4</b>	<i>Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier com modo de Reflectância Total Atenuada (FTIR/ATR).....</i>	<b>42</b>
<b>3.3.5</b>	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrometria de energia dispersiva de raios-X (MEV/EDX).....</i>	<b>43</b>
<b>3.3.6</b>	<i>Difração de Raio-X (DRX).....</i>	<b>43</b>
<b>3.3.7</b>	<i>Análise Termogravimétrica (TGA).....</i>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Estudos da hemocompatibilidade.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4.1</b>	<i>Adsorção de proteínas.....</i>	<b>44</b>
<b>3.4.2</b>	<i>Adesão plaquetária.....</i>	<b>44</b>

3.4.3	<i>Atividade anticoagulante</i> .....	46
3.4.4	<i>Citotoxicidade</i> .....	47
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
4.1	<b>Caracterizações</b> .....	48
4.1.1	<i>Análise elementar</i> .....	48
4.1.2	<i>Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier com modo de Reflectância Total Atenuada (FTIR/ATR)</i> .....	50
4.1.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i> .....	52
4.1.3.1	Determinação do grau de desacetilação (RMN <sup>1</sup> H).....	52
4.1.3.2	Determinação da posição de substituição (RMN <sup>13</sup> C).....	54
4.1.4	<i>Determinação da Massa Molecular</i> .....	57
4.1.5	<i>Aspecto visual dos dos filmes</i> .....	59
4.1.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrometria de energia dispersiva de raios-X (MEV/EDX)</i> .....	59
4.1.7	<i>Difração de Raio-X (DRX)</i> .....	65
4.1.8	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i> .....	66
4.2	<b>Estudo da hemocompatibilidade</b> .....	68
4.2.1	<i>Adsorção de proteínas</i> .....	68
4.2.2	<i>Adesão plaquetária</i> .....	71
4.2.3	<i>Atividade anticoagulante</i> .....	74
4.2.4	<i>Citotoxicidade</i> .....	76
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	78
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares vêm acometendo milhões de pessoas por ano e muitas vezes levando-as ao óbito. O tratamento empregado em doença vascular coronária, doenças em vasos sanguíneos e artérias, é a angioplastia, que baseia-se na implantação de *stents* metálicos para a desobstrução e suporte de vasos sanguíneos (WANG *et al.*, 2014). Cientistas de várias áreas vêm estudando estratégias para melhorar a biocompatibilidade destes dispositivos médicos, uma vez que ao longo do tempo de uso do implante, podem ocasionar falhas clínicas, como é o caso de reestenose e formação de trombos. Uma das estratégias para melhorar a hemocompatibilidade da superfície desses materiais é a modificação do material ou modificação da superfície de forma que apresentem propriedades hemocompatíveis (BALAN & VERESTIUC, 2014).

Quando uma superfície estranha entra em contato com o sangue, inicia-se uma série de reações biológicas, iniciando com a adsorção de proteínas do plasma do sangue. As proteínas são as principais responsáveis por desencadear a adesão de células, ativar a cascata de coagulação e o sistema complemento, com a consequente formação de trombos na superfície do material e inflamação (FREITAS, BARBOSA & MARTINS, 2010; JUNG *et al.*, 2013).

Nesse processo, as proteínas adesivas são as de principal interesse em estudo de biomateriais de contato com o sangue, dentre elas encontram-se o fibrinogênio, vitronectina, fibronectina e Fator de von Willebrand (RATNER *et al.*, 2013). O fibrinogênio apresenta-se como a principal proteína da coagulação do sangue devido a sua capacidade de aderir as plaquetas através dos receptores presentes na membrana de plaquetas (Glicoproteínas IIb/IIIa) e por sua capacidade de formar rede de fibrinas em que se agregam plaquetas e elementos do sangue causando a formação de trombos e tromboembolia (CHUNG *et al.*, 2014).

Estudos na área biomédica tem-se voltado para a quitosana devido apresentar propriedades favoráveis para biomateriais, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, atividade antimicrobiana, dentre outras (JAYAKUMAR *et al.*, 2007; BENABBOU *et al.*, 2009; CHANG & HUANG, 2012; MAHANTA *et al.*, 2015). Quitosana compreende um copolímero linear composto de unidades N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose ligados por uma ligação (1,4)- $\beta$ -glicosídica, obtida através da N-desacetilação parcial ou total da quitinana presença de um álcali (VAKILI

*et al.*, 2014). A quitina é um polímero natural encontrado principalmente na carapaça de crustáceos.

Fortaleza como uma cidade turística conhecida por suas belas praias, encontra-se como uma grande consumidora de produtos marinhos, tais como peixes e crustáceos. Existem ainda as indústrias pesqueiras da cidade que são responsáveis por exportação e importação destes produtos e seus derivados processados. Desta forma, tanto o comércio quanto as indústrias de produtos pesqueiros geram grande quantidade de resíduos, sendo que boa parte destes compreendem fontes de quitina presentes principalmente em crustáceos, que podem ser processadas para a extração de quitosana para seus mais diversos usos e, desta maneira, contribuir para o aproveitamento destes resíduos e reduzir impactos ambientais.

Embora esse polímero apresente propriedade trombogênica quando em contato com o sangue (WANG *et al.*, 2012), possui em sua cadeia grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) e hidroxilas (OH) altamente reativos, o que facilita sua modificação química para as mais diversas aplicações, sem alterar o seu esqueleto fundamental. Quanto a sua aplicação, vem sendo utilizada em diferentes formas, como filmes, géis, partículas, membranas ou suportes com aplicações em indústrias alimentícias, área biomédica e na agronomia (CROISIER & JÉRÔME, 2013; LIMA *et al.*, 2013; BALAN E VERESTIUC, 2014; CAMPELO *et al.*, 2016).

De acordo com a literatura, a introdução de grupos sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) na cadeia de quitosana reduz a sua trombogenicidade (SHELMA & SHARMA, 2011), uma vez que essa modificação a torna com carga superficial negativa, o que causa a repulsão eletrostática de proteínas do sangue carregadas negativamente. A quitosana sulfatada tem despertado o interesse científico devido ainda a sua estrutura ser muito similar a um anticoagulante natural do sangue, a heparina, demonstrando mecanismo biomolecular de atividade anticoagulante, antiviral e com baixa toxicidade, além de apresentar custos mais baixos do que a heparina (JAYAKUMAR *et al.*, 2007; CHANG & HUANG, 2012; LIMA *et al.*, 2013).

Com isso, uma estratégia para a redução de falhas de dispositivos médicos quando implantados em pacientes doentes seria o revestimento da superfície destes biomateriais com polímeros de hemocompatibilidade melhorada, em que a quitosana sulfatada se apresenta como uma forte candidata.

## 1.1 Objetivo geral

Este trabalho objetivou estudar a modificação química da quitosana, de forma a obter filmes de quitosana sulfatada com propriedades hemocompatíveis melhoradas, apresentando potencial para a aplicação no revestimento de implantes intra-corpóreos.

## 1.2 Objetivos específicos

- i. Produzir e caracterizar filmes de quitosana natural e quitosana sulfatada;
- ii. Comparar propriedades hemocompatíveis dos filmes de quitosana sulfatada em relação à quitosana natural;
- iii. Estudar a adsorção de proteínas específicas do plasma (fibrinogênio e albumina) na superfície dos filmes de quitosana natural e quitosana sulfatada a partir de soluções proteicas puras;
- iv. Estudar a adesão plaquetária sobre as superfícies dos filmes de quitosana natural e sulfatada;
- v. Estudar a atividade anticoagulante *in vitro* da quitosana natural e sulfatada em plasma humano;
- vi. Estudar a citotoxicidade da quitosana natural e sulfatada em neutrófilos humanos;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biomateriais

Lesões ocasionadas por queimaduras, ferimentos, acidentes ou doenças como as degenerativas e cardíacas, por exemplo, acontecem em nosso meio e se faz necessário tratamento para o reparo da função do corpo ou órgão que foi danificado, de forma a oferecer a essas pessoas uma vida normal. Para tanto, são utilizados os chamados biomateriais.

Não se sabe exatamente quando data o surgimento do uso de biomateriais. Relata-se que em antigos textos orientais de medicina, já se encontravam evidências da utilização de materiais como ouro, marfim, madeira e pedras preciosas em implantes de dentes e a recolocação de partes ósseas por volta de 2500 a.C (GOMIDE, 2005). O conceito mais aceito é dito como “toda substância (não fármacos) ou combinações de substâncias que, de origem sintética ou natural, possa ser usada por qualquer período de tempo, como um todo ou parte de um sistema, o qual trata, reconstrói ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano” (WILLIAMS, 1986). O que diferencia biomateriais de outros tipos de materiais é a sua interação entre superfície e sistema biológico (DESAI, BIDANDA & BÁRTOLO, 2008).

As propriedades dos biomateriais afetam de forma direta nos efeitos biológicos, podendo gerar sérios impactos no organismo vivo. Dessa forma, um biomaterial deve causar o mínimo de efeito dentro do sistema biológico, devendo ser estudados: sua compatibilidade, biodegradabilidade, biorreabsorvibilidade, taxa de degradação, tamanho de poro e morfologia da superfície (MAIA *et al.*, 2010). Não devem causar efeitos adversos como toxicidade, carcinogenicidade, inflamação, mutagenicidade e em aplicações de contato com o sangue não devem ser trombogênicos (GABRIEL, 2012).

Os biomateriais se dividem em quatro categorias: polímeros, metais, cerâmicos e compósitos (DESAI, BIDANDA & BÁRTOLO, 2008) e são classificados de acordo com a sua origem em: natural ou artificial. Os biomateriais naturais se dividem em (GABRIEL, 2012):

- i. Autógenos: são os transplantados de um local para outro no mesmo organismo.
- ii. Homógenos: são os transplantados de um organismo para outro da mesma espécie.
- iii. Heterógenos: são os transplantados entre organismos de espécies diferentes.

Já os biomateriais artificiais se dividem em biomiméticos e sintéticos (GABRIEL, 2012). Materiais biomiméticos são materiais que procuram imitar processos encontrados nos sistemas biológicos que podem ser: poliméricos, compósitos ou cerâmicos. Os biomateriais sintéticos são divididos em (GOMIDE, 2005; GABRIEL, 2012):

- i. Biodegradáveis: são os que se decompõem naturalmente no sistema biológico após um determinado período.
- ii. Bioativos (cerâmicos): são os que possuem capacidade de interagir fortemente com o organismo vivo permitindo a integração do biomaterial com o tecido.
- iii. Bioinertes (polímeros e cerâmicos): não interagem com o organismo, não reproduzindo nenhuma resposta imunológica no local de aplicação.
- iv. Biotoleráveis (metais e polímeros): são biomateriais que induzem uma resposta mínima no receptor, porém são aceitos pelo organismo.

Segundo Nery (2014), os biomateriais são considerados como bioestáveis ou permanentes e bioabsorvíveis ou temporários, em que os primeiros são os utilizados por tempo indeterminado no corpo, como no caso de próteses, válvulas cardíacas e lentes intraoculares, enquanto que os posteriores são utilizados até a completa regeneração do órgão.

### **2.1.1 Stents**

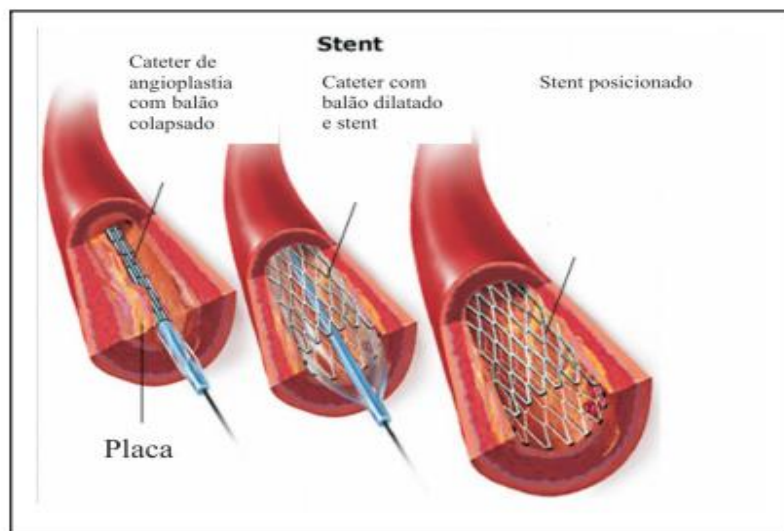
Doenças cardiovasculares vêm acometendo milhões de pessoas por ano e muitas vezes levando-as ao óbito. O tratamento empregado em doença vascular coronária, incluindo doenças em vasos sanguíneos e artérias, é a angioplastia transluminal percutânea, em que baseia-se na implantação de *stents* metálicos (WANG *et al.*, 2014).

*Stents* são pequenas estruturas tubulares utilizadas como dispositivos biomédicos principalmente em implantes intravasculares para tratar obstruções de vasos sanguíneos como resultado da aterosclerose ou da estenose (BRATS, 2013). Estenose se refere ao crescimento anormal da parede de um vaso ou de uma estrutura tubular do corpo. Para o tratamento de pacientes com vasos ocluídos, os *stents* são utilizados de forma a manter o lúmen arterial aberto, permitindo o funcionamento do fluxo sanguíneo e contribuindo para a menor morbidade (FIGURA 1). Existem cinco tipos básicos de *stents* (SAUERESSIG *et al.*, 2002):

1. Tubo de silicone,
2. Metálico expansível por balão,
3. Metálico auto-expansível,
4. Híbrido e
5. Bioabsorvível.

A utilização de stents metálicos e de silicone com a finalidade de tratamento de uma deficiência específica possui o inconveniente de induzir obstruções, incrustações e trombose ao longo do período de implante no corpo (VALIMAA *et al.*, 2002). O uso prolongado de stents muitas vezes causa reestenose intra-stent. Este fato levou pesquisadores a desenvolverem e utilizar stents farmacológicos, que são revestidos com polímeros os quais tem reduzido significativamente a incidência de reestenose intra-stent. Porém, estes não são eficazes em todas as situações clínicas e farmacológicas, havendo ainda limitação do ponto de vista farmacológico (CHORNY *et al.*, 2010).

FIGURA 1- Implante de *stent*.



FONTE: ASSAD, FEITOSA, & ASSAD, J. 2015.

## 2.2 Polímeros biomédicos

Os polímeros para uso em biomateriais de contato com o sangue são essencialmente de origem natural ou sintética. O PVC (Poli Cloreto de Vinila) se apresenta como o polímero mais amplamente utilizado para dispositivos médicos de curta duração no corpo, em dispositivos extracorpóreos, cateteres e sacos de sangue (PIRES,R. *et al.*, 2015). Encontra-se

disponível no comércio *grafts* vasculares e válvulas cardíacas produzidas a partir de poliéster, sobretudo de poli (etano tereftalato) (Dracon<sup>®</sup>) e poli (tetrafluoro etileno) (Teflon<sup>®</sup>) (AVRAMOGLU, 2001; PIRES, R. *et al.*, 2015). Polímeros também são utilizados em revestimentos, por exemplo, para melhorar a hemocompatibilidade de *grafts* intravascular (KANG & LEE, 2012). Apesar destes polímeros sintéticos se mostrarem promissores, eles apresentam o inconveniente da falta de hemocompatibilidade em dispositivos de contato com o sangue, propriedade que é fundamental para estes (BALAN&VERESTIUC, 2014).

Quanto aos polímeros naturais, eles se dividem em três classes: Proteínas, como por exemplo, colágeno, fibroína de seda, fibrina e elastina; Polissacarídeos, por exemplo, quitina, quitosana, dextrana, celulose, pectina, alginato e ácido hialurônico; e lipídeos, como ceras / surfactantes (FEDEL *et al.*, 2012). Os polissacarídeos possuem propriedade de biocompatibilidade e biodegradabilidade, características indispensáveis para polímeros utilizados como biomateriais, e não encontradas em outros tipos de polímeros naturais, além das propriedades como antiviral, antitumoral, gene modulador entre outros, terem sido encontradas para vários de polissacarídeos (DUMITRIU, 2001).

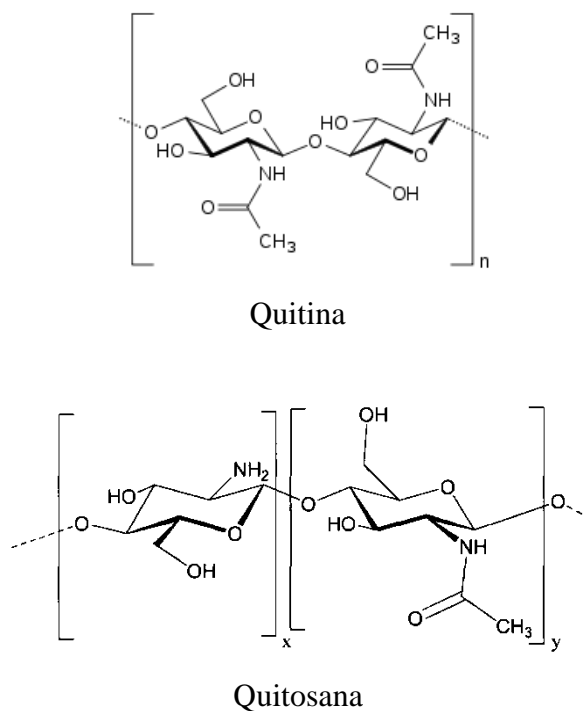
### 2.3 Quitosana

A quitina (FIGURA 2) é um importante polissacarídeo abundante na natureza (perde apenas para a celulose em disponibilidade) encontrada como componentes estruturais no exoesqueleto de artrópodes ou nas paredes celulares de fungos e leveduras (JAYAKUMAR *et al.*, 2010; YEH & LIN, 2012). Normalmente a quitina comercial é extraída das carapaças de caranguejos e cascas de camarões, oriundas de rejeitos das indústrias pesqueiras (NEVES, 2013). A obtenção da quitina pura é realizada através de rigorosos processos de extração: desmineralização, desproteinização e despigmentação da biomassa (SILVA, 2011).

O principal derivado da quitina é a quitosana, obtido através da reação de desacetilação parcial ou total, onde os grupamentos acetilados são reduzidos a grupos aminos livres. O processo de desacetilação amplamente empregado é por via alcalina, sob altas temperaturas e tempo de reação prolongado, no entanto, a desacetilação por via enzimática também pode ser empregada (NERY, 2014). Quando a quitina passa por um processo de desacetilação acima de 60%, é obtido um heteropolímero composto de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopirranose, ligados por uma ligação (1,4)- $\beta$ -glicosídica solúvel em solução aquosa ácida chamado de quitosana (FIG.2) (CROISIER & JÉRÔME, 2013; BALAN

&VERESTIUC, 2014). A taxa de unidades acetiladas por unidades desacetiladas na estrutura é definida como o grau de desacetilação (GD).

FIGURA 2. Estrutura da quitina e quitosana.



A quantidade de grupos aminos livres indicados pelo GD na estrutura polimérica determina a sua solubilidade, uma vez que na presença de soluções ácidas com pH menores que 6,0, os grupos aminos são protonados ( $\text{NH}_3^+$ ) apresentando cargas positivas distribuídas ao longo da cadeia e com um pKa variando de 6,3 a 7,2, causando a repulsão eletrostática entre as cadeias, favorecendo a solvatação em água (NEVES, 2013). Desta forma, a solubilidade da quitosana está intimamente relacionada ao seu GD, enquanto que a quitina é pobre em solubilidade uma vez que os grupos aminos nesta estrutura encontram-se bloqueados por grupos acetil.

A massa molecular da quitosana também está relacionada ao GD, afetando também a sua solubilidade. De forma geral, com o aumento do GD, a massa molecular é reduzida em consequência da perda dos grupos acetilados, no entanto, esse parâmetro dependerá da técnica utilizada para a desacetilação da quitina. Já a quitosana com alta massa molecular tende a reduzir a sua solubilidade devido às interações que ocorrem entre as cadeias poliméricas (SILVA, 2011). Com isso, em aplicações biológicas, a quitosana de baixa massa molecular é material de interesse por pesquisadores, uma vez que a solubilidade nestes casos é desejável.

Por ser um copolímero constituído de unidades amino acetilado e unidades amino desacetilado, a quitosana apresenta diferentes massas moleculares, isso muito depende do processo de desacetilação, condições reacionais empregados e origem da quitina. Desta forma, a quitosana foi classificada pela comunidade científica em baixa (50-190 kDa), média (190-310 kDa) e alta massa molecular (310-375 kDa) (HOU *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2014; OZ *et al.*, 2016).

O grau de desacetilação da quitosana tem forte influência também em suas propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade (WU *et al.*, 2014), assim como a massa molecular (MA & SAHAI, 2013; LARSSON *et al.*, 2013). Quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, maior será a interação entre sua superfície e células, uma vez que o grupo amino livre interage com as células causando adesão celular e proliferação (DASH *et al.*, 2011). Com isso, a quitosana na sua forma natural induz a trombose e coagulação do sangue em aplicações que envolvem o contato com o sangue (SHELMA & SHARMA, 2011).

No entanto, a quitosana tem sido motivo de diversos estudos devido suas características favoráveis, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, atividade antifúngica e facilidade de modificações devido à presença de grupos hidroxilo e amino reativos (SHELMA & SHARMA, 2011; CHANG & HUANG, 2012; WU *et al.*, 2012). Devido a essas características, este polímero vem sendo utilizado em diferentes formas, como filmes, géis, partículas, membranas ou suportes (BALAN & VERESTIUC, 2014) em diversas aplicações, tais como: no tratamento de água, agindo na remoção de íons metálicos através da quelacção; na medicina e biomedicina, na preparação de lentes de contato, na produção de membranas para diálise, na produção de curativos, na liberação controlada de fármacos, na engenharia de tecidos; cosméticos, em cremes de limpeza e compostos de tratamento de pele e cabelo; na agricultura, com o tratamento de sementes para inibição de fungos; no processamento de alimentos, na clarificação de vinhos, em coberturas comestíveis protetoras para fungos etc (GOY, ASSIS, CAMPANA FILHO, 2004; BALAN & VERESTIUC, 2014).

#### **2.4 Modificações químicas da quitosana**

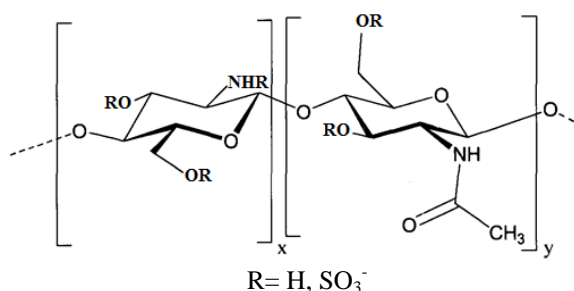
A estrutura química da quitosana é um polieletrólito linear catiônico com os grupos hidroxilo e amino reativos (VAKILI *et al.*, 2014). Essa reatividade dos grupos funcionais facilita diversas modificações químicas no polímero para melhorar uma propriedade

específica do produto final, como por exemplo, o tamanho de poros, a resistência mecânica, a estabilidade química, hidrofiliidade, biocompatibilidade, aumentar a sua seletividade e capacidade de adsorção de vários íons metálicos (JUSTI, 2006) utilizando-se de métodos como a imobilização de agentes quelantes (QU *et al.*, 2011), quaternização (BRITTO & ASSIS, 2012), carboxilação (JAYAKUMAR *et al.*, 2010), acilação (SHIBANO *et al.*, 2014), sulfonação (LIMA *et al.*, 2013), amidação (OLIVEIRA, 2011), formação de complexo polieletrólítico (CAMPELO *et al.*, 2016), reticulação (MA & SAHAI, 2013), dentre outros.

A modificação química desse polissacarídeo é de grande interesse pelos pesquisadores devido ser uma oportunidade para gerar novos materiais biofuncionais, uma vez que tal procedimento não altera seu esqueleto fundamental, mantendo o físico original e propriedades bioquímicas dependendo da natureza do grupo introduzido (JAYAKUMAR *et al.*, 2007).

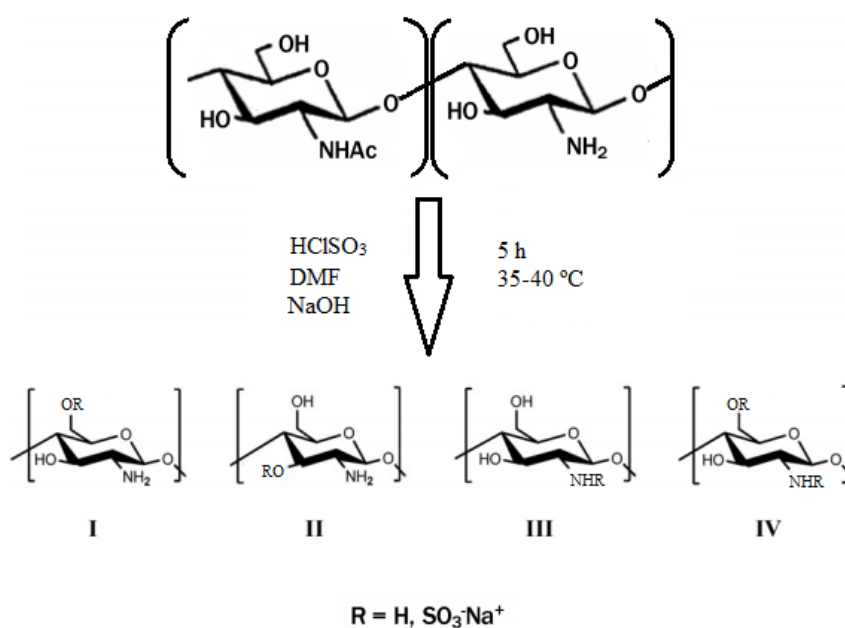
Na área biomédica, médica e farmacêutica, dentre os derivados da quitosana, a quitosana sulfatada (FIGURA 3) tem atraído especial interesse pelos pesquisadores devido suas propriedades anticoagulantes, hidrofílica e com baixa citotoxicidade (SHELMA & SHARMA, 2011; YEH & LIN, 2012; PIRES *et al.*, 2013). Em biomateriais de contato com o sangue, a modificação química da quitosana com grupos sulfônicos é explorada devido a sua capacidade em reduzir a interação entre superfície e sangue, uma vez que a introdução destes grupos na cadeia polimérica conduz a uma densidade de carga negativa na superfície, ocasionando uma redução na adsorção de proteínas plasmáticas por repulsão eletrostática, as quais iniciam os efeitos biológicos no organismo quando em contato com superfícies estranhas (AMIJI, 1998; HU, 2005; XU, BAUER & SIEDLECKI, 2014). Tal efeito mimetiza a heparina (FIGURA 5), um anticoagulante natural do sangue empregado na profilaxia e tratamento da trombose (SILVA, 2012). Este polímero modificado apresenta mecanismo biomolecular de atividade anticoagulante, atividades antiateroscleróticas, de baixa citotoxicidade e antivirais, no entanto, obtida de fonte mais barata quando comparado com a heparina (JAYAKUMAR *et al.*, 2007; CHANG & HUANG, 2012; LIMA *et al.*, 2013).

FIGURA 3 – Estrutura da quitosana sulfatada.



Várias modificações da quitosana por sulfatação têm sido relatadas na literatura. Dependendo das condições em que forem submetidas às reações, o grupo sulfato pode ser incorporado na cadeia polimérica de quatro formas (ESQUEMA 2): no Carbono 2 (grupo  $\text{NH}_2$ ), resultando em quitosana 2-N-sulfatada; no carbono 6 (grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), obtendo quitosana 6-O- sulfatada e; no carbono 3 (grupo OH), resultando em quitosana 3-O- sulfatada (PIRES *et al.*, 2013). O grupo sulfônico pode ainda ser incorporado à cadeia em mais de uma posição, como no C2 e C6, resultando numa quitosana 2-N, 6-O- sulfatada (MA & SAHAI, 2013; CAO *et al.*, 2014) ou no C3 e C6, resultando em quitosana 3,6-O- sulfatada (YUAN *et al.*, 2009). Houve relato ainda de substituição nos três grupos reativos, no entanto, de uma forma parcial, resultando em uma quitosana parcialmente 2-N,3,6-O sulfatada (SUWAN *et al.*, 2009).

ESQUEMA 2 – Rotas de reação de sulfatação da quitosana.



Fonte: Elaborada pela autora.

Pires *et al.* (2013) utilizaram um complexo de ácido clorossulfônico com N,N-Dimetilformamida como agente sulfatante para obter uma quitosana sulfatada com a finalidade de produzir um substituto de lágrima. Ácido clorossulfônico concentrado também foi utilizado como sulfatante por Karadeniz *et al.* (2011), para melhorar o efeito anti-adipogênico da quitosana. Tsai *et al.* (2010) utilizaram propano sultona como agente sulfatante da quitosana objetivando conseguir um material solúvel em água para uso em sistema de reação controlado.

Lima *et al.* (2013) utilizaram ácido 5-formyl-2-furansulfônico (FFSA) como agente sulfatante da quitosana para produzir filmes e estudar a adsorção de proteínas presentes no sangue sobre a superfície. Vikhoreva *et al.* (2005) utilizaram Oleum como agente sulfatante para estudar a atividade anticoagulante do produto sulfatado. Já Yeh & Lin, (2008) e Yang *et al.* (2013) utilizaram o complexo trióxido de enxofre com piridina para sulfatação da quitosana com o objetivo também de estudar a atividade anticoagulante deste polímero sulfatado. Enquanto que Chang & Huang (2012) utilizaram ácido sulfúrico para obter quitosana sulfatada e estudar a biodegradabilidade e propriedade anticoagulante dos filmes revestidos em ligas de TiNi.

Segundo Gamzazade *et al.* (1997), a modificação química da quitosana pode ser sintetizada sob condições reacionais pseudo-homogêneo, homogêneo, semi-heterogêneo e em meio aquoso. Devido à baixa solubilidade da quitosana em solventes orgânicos, esta reação é geralmente realizada em condições semi-heterogêneas, obtendo produtos finais heterogêneos, com menor grau de substituição, favorecendo apenas grupos funcionais de fácil acesso (JAYAKUMAR *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2013). Ainda existem poucos métodos de sulfatação sob reações homogêneas relatados na literatura, no entanto, tem sido interesse de pesquisadores devido esta reação ser melhor controlada, podendo conseguir produtos mais uniformes (GARCIA *et al.*, 2008).

Desta forma, produtos diferentes são obtidos através da reação de sulfatação da quitosana e com propriedades diferentes em função das condições reacionais empregadas, mesmo quando as demais constantes reacionais são mantidas (YANG *et al.*, 2013).

## **2.5 Polissacarídeos sulfatados**

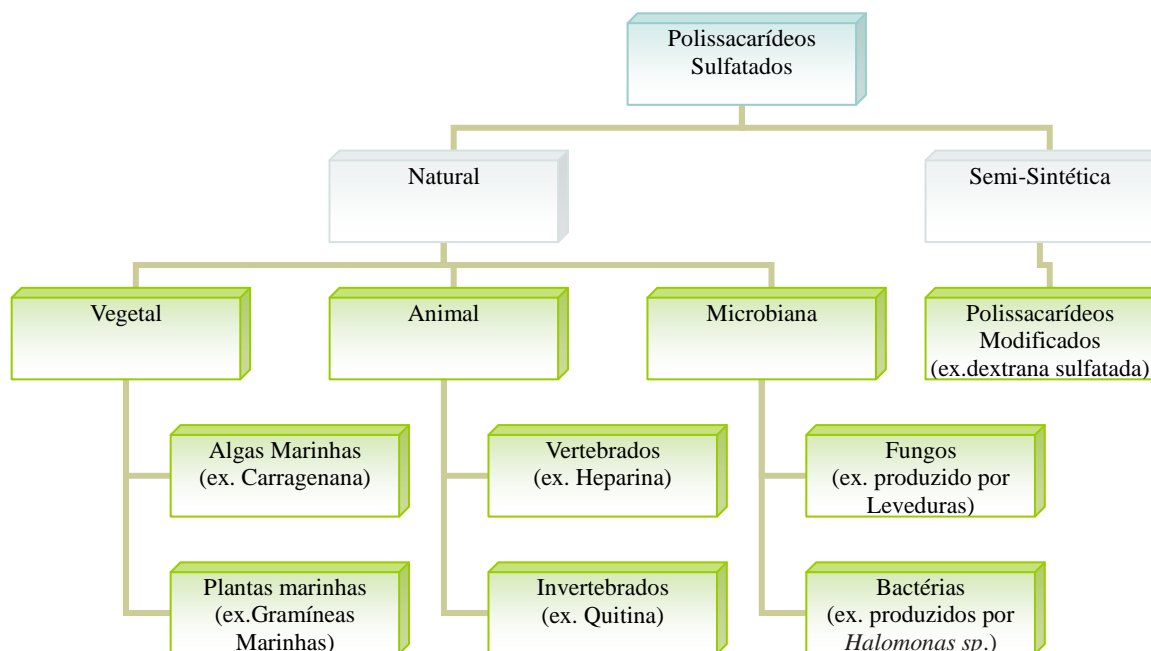
Polissacarídeos que possuem grupos sulfato em sua estrutura são chamados de polissacarídeos sulfatados, em que este grupo funcional é importante para conferir propriedades biológicas a este polímero e são muito utilizados no tratamento da trombose. A área biomédica vem explorando estes tipos de polissacarídeos devido às suas excelentes propriedades para este ramo, como antivirais, antitumorais, anti-angiogênico, anticoagulante, antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa, antiparasitários, antimetastáticos, e atividades imunomoduladoras (RAVEENDRAN *et al.*, 2013).

A bioatividade destes polissacarídeos está intimamente relacionada a sua massa molecular, grau de sulfatação, posição do grupo sulfato na cadeia e hidrofiliabilidade

(RAVEENDRAN *et al.*, 2013; MOURA NETO, 2013). Quanto à origem, podem ser naturais ou semi-sintéticos (FIGURA 4). A de fonte natural é extraída a partir de plantas (algas e plantas marinhas), animais (presentes em tecidos de vertebrados na forma de glicosaminoglicanos e em invertebrados como oligômeros de unidades repetidas) e microorganismos (fungos ou bactérias). Já os semi-sintéticos são polissacarídeos quimicamente modificados (RODRIGUES & FARIAS, 2009; SILVA, 2012; RAVEENDRAN *et al.*, 2013).

Dentre estes polissacarídeos sulfatados, alguns deles são: heparina, dextrana sulfatada, quitina e quitosana sulfatada, carragenanas, fucoidanas, glicosaminoglicanas, glucanas sulfatadas, galactomananas sulfatadas e galactanas sulfatadas. A Tabela 1 mostra exemplos de aplicações de alguns polissacarídeos sulfatados para área biomédica e farmacológica.

FIGURA 4- Classificação dos polissacarídeos sulfatados.



Fonte: Adaptado pela autora.

TABELA 1- Aplicações de polissacarídeos sulfatados na área biomédica e farmacológica.

<b>Polissacarídeo</b>	<b>Aplicações biomédicas</b>
<b>Carragenana</b>	Atividade anticoagulante, antiviral, anti-oxidante (SOUZA <i>et al.</i> , 2007), antimicrobiana (MC-GOWAN, 2006; GHOSH, <i>et al.</i> , 2009).
<b>Fucoidanas</b>	Atividade anticoagulante, antiviral, anti-inflamatório (CUMASHI <i>et al.</i> , 2007), anti-oxidante (WANG <i>et al.</i> , 2008).
<b>Sulfato de Condroitina</b>	Atividade anti-inflamatória (VOLPI, 2011).
<b>Heparina</b>	Atividade anticoagulante, Anti-proliferativa, Anti-tumoral (LEE, C., HUANG, LEE, Y, 2006), antiviral (GHOSH <i>et al.</i> , 2009).
<b>Dextrana sulfatada</b>	Antiviral (WITVROUW & CLERCQ, 1997; RUBIO, 2009).
<b>Quitosana Sulfatada</b>	Atividade anticoagulante, antibacteriana (BULWAN <i>et al.</i> , 2012; SUBHAPRADHA <i>et al.</i> , 2013a), antiviral (KARTHIK <i>et al.</i> , 2016), anti-oxidante (VINO <i>et al.</i> , 2012), capacidade osteogênica (ZHANG, K. <i>et al.</i> , 2011; CAO <i>et al.</i> , 2014).

Fonte: Elaborada pela autora.

### **2.5.1 Heparina**

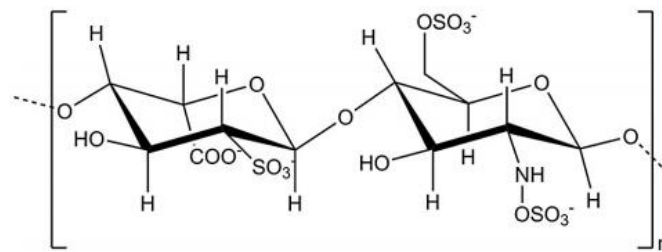
A heparina é um polissacarídeo que apresenta naturalmente grupos sulfatados em sua estrutura polimérica, com propriedade anticoagulante muito utilizado na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, pós-cirurgias e pós-parto. De origem natural, é um tipo de glicosaminoglicano sulfatado sintetizado por mastócitos presentes no próprio corpo humano (WEI *et al.*, 2011). O mecanismo anticoagulante da heparina na coagulação se dá pela sua interação com a antitrombina, inativando enzimas da coagulação: trombina e fatores Xa e IXa (ZULUETA *et al.*, 2013). Esta molécula utilizada na área farmacêutica é oriunda da mucosa intestinal de suínos ou de células pulmonares de bovinos (RUBIO, 2009).

Apesar de a heparina ser um importante anticoagulante empregado no tratamento de doenças como a trombose, seu uso possui limitações, dentre estas, existe complicações relacionadas a hemorragia quando utilizadas por um longo prazo, necessitando o acompanhamento laboratorial contínuo na utilização de heparina ou varfarina (HAMERSCHLAK & ROSENFELD, 1996; RODRIGUES & FARIAS, 2009). Outra desvantagem no uso deste polissacarídeo, é que por serem extraídos de vísceras de animais, pode existir risco de contaminações para os pacientes (JUNQUEIRA, 2011). Desta forma, a

busca por substitutos destes anticoagulantes que transmitam mais segurança ao paciente e que seja de fonte mais acessível torna-se necessária.

Quanto a sua estrutura, a heparina é composta de unidades repetidas de ácido hexurônico e D-glicosamina, onde o ácido hexurônico pode ser ácido L-idurônico ou D-glicurônico, ligadas por ligações 1,4-glicosídicas (FIGURA 5). A glicosamina pode ser 6-O-sulfatada, N-sulfatada, N-acetilada e esporadicamente 3-O-sulfatado, já o ácido hexurônico é -2-O sulfatado, onde esse polímero apresenta massa molecular de 5 a 70 kDa (YANG, B. *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2011). Já como características químicas, é um glicosaminoglicano sulfatado, polianiônico, altamente ácido capaz de se ligar aos aminoácidos básicos de proteínas no organismo. Este polissacarídeo se distingue por sua alta acidez em consequência dos grupos sulfatados ( $\text{SO}_3^-$ ) e carboxílicos ( $\text{COO}^-$ ) presentes em sua estrutura (RUBIO, 2009).

FIGURA 5- Estrutura da Heparina.



FONTE: RAVEENDRAN *et al.*, 2013.

## 2.6 Hemocompatibilidade

Biomateriais como dispositivos médicos de contato com o sangue muitas vezes induzem a formação de trombos e inflamação. Estes dois processos são interligados e envolvem a ativação da coagulação e do sistema complemento, além da adesão e ativação de plaquetas e leucócitos quando um corpo estranho (superfície) entra em contato com o sangue (FREITAS, BARBOSA, MARTINS, 2010; HAAG *et al.*, 2014). A necessidade de desenvolver estratégias para melhorar a hemocompatibilidade de superfícies é objeto de estudos recentes por muitos cientistas da área biomédica.

A hemocompatibilidade se refere à compatibilidade dos materiais e dispositivos que entram em contato com o sangue. Essa propriedade rege as interações do material com o sangue e a bioquímica da coagulação, assim como ao *design* e a funcionalidade desses dispositivos de contato com o sangue (RATNER *et al.*, 2013). A biocompatibilidade pode ser

definida como a habilidade do material em realizar respostas apropriadas em locais específicos da aplicação (WILLIAMS, 1986), ou seja, um biomaterial ao ser aplicado em um paciente deve apresentar respostas esperadas no local de aplicação sem causar injúrias ou perturbações no fluido corpóreo durante o tempo hospedado. Biocompatibilidade foi definida ainda como a tolerância de elementos líquidos e sólidos do corpo para qualquer superfície de contato com o sistema biológico humano, enquanto que “compatibilidade com o sangue” se refere à tolerância do sangue para estas superfícies (CHEN *et al.*, 2011). Já a biofuncionalidade trata das características mecânicas após a implantação, para tanto sendo empregados materiais como metais / ligas, cerâmicas / vidros e polímeros (CHEN *et al.*, 2011).

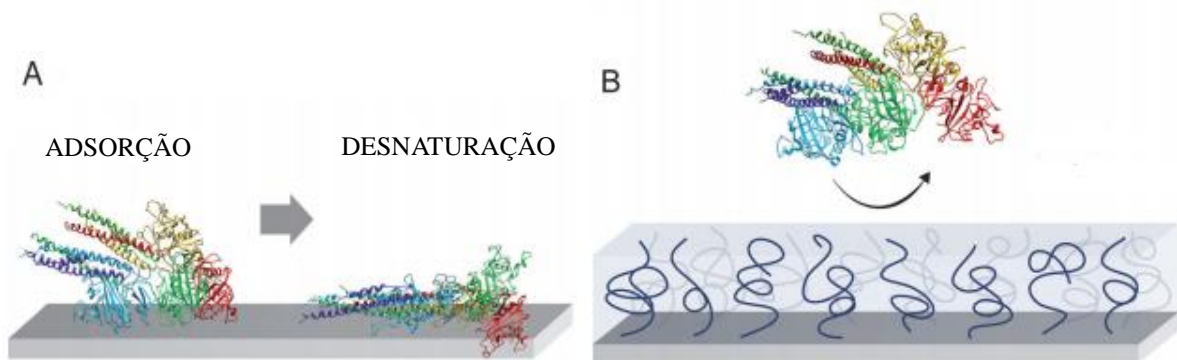
É de conhecimento que o sangue é o primeiro fluido do corpo ao entrar em contato com qualquer superfície, o que torna a compatibilidade com o sangue propriedade importante em processos clínicos como na aplicação de *grafts* vasculares, *stents*, válvulas cardíacas entre outros. Essa interação de superfície-sangue conduz a complicações como formação de trombos e tromboembolia nas superfícies (JUNG *et al.*, 2013). Pesquisadores acreditam que os responsáveis por esses processos são: o biomaterial (sua composição, interação com a água), a condição hemodinâmica (componentes do sangue, turbulência) e o ambiente biológico (HOFFMAN, 1982; CHEN *et al.*, 2011).

A formação de trombos acontece em quatro passos: primeiro, iniciam com a adsorção de proteínas na superfície, seguindo a uma série de adsorção e deslocamento por proteínas mais específicas na superfície de contato, conhecido como o “efeito *Vroman*” (JUNG *et al.*, 2013). Segundo, acontece a adesão plaquetária através de proteínas aderidas. Terceiro, a ativação das plaquetas aderidas liberando grânulos e por último, a formação de trombo pela formação de uma rede de fibrina no local (JUNG *et al.*, 2013).

Uma das estratégias para melhorar a hemocompatibilidade de biomateriais e dispositivos médicos que vem sendo estudado por muitos pesquisadores é o revestimento e ou modificação da superfície desses materiais por, como por exemplo, polímeros (FISCHER *et al.*, 2012; XUE *et al.*, 2013; HAAG *et al.*, 2014), proteínas (GONÇALVES *et al.*, 2009), ácido hialurônico (YEH & LIN, 2008), fármacos e células endoteliais (CHEN *et al.*, 2011).

A Figura 6 exemplifica a dinâmica de adsorção de proteínas em uma superfície sem o revestimento (A) e com o revestimento de polímeros(B).

FIGURA 6 – Dinâmica de adsorção de proteínas em superfícies revestidas com polímeros.



FONTE: HAAG *et al.*, 2014.

### 2.6.1 Adsorção de proteínas e adesão de plaquetas

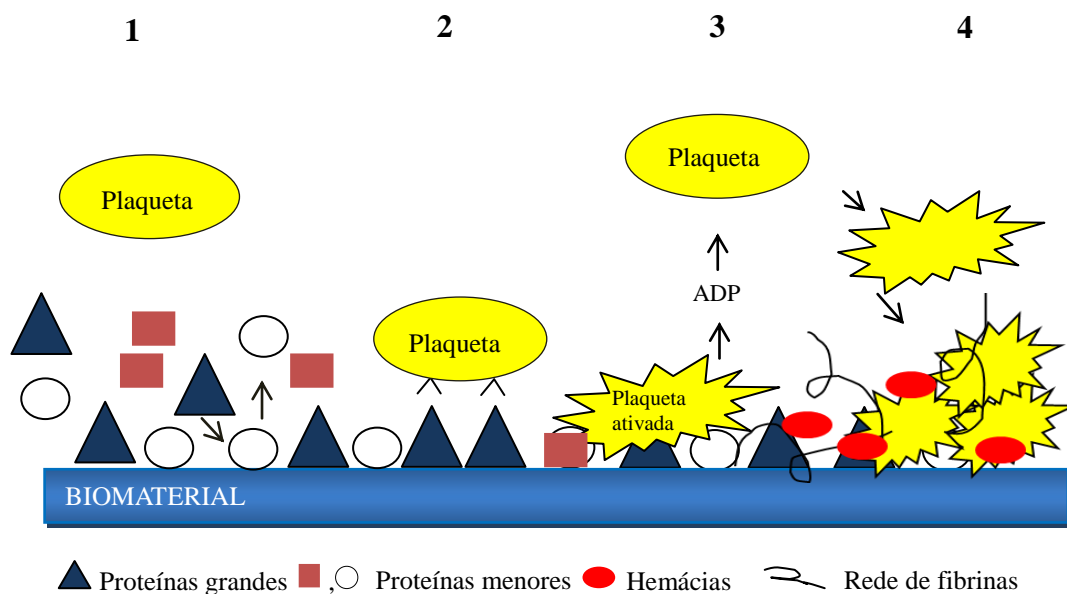
Vários tipos de proteínas estão presentes no plasma sanguíneo e são as primeiras a entrarem em contato com materiais estranhos ao corpo, tais como implantes, mediando às respostas biológicas subsequentes (HOLMBERG *et al.*, 2007; KANG & LEE, 2012). A adsorção de proteínas na superfície de um biomaterial vai depender das propriedades desta superfície, como a topografia, características químicas, cargas e hidrofobicidade, o que irá moderar as respostas biológicas (XU, BAUER & SIEDLECKI, 2014). Estas respostas serão conduzidas pela camada de proteínas formada na superfície, como a coagulação sanguínea, ativação do complemento e adesão de bactérias e células, o que torna esta uma etapa importante e amplamente estudada de forma a melhorar a biocompatibilidade de dispositivos médicos (INDEST *et al.*, 2010; XU, BAUER & SIEDLECKI, 2014).

Dentre estas proteínas, as que se encontram em maior quantidade no plasma são: Albumina, imunoglobulinas e fibrinogênio, em que representam mais que 50% de todas as proteínas do plasma sanguíneo. No caso da formação de trombos induzidas por superfície, a albumina e globulina são consideradas inertes na adesão e ativação de plaquetas (RATNER *et al.*, 2013; XU, BAUER & SIEDLECKI, 2014). Já o fibrinogênio é considerado uma importante proteína no processo de coagulação e trombose na superfície de biomateriais devido apresentar caráter multifuncional, como: ligante na adesão de plaquetas, ligando agregados de plaquetas e na estabilização de trombos com a formação de uma rede de fibrina (XUE *et al.*, 2013; XU, BAUER & SIEDLECKI, 2014). Outras proteínas do plasma, como a fibronectina, vitronectina e o fator de Von Willebrand mostram-se também capazes de mediar a adesão de plaquetas em superfícies quando estão pré-adsorvidas na superfície devido a estas proteínas poderem se ligar as membranas de plaquetas através de receptores específicos, como

por exemplo, glicoproteínas IIb/IIIa (conhecido como integrinas  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ), onde essa ligação leva a adesão e agregação de plaquetas (RATNER *et al*, 2013).

O mecanismo de adsorção de proteínas do sangue é ainda bastante complexo, uma vez que o sangue trata-se de um componente concentrado, com vários tipos de proteínas, onde seu processo de adsorção é seletivo e competitivo (ZHANG *et al.*, 2008). No entanto, sabe-se que este processo inicia-se através de interações (eletrostáticas, hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio) entre a proteína e a superfície (BALAN & VERESTIUC, 2014). De forma geral, proteínas de menores pesos moleculares são as primeiras a entrarem em contato com a superfície e podem ser deslocadas de acordo com a concentração, pesos moleculares maiores ou afinidade de outras proteínas, conhecido como o efeito *Vroman*, diante de uma mistura de proteínas, que é o caso do plasma sanguíneo e uma mudança conformacional na proteína acontece de forma irreversível (NOH & VOGLER, 2007). Receptores específicos de plaquetas, as integrinas, se aderem às proteínas adsorvidas e quando ativadas, liberam grânulos, tais como a adenosina difosfato (ADP), que estimula a ativação de outras plaquetas levando a uma agregação plaquetária irreversível e a ativação da cascata de coagulação resultando na formação de trombos (AMIJI, 1997; RATNER *et al*, 2013). A Figura 7 resume o mecanismo de adsorção de proteínas em biomateriais.

FIGURA 7- Mecanismo de adsorção de proteínas em biomateriais.



1- Início da adsorção de proteínas com competição por afinidade com a superfície (Efeito *Vroman*) 2- Mudança conformacional irreversível das proteínas e reconhecimento por receptores específicos de plaquetas 3- Ativação das plaquetas e liberação de grânulos que ativam novas plaquetas 4 – Formação de agregado de plaquetas e a formação do trombo. FONTE: Elaborada pela autora.

### 2.6.2 Coagulação do sangue

A formação de trombos em resposta a interação biomaterial-sangue consiste tanto das reações mediadas por plaquetas (adesão plaquetária, ativação e agregação) como da coagulação do plasma sanguíneo iniciadas pela interação de proteínas com a superfície e catalisadas por enzimas da cascata de coagulação presentes no plasma.

O desencadeamento da cascata de coagulação pode ser iniciado pelo contato do plasma com superfícies carregadas negativamente (rota intrínseca) ou por uma injúria do tecido (rota extrínseca) que ativará as proteases da coagulação, envolvendo seus cofatores, chegando a uma rota comum, onde culmina na produção de trombina, uma importante proteína da coagulação que tem por função clivar o fibrinogênio em fibrinas e estabilizar o trombo (ESQUEMA 1) (RATNER *et al.*, 2013). No entanto, a separação dessas rotas apenas se faz necessário para entender, de forma didática, o estudo da coagulação, pois quando *in vivo*, existe a interatividade dessas rotas (FRANCO, 2001; FERREIRA *et al.*, 2010).

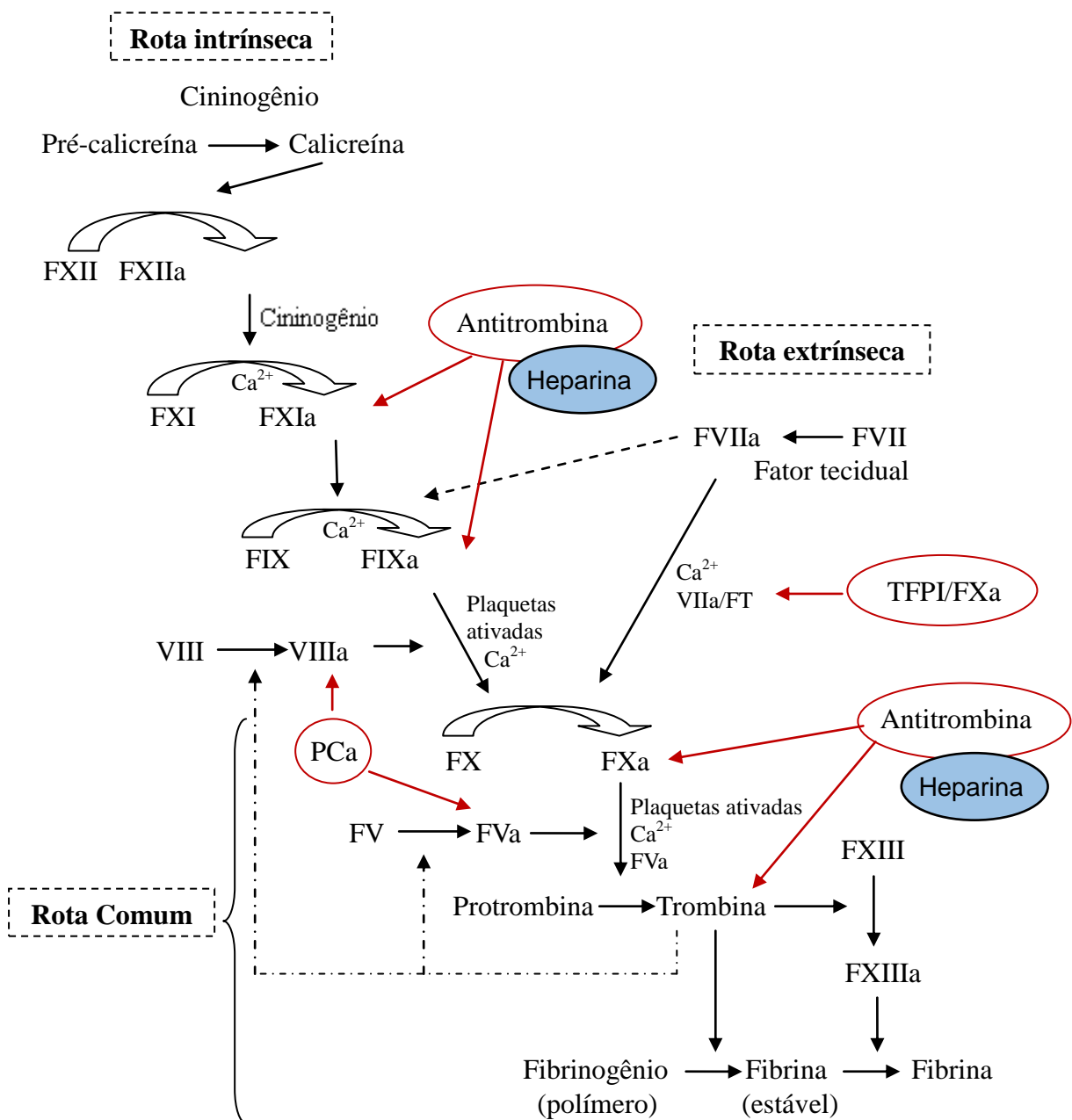
A cascata de coagulação é assim denominada devido os fatores inativos serem enzimaticamente ativados após o contato superficial ou depois de uma clivagem proteolítica por outras enzimas do processo de coagulação de forma sequencial, ou seja, em cascata. Este processo será detalhado a seguir de acordo com o apresentado pela literatura (FRANCO, 2001; GORBET & SEFTON, 2004; VOGLER & SIEDLECKI, 2009; RATNER *et al.*, 2013).

Na via intrínseca, as reações iniciam com a adsorção de fatores de contato em uma superfície negativamente carregada, onde o fator XII é ativado na presença de pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). Este fator ativado, na presença também de cininogênio de alto peso molecular, ativa o fator XI. O fator XIa na presença de cálcio, ativa o fator IX, que por sua vez, na presença de fator VIII ativado por traços de trombina, e de íons cálcio, formam o complexo FIXa/VIIIa (complexo “tenase” intrínseco) na superfície da plaqueta ativada (que contém fosfolípidos), onde então ativam o fator X. A via extrínseca é iniciada com a ativação do fator VII na presença de cálcio e do fator tecidual (uma proteína da membrana celular exposta com a injúria do tecido), onde formam um complexo fator VII ativado e fator tecidual (FVIIa/FT) chamado complexo “tenase” extrínseco, responsável pela ativação do fator X, podendo ativar ainda o fator IX.

A rota comum inicia com a ativação do fator X, pelo complexo “tenase” extrínseco (FVIIa/FT) ou intrínseco (FIXa/VIIIa). O fator Xa na presença de cálcio e do fator V ativado

por trombina formam o complexo Xa/Va, que também na presença de cálcio e na superfície da plaqueta ativada, forma um complexo chamado “protrombinase”, responsável por converter protrombina em trombina. A presença de uma grande quantidade de protrombina no plasma e com a rápida amplificação do processo de coagulação, acontece uma “explosão” na produção de trombina, proteína esta responsável pela ativação de plaquetas e ativação dos fatores V e VIII, além de agir na clivagem do fibrinogênio e fator XIII. A clivagem do fibrinogênio produz monômeros de fibrina, que se polimerizam formando um gel ou coágulo. O fator XIII

ESQUEMA 1- Rotas da cascata de coagulação.



FONTE: Adaptado pela autora.

é preso na rede de fibrina formada, ou fornecida por plaquetas, sendo então este fator ativado pela trombina, que então estabiliza a rede de fibrinas.

A regulação da coagulação de forma a evitar a produção excessivamente de trombos e oclusão de vasos sanguíneos é feita por enzimas inibitórias que atuam como anticoagulantes naturais, onde as principais são: o TFPI (“tissue factor pathway inhibitor”), a proteína C (PC), proteína S (PS), e a antitrombina (AT) (FRANCO, 2001; RATNER *et al.*, 2013). O TFPI associada ao fator Xa inibe o complexo FVIIa/FT. A PC é uma importante proteína na regulação fisiológica da coagulação, é ativada pelo complexo trombina-trombomodulina, conduzindo então clivagem e inativação dos fatores Va e VIIIa. A PS potencializa a ação da PC (CIPRANDI, HORN, TERMIGNONI, 2003). AT é um potente inibidor da trombina e também de outras enzimas, como os fatores IXa, Xa e XIa. A heparina potencializa a ação da antitrombina quando se liga com a AT, ocasionando uma mudança conformacional no centro reativo da AT, fazendo acelerar seu processo de inativação das enzimas (GORBET & SEFTON, 2004; SANTOS *et al.*, 2007).

### **2.6.3 Resposta do sistema complemento**

O sistema complemento é responsável pelas respostas inflamatória e imune celular do organismo quando em contato com corpos estranhos ou ataques de bactérias ou outros patógenos, ou seja, é o sistema de defesa imunológico. É composto por mais de 20 proteínas plasmáticas, algumas com função de enzimas e outras de ligação (SPERLING *et al.*, 2009). A ativação envolve três fases: Clássica, alternativa e lectina (RATNER *et al.*, 2013).

A ativação deste sistema acarreta a lise celular quando o complexo de ataque terminal é introduzido na membrana celular (MAC), além de liberar fragmentos (C3a, C4a e C5a) que se ligará a receptores específicos de neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos e células musculares lisas induzindo a resposta celular, como adesão celular, ativação de células e inflamação (GORBET & SEFTON, 2004). Estas atividades do sistema complemento estão resumidas na Tabela 2.

Segundo Ratner *et al.* (2013), as superfícies estranhas ao corpo, como as superfícies de biomateriais de implante, ativam a fase alternativa do sistema complemento, onde as fases deste sistema interagem entre si. Já segundo Sperling *et al.* (2009), propriedades químicas de biomateriais, tal como a presença de grupos hidroxilo que se assemelham a iniciadores naturais do sistema complemento, induzem a ativação deste.

TABELA 2- Atividades do sistema complemento

<b>Atividade</b>	<b>Proteína do complemento</b>
Identificação/opsonização de patógenos	C3, C4
Recrutamento/ativação de células inflamatórias	C3a, C5a
Lises de patógenos/citotoxicidade	C5b-9 (MAC)
Complexo de desobstrução imune e células apoptóticas	C1q, C3b, C4b
Aumento da resposta imune celular (células T e B)	C3, C4, C3a, C5a

FONTE: Ratner *et al.*, 2013.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

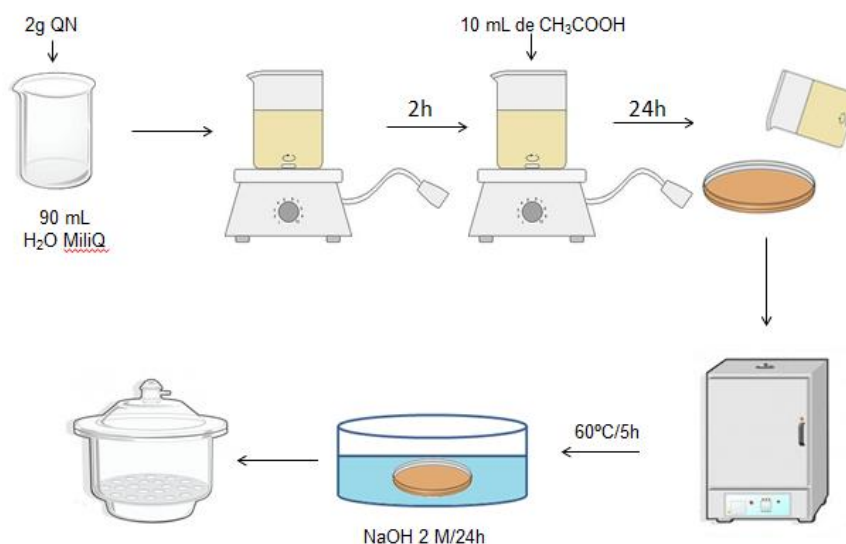
Foram utilizados quitosana (CÓD. 48165) com grau de desacetilação 77% (determinado por RMN-H), *Fibrinogen from bovine plasma* (CÓD. F8630-16), *Bovine serum albumin* (BSA CÓD. A2153) e *phosphate buffered saline* (PBS, preparado a partir do pó em água destilada/deionizada (18M $\Omega$ ), pH 7.4) obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Ácido clorossulfônico (HClSO<sub>3</sub>) foi obtido da Merck. N.N-Dimetilformamida (DMF) e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Labsynth. Metanol e glutaraldeído foram obtidos da VETEC Química Fina (Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. A membrana de diálise foi obtida da INLAB possuindo *Cut-off* de peso molar de 12.000-16.000 g/mol e porosidade de 25 Å.

#### 3.1 Procedimentos para obtenção do filme de quitosana natural

Uma solução 2% (p/v) de quitosana em 10% (v/v) de ácido acético foi preparada utilizando 2g de quitosana em 90 mL de água MiliQ e conduzida à agitação mecânica por 2 h para a hidratação da quitosana. Após, foi adicionado 10 mL de ácido acético à solução e conduzida novamente à agitação mecânica durante 24h até a completa solubilização do polímero. Com a solução pronta, dispersou-se 18 g em placa de Petri de 10 cm de diâmetro e em seguida conduziu-se à estufa a 60° C por um período de 5 horas ou até que a massa permanecesse constante. Em seguida, o filme foi imerso em solução de NaOH 2M por 24h. Após isso, o filme foi lavado exaustivamente até que a água de lavagem atingisse pH neutro e

conduzido ao dessecador a vácuo para secagem (FIGURA8).

FIGURA 8- Processo de obtenção do filme de quitosana natural.



Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.2 Procedimentos para obtenção do filme de quitosana sulfatada

O procedimento para sulfatação da quitosana foi realizado segundo metodologia proposta por Carreón *et al.* (2010), com algumas modificações. Solução de quitosana natural foi obtida de acordo com o procedimento descrito no item anterior e um resumo do processo de sulfatação da quitosana é apresentado na Figura 9.

#### ***Trocas de solventes:***

Uma solução de quitosana natural 2% (p/v) preparada conforme item 3.1 foi precipitada com NaOH 2M para obter um gel de quitosana. Em seguida, o gel foi lavado com água MiliQ até atingir pH neutro, e separado através de filtração em papel filtro, e o excesso de água foi retirado por uma leve pressão. Iniciou-se uma série de trocas de solventes em concentrações de: 20, 40, 60, 80 e 100% em intervalos de 30 minutos cada. Inicialmente foi feita uma troca com solução de metanol seguida da troca com solução de DMF e finalizando a segunda troca com uma solução de DMF 100 %.

#### ***Sulfatação:***

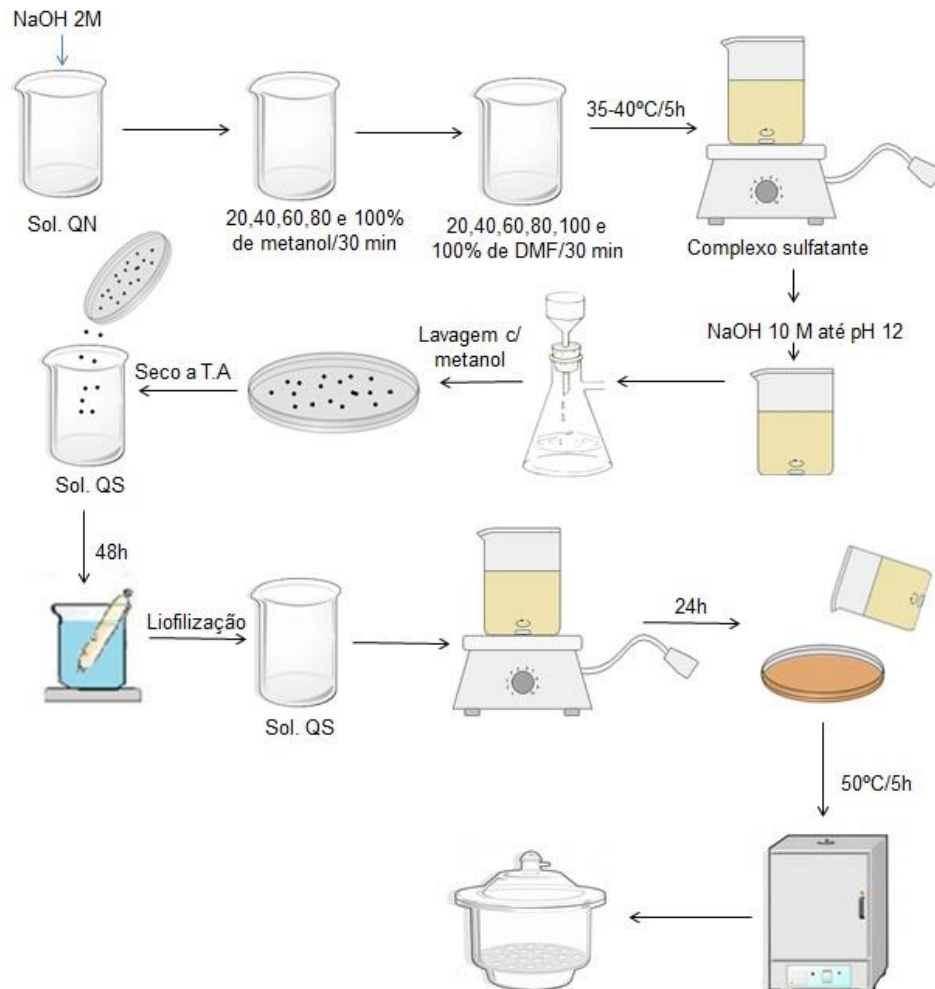
Um complexo sulfatante foi preparado adicionando ácido clorossulfônico em 60 mL de DMF (resfriado entre 0-4°C) em balão de três bocas, gotejando e com leve agitação em banho

de gelo. Esperou-se a mistura atingir a temperatura ambiente e seguiu-se com a agitação, em agitador magnético, até atingir temperatura entre 35-40°C. Em seguida, adicionou-se à mistura o gel de quitosana impregnado com DMF, triturado, e deixou-se sob agitação por 5 h. Uma solução de cor amarelo claro foi obtida e reagida com NaOH 10M até atingir pH 12, com sólidos em suspensão. Os sólidos foram filtrados e lavados com metanol pelo menos seis vezes e seco a temperatura ambiente. O sólido seco foi disperso em aproximadamente 100 mL de água destilada e conduzido à diálise contra água destilada por 48h em membranas de diálise com *cut-off* de peso molar de 12000-16000 g/mol, com duas trocas de água por dia. Terminado a diálise, a solução foi transferida para tubos Falcon e congelada através de nitrogênio líquido, sendo em seguida conduzido à liofilização para obter o pó de quitosana sulfatada. As amostras foram denominadas de QS2, QS4, QS6 e QS8 conforme a quantidade de ácido utilizado: 2, 4, 6 e 8 mL, respectivamente.

#### ***Preparação dos filmes de quitosana sulfatada:***

Pesou-se 1 g da quitosana sulfatada e dissolveu-se em 50 mL de água destilada para obter uma solução 2% (p/v). O pH foi conferido para a neutralidade. A solução foi agitada magneticamente por 24 h até a sua completa homogeneidade. A solução foi filtrada para remoção de resíduos insolúveis. Aproximadamente 12 g da solução foi dispersa em placas de Petri de poliestireno com diâmetro de 87 mm e conduzida para a secagem a 50 °C em estufa durante 5h ou até que a massa permanecesse constante. Ao final, os filmes prontos foram armazenados em dessecador a vácuo a temperatura ambiente até o momento do uso.

FIGURA 9- Processo de sulfatação da quitosana e obtenção do filme. T.A: Temperatura Ambiente.



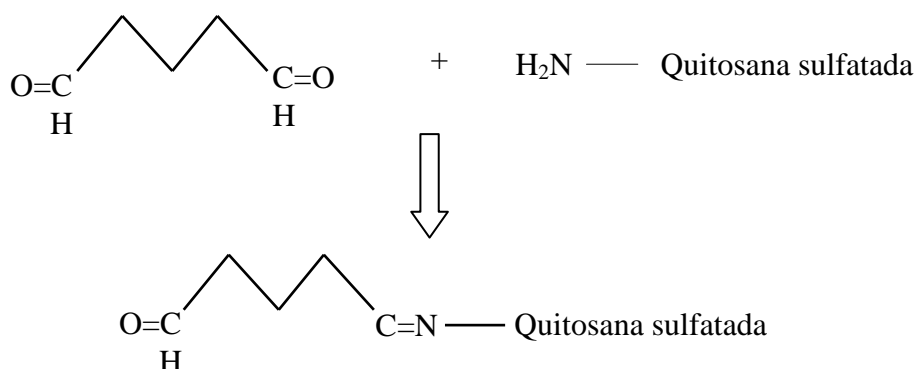
Fonte: Elaborada pela autora.

### ***Reticulação***

Devido à solubilidade do filme sulfatado em solução PBS nos ensaios de adsorção de proteínas e adesão plaquetária, realizou-se uma reticulação do filme de quitosana sulfatada para melhorar sua estabilidade em solução. Para tanto, foi utilizado como agente reticulante o glutaraldeído a 2,5%: Pedacos do filme pronto foram inseridos em uma solução de glutaraldeído 2,5%(v/v) por, aproximadamente, 1h. Após, foram lavados pelo menos três vezes com etanol para remover o excesso do agente, em seguida, lavou-se com água destilada e deixou-se secar a temperatura ambiente.

Segundo Costa Jr (2008) e Chang & Huang (2012), o mecanismo de reação do glutaraldeído consiste na interação de grupos aldeído com grupos aminos livres da quitosana sulfatada formando uma base de Schiff (C=N):

Esquema 3 – Reação do glutaraldeído com quitosana sulfatada.



Fonte: Elaborado pela autora

### 3.3 Caracterizações

#### 3.3.1 Análise elementar

A análise elementar dos filmes de quitosana natural e sulfatada foi aplicada para determinar a quantidade de enxofre (S) presente nas amostras. A partir dessa análise pode-se inferir se houve a reação de sulfatação nos filmes em estudo. A análise foi realizada na Universidade de Málaga, no Departamento de Química Inorgânica e Cristalografia da Faculdade de Ciências, através do Analizador Elemental LECO CHNS 932.

O grau de substituição (GS) foi calculado de acordo com Zhang, K.*et al.* (2010), a partir dos resultados obtidos na análise elementar:

$$\text{GS} = \frac{(\%S/32)}{(\%N/14)} \quad \text{Equação 1.}$$

#### 3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear

O grau de desacetilação (GD) dos polímeros e análise da estrutura polimérica sulfatada foi analisada através de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), realizada na EMBRAPA Agroindústria Tropical no Laboratório

Multiusuário de Química De Produtos Naturais (LMQPN). Utilizou-se o equipamento Agilent DD2 de 600 MHz e equipado com uma sonda OneProbe de 5 mm de diâmetro interno ( $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}/^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$ ) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”.

O GD foi calculado utilizando a integral do próton metil da unidade N-acetil-Glicosamina (GlicNAc) e o H1 da unidade N-Glicosamina (GlicN), segundo a fórmula proposta por Hirai *et al.* (1991):

$$\text{GD (\%)} = \left( \frac{\text{H1D}}{\text{H1D} + \text{HAc}/3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2.}$$

A quitosana natural foi preparada dissolvendo 10 mg em solução de 0,01 mL de ácido clorídrico (HCl) e 0,99 mL de água deuterada (D<sub>2</sub>O). Já a quitosana sulfatada foi dissolvida 10 mg em 1 mL de D<sub>2</sub>O. As soluções foram agitadas durante 24 h para completa homogeneização e filtradas para retirada de interferentes. Os espectros unidimensionais de  $^1\text{H}$  foram adquiridos com um tempo de espera entre cada aquisição de 20 s, tempo de aquisição de 3,3 s, ganho de 32, 32 transientes em uma janela espectral de 32k de número de pontos reais, a uma temperatura de 90°C. O espectro unidimensional de  $^{13}\text{C}$  foi obtido com um tempo de espera entre cada aquisição de 1s, aquisição de 32 k de transientes em uma janela espectral de 251,1 ppm e 32k de número de pontos. Para o processamento desses dados, os espectros foram referenciados com o padrão interno propionato de tetrametilsilil (TMSp-d4) em 0ppm; foram utilizados 32k de pontos, efetuando multiplicação exponencial (lb = 0,3 Hz) e correção manual de fase e linha de base.

### 3.3.3 Determinação da Massa Molecular

#### 3.3.3.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma das técnicas utilizadas para determinar a massa molecular e o índice de polidispersividade de polímeros. Relata-se na literatura que esta técnica não determina de forma absoluta a massa molecular média de polímeros sulfatados se o equipamento não for acoplado a um detector de espalhamento de luz com *laser* multi ângulo (MALLS), onde não é necessário o uso de padrão para calibrar a coluna. Quando outros detectores são utilizados, como o de índice refrativo, padrão com diferentes massas moleculares são requeridas (NETO *et al.*, 2011; PIRES *et al.*, 2013).

A quitosana em meio ácido se torna um polieletrólito, podendo ainda haver interação com a coluna. Devido a estas limitações, principalmente para polímeros sulfatados, utilizou-se da técnica de viscosimetria para determinar a massa molecular dessas amostras, e a massa molecular da quitosana natural e a degradação química ocorrida na QS em consequência da reação de sulfatação foi confirmada através da técnica de GPC.

Para tanto, utilizou-se um cromatógrafo líquido da marca Viscotek, equipado com um sistema de colunas composto por uma pré-coluna SB-G, uma coluna SB806M HQ e uma SB803 marca Shodex Pak e um detector refratométrico Viscotek. Os parâmetros utilizados foram: solução tampão aquosa de ácido acético 0,33M/ NaOH 0,1M como solvente e eluente, em fluxo de 0,22 mL/min, temperatura de 40°C, volume 100µL. Para a construção da curva padrão, relacionando massa molecular e volume de retenção, foram utilizados padrões de polietilenoglicol (PEG) da Malvern com os seguintes pesos moleculares: 498.000, 258.000, 170.200, 65.000, 10.250, 3.450 e 1.050 g/mol, na concentração de 2,00 mg/mL.

A preparação das amostras a serem injetadas foram feitas numa concentração de aproximadamente 0,5 mg/mL, em solução CHCOOH<sub>3</sub> / NaOH. Para garantir uma boa solubilização, as amostras foram deixadas em repouso durante 24 h. Antes da injeção, as amostras foram filtradas utilizando um filtro Millipore com diâmetro de 0,45µm.

### 3.3.3.2 Análise viscosimétrica

De forma a complementar a massa molecular das amostras obtidas por GPC, realizou-se a determinação da massa molecular média viscosimétrica.

Foram preparadas pelo menos quatro soluções diluídas de quitosana natural (variando entre 0, 01 e 0,075 g/ mL) e quitosana sulfatada (variando entre 0,02 e 0,08 g/ mL), concentrações essas adaptadas de acordo com o diâmetro do capilar utilizado. O solvente utilizado foi uma solução tampão de ácido acético e acetato de sódio (pH ~ 4.5). Alíquotas de 8 mL foram inseridas em capilar Cannon Fenske ( $\varnothing = 1.26$  mm) e transferido para viscosímetro SCOTT CT 52 sob banho termostático a 25°C  $\pm$  0,1 °C. Os tempos de escoamento para cada diluição foram determinados através do mesmo equipamento em intervalos de 2 min com seis repetições de lavagem para cada amostra e a média foi calculada e utilizada para obter a viscosidade específica de cada solução diluída de quitosana através da equação 3.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \quad \text{Equação 3.}$$

Onde,

$\eta$  = viscosidade da solução diluída,

$\eta_0$  = viscosidade do solvente puro.

A partir destes dados, foi calculado a viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) de acordo com a equação 4.

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad \text{Equação 4.}$$

Onde,

$\eta_{red}$  = viscosidade reduzida,

$\eta_{esp}$  = viscosidade específica,

C = concentração da solução diluída

Em posse destes dados, uma curva de concentrações (C) versus  $\eta_{esp}/C$  foi plotada e extrapolou-se os dados de  $\eta_{esp}/C$  para concentração zero, para obter a viscosidade intrínseca  $[\eta]$ . Por fim, utilizou-se da equação de Staudinger-Mark-Houwink (Equação 5) para calcular a massa molecular viscosimétrica dos polímeros (M).

$$[\eta] = K M_v^a \quad \text{Equação 5.}$$

Onde K e a são constantes específicas dos solventes utilizados, e foram adotados valores proposto por Rinaudo, Milas & Dung (1993): K = 0,074 e a = 0,76.

A determinação da massa molecular por viscosimetria dos polímeros em estudo foi realizada no Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais do Departamento de Química da UFC.

### ***3.3.4 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier com modo de Reflectância Total Atenuada (FTIR/ATR)***

Para avaliar os grupos funcionais das estruturas dos polímeros em estudo, de forma a confirmar a ocorrência da modificação química na quitosana, foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier com modo de Reflectância

Total Atenuada (FTIR-ATR). Equipamento espectrofotométrico de marca VERTEX 70 utilizando acessório Golden Gate Single Reflection Diamond ATR System foi usado para obter os espectros de infravermelho na região entre 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . O procedimento foi realizado no Laboratório de Espectroscopia Vibracional da Universidade de Málaga.

### ***3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrometria de energia dispersiva de raios-X (MEV/EDX)***

A morfologia das superfícies dos filmes foram observadas através de imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Juntamente com o MEV, foi obtido o mapa da distribuição de elementos constituintes dos filmes através da Espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDX) de forma a visualizar a homogeneidade da distribuição dos elementos, com foco no enxofre, nas amostras analisadas. Os filmes secos foram cobertos por uma fina camada de ouro (20 nm) usando um sistema de revestimento de alto vácuo marca Quorum Q1SOT ES e observados em um microscópio eletrônico de varredura Quanta-FEG FEI acoplado ao EDX, onde foram obtidos os mapas das amostras. Esta caracterização foi realizada na Central Analítica da UFC.

### ***3.3.6 Difração de Raio-X (DRX)***

Para verificar possível alteração na cristalinidade da quitosana depois da modificação química foram realizadas análises de DRX, utilizando Difratômetro de Raio-X marca Bruker, modelo D8 Advance Davinci. As análises foram conduzidas em ângulo  $2\theta$  com alcance entre 5-60° e velocidade de leitura de 1°/min. Foi usada radiação  $\text{CuK}\alpha$ ,  $\lambda = 0,1542$ , 40 kV, 40 mA. O procedimento foi realizado no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

### ***3.3.7 Análise Termogravimétrica (TGA)***

A análise termogravimétrica foi utilizada para a avaliação da estabilidade térmica dos filmes quando submetidos à variação de temperatura. A análise foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) em um equipamento Analisador térmico simultâneo STA 449F3 da marca Jupiter/Netzsch, a partir da temperatura ambiente até 700°C, em atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ), com fluxo de 50mL/min e taxa de aquecimento de 10°C / min e um gráfico do percentual de massa perdida em função da temperatura foi obtido. A massa da amostra utilizada foi de aproximadamente 14 mg.

### 3.4 Estudos da hemocompatibilidade

#### 3.4.1 Adsorção de proteínas

Filmes de quitosana sulfatada reticulada com 2,5% de glutaraldeído e quitosana natural com área de 1 cm<sup>2</sup> foram imersos em solução PBS pH 7.4 por 1h a 37°C em banho termostático com agitação suave para promover um equilíbrio de hidratação dos filmes antes de entrar em contato com as soluções proteicas. O PBS foi subtraído e 3 mL de cada uma das soluções BSA e fibrinogênio (1,0 mg/mL), preparadas em solução PBS (pH 7.4), foi adicionada e incubada a 37°C em banho termostático com agitação suave por 2 horas. As absorbâncias das soluções de fibrinogênio e BSA foram medidas utilizando um espectrofotômetro Biomate 3S em um comprimento de onda de 280 nm. A concentração das proteínas na solução foi calculada utilizando a curva padrão da proteína. A quantidade de proteína adsorvida nos filmes foi estimada através da seguinte fórmula (LIU *et al.*, 2004):

$$Q = [(C_0 - C_F) V] / A \quad (\text{Equação 6})$$

Onde, C<sub>0</sub> e C<sub>F</sub> são as concentrações das soluções de proteínas antes e depois da adsorção, respectivamente. V é o volume total da solução (mL) e A é a área do filme utilizado (cm<sup>2</sup>).

#### 3.4.2 Ensaio de adesão plaquetária

##### *Coleta de sangue*

Para o ensaio de adesão plaquetária utilizou-se de sangue coletado de voluntários saudáveis no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas – LACT/UFC, utilizando-se de instrumentos e técnicas apropriadas. O sangue foi coletado em tubos *Vacutainer*® de 4,5 mL, próprios para esta finalidade. Estes tubos contêm como agente anticoagulante uma solução de citrato de sódio 0,105 M/ 3,2%.

##### *Adesão plaquetária*

Para reduzir a interferência dos outros elementos do sangue, foi utilizado o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) para seguir com o ensaio de adesão plaquetária dos filmes em estudo. O procedimento utilizado foi conforme o utilizado por Xue *et al.* (2013), com algumas modificações. Para obter o PRP, o sangue foi centrifugado a 1000 rpm por 15 min a 25°C. O

sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para tubos Falcon. Os filmes foram previamente imersos em solução PBS e equilibrados a 37°C por 1h. Em seguida, o PBS foi subtraído e adicionado 2 mL de PRP para cada amostra, após foram conduzidas à incubação a 37°C em banho termostático com leve agitação durante 1h. O PRP foi removido e as amostras foram lavadas com PBS a pH 7.4 pelo menos três vezes para retirada das plaquetas não aderidas. As amostras foram feitas em duplicatas, sendo que duas (QN e QS6R) seguiram com procedimentos para a análise em MEV e as outras duas para a microscopia óptica (QN e QS6R).

### ***Microscopia Eletrônica de Varredura***

Após o ensaio de adesão e lavagem dos filmes com solução PBS, as plaquetas aderidas aos filmes de QN e QS6R foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 2,5% (glutaraldeído/PBS) durante 24h sob refrigeração. Ao final, as amostras foram lavadas com PBS e submetidas a um processo de secagem com uma série de trocas graduais de acetona/PBS (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100% v/v) com intervalos de 30 minutos cada. O ponto crítico de secagem foi realizado com Hexametildisilazano (HMDS). Os filmes secos foram cobertos por uma fina camada de ouro (20 nm) usando um sistema de revestimento de alto vácuo marca Quorum Q1SOT ES e observados em um microscópio eletrônico de varredura Quanta-FEG FEI, com aumento de 3000X operando a 10KV. Esta secagem crítica e análise foram realizadas na Central Analítica da UFC.

### ***Microscopia óptica***

Para a microscopia óptica, as plaquetas aderidas aos filmes de QN e QS6R foram fixadas com Karnovsky (1965) sem glutaraldeído (paraformaldeído 3%, em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2) por 2h em aproximadamente 1 mL do fixador. Em seguida, as amostras foram submetidas a desidratação em uma série etanólica de 70%, 80%, 90% e 100%, permanecendo 30 minutos em cada concentração. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma solução de pré-infiltração (álcool-parafina) por 24h a 4°C. Após, foram transferidas para uma solução de infiltração em parafina líquida por 24h a 4°C.

As amostras foram colocadas em moldes retangulares onde foi depositada uma solução 15:1 da solução de infiltração adicionada da resina endurecedora (Historesin Embedding Kit – Jung), para facilitar a etapa posterior de corte. O material foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 24h, sendo depois fixado em suportes de madeira por meio da

resina acrílica de auto polimerização. Após, os blocos de resina contendo o material foram cortados com 7 $\mu$ m de espessura em um micrótomo CUT 5062 *Slee Mainz*, e então distendidos em banho-maria a 60°C e transferidos para as lâminas.

As lâminas secas foram submetidas à coloração com hematoxilina (5 min) e eosina (30s) e esperou-se secar por 24h. As lâminas coradas foram então montadas adicionando uma ou duas gotas da resina sintética sendo, então, cobertos com as lamínulas. A visualização do material foi realizada ao microscópio Olympus BX 41, acoplado a uma câmera digital (UC30) e a um computador contendo o *software* “Cell B” para o registro fotográfico. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### ***3.4.3 Atividade anticoagulante***

O estudo da atividade anticoagulante é outro teste importante para se estudar a propriedade trombogênica de um material. Testes clássicos para tanto são os testes de tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) e o tempo de protrombina (TP), em que estudam a atividade de todos os fatores da fase intrínseca da coagulação, e a atividade da fase extrínseca, respectivamente (YANG *et al.*, 2013). Para este estudo, utilizou-se de kits de coagulação comerciais de TTPa e TP marca CLOT.

#### ***Preparação das amostras:***

As amostras foram preparadas em solução NaCl 0,9 % e 0.5% de ácido acético na concentração de 50, 100 e 200  $\mu$ g/mL. Deixou-se em repouso por 24 h para completa homogeneização das amostras. Após, a solução foi neutralizada com solução NaOH 2 M. Foi preparado como veículo a mesma solução seguindo os mesmos procedimentos com exceção das amostras.

Para realização dos testes, foi utilizado um “pool” de plasma humano citratado (0,9%) obtido a partir da centrifugação do sangue total a 3000 rpm durante 15 min. Como controle dos testes de TP e TTPa foi utilizada a heparina a 0,5UI/mL. Os ensaios foram realizados no Departamento de Farmácia/Centro de estudos Farmacêuticos e Cosméticos da Universidade Federal do Ceará.

### ***Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa)***

Para determinação do TTPa, o plasma foi incubado a 37 °C por 10 min com QN (50, 100 e 200 µg/mL), QS (50, 100 e 200 µg/mL) ou Veículo (NaCl) . Em seguida, uma alíquota de 50 µL do reagente cefalina ativada foi adicionada e os tubos foram incubados por mais 3 min. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de cloreto de cálcio 0,25 M e o tempo de coagulação, em segundos (s) foi registrado em coagulômetro.

### ***Tempo de Protrombina (TP)***

Para determinação do TP, o plasma foi incubado a 37 °C por 10 min com QN (50, 100 e 200 µg/mL), QS (50, 100 e 200 µg/mL) ou veículo (NaCl). Em seguida foi adicionado o reagente (tromboplastina, 100 µL) disparando a cascata de coagulação através do complexo protrombínico e o tempo em segundos foi aferido em um coagulômetro.

### ***3.4.4 Citotoxicidade in vitro (LDH)***

A citotoxicidade ocasiona a lise de células. Seu estudo pode ser avaliado através dos danos ocasionados às membranas celulares utilizando-se das enzimas liberadas, tal como a enzima lactato desidrogenase (LHD). Esta enzima intracelular tem a habilidade de converter piruvato em lactato, na presença de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Hidreto) (COSTA NETO, 2014), desta forma, pode-se fazer uma correlação da quantidade de LDH liberada e determinar a citotoxicidade. Este método avalia a integridade da membrana celular, no entanto, existem outros métodos para avaliação da citotoxicidade, como através da atividade metabólica da célula (teste do MTT).

Assim, avaliou-se o efeito da citotoxicidade da quitosana natural e sulfatada através da atividade da enzima Lactato desidrogenase (LHD) sobre os neutrófilos humanos. Os ensaios foram realizados no Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

### ***Preparação das amostras:***

As amostras foram preparadas em solução 0,5 % de ácido acético na concentração de 1 mg/ mL. Deixou-se em repouso por 24 h para completa homogeneização das amostras. Após, a solução foi neutralizada com solução NaOH 2 M. Foi preparado como veículo a mesma solução seguindo os mesmos procedimentos com exceção das amostras.

### ***Ensaio da atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH) em neutrófilos humano***

Neutrófilos ( $2,5 \times 10^6$  células/mL) foram incubados por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  com quitosana natural (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), quitosana sulfatada (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), Hanks (células não tratadas), solução 0.5% ácido acético neutralizado com NaOH 2M (controle negativo) e Triton X-100 (0.2%, controle positivo). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $800 \times g$ , por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos de ensaio em triplicata para cada amostra mantendo-se a refrigeração em banho de gelo para a determinação da atividade da enzima LDH. O ensaio foi realizado utilizando o Kit LDH (*Liquiform*<sup>®</sup>) e baseou-se na medida do decréscimo da absorvância em 340nm devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra. Alíquotas de 300 $\mu\text{L}$  de substrato (NADH) foram pré-incubados por 3 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra, homogeneizou-se a mistura e realizou-se a leitura da absorvância em 340 nm nos tempos 1 e 3 minutos em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada de acordo com a fórmula proposta pelo fabricante do reagente:

$$A = [(A1 - A2) / 2] \times 1746.03 \quad \text{Equação 7}$$

Onde,

A= atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A1= absorvância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A2= absorvância final (3 minutos) em 340 nm;

1746.03= fator de cálculo determinado pelo fabricante para o volume de amostra de 25  $\mu\text{L}$ .

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterizações**

#### ***4.1.1 Análise elementar***

A análise elementar foi realizada para verificar a composição dos elementos: Carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) e Enxofre (S) presentes nas estruturas poliméricas em estudo. O conteúdo de S presente na cadeia de quitosana sulfatada foi analisado para verificar se aconteceu a incorporação na cadeia polimérica. A partir dos resultados da Análise Elementar (TABELA 3), o grau de substituição (GS) foi calculado de acordo com Zhang, K. *et al.* (2010):  $GS = (\%S/32) / (\%N/14)$ .

Neste estudo, pode-se perceber que diferentes concentrações de ácido empregado nas mesmas condições de reação resultaram em diferentes GS (TABELA 3), não seguindo um aumento gradual do GS com o aumento gradual da concentração de ácido. As condições de reação, como: tempo, temperatura e concentração do ácido, são importantes parâmetros para o sucesso da modificação. Alterações nestes parâmetros afetam a forma com que a reação ocorre, reduzindo ou aumentando o GS. Uma adequada preparação do gel de quitosana para ser submetida a reação também se torna importante, pois a maior área de contato do gel com o complexo sulfatante favorece a uma reação mais efetiva. Preparações não uniformes do gel de quitosana para cada amostra podem ter acontecido e acarretado nesses resultados, não seguindo um aumento gradual de acordo com o aumento gradual da concentração de ácido.

Segundo Carreón *et al.* (2010), uma quantidade ótima de ácido precisa ser adicionada a reação para alcançar o maior grau de substituição, onde um excesso de ácido pode limitar a substituição e causar uma degradação parcial do polímero. Em seus estudos, observaram que depois de certo aumento na quantidade de ácido, o GS foi reduzido.

Neste estudo, a quantidade ótima encontrada para as condições empregadas foi de 6 mL de ácido clorossulfônico, em que se obteve maior porcentagem de S na composição da quitosana sulfatada, com 12,91% e um grau de substituição (GS) de 1.37, mostrando-se como o que mais sofreu modificação química nas condições empregadas.

TABELA 3- Análise elementar dos filmes de QN, QS2, QS4, QS6 e QS8. GS: Grau de substituição.

<b>Amostras</b>	<b>% C</b>	<b>% H</b>	<b>% N</b>	<b>% S</b>	<b>GS</b>
<b>QN</b>	38.52	7.44	7.14	0.06	-
<b>QS2</b>	37.22	7.43	7.06	2.17	0.13
<b>QS4</b>	38.98	7.04	7.26	0.42	0.02
<b>QS6</b>	21.62	4.53	4.13	12.91	1.37
<b>QS8</b>	37.41	7.19	7.05	1.16	0.07

Fonte: Elaborada pela autora.

Lima *et al.* (2013) sulfataram quitosana utilizando o sal sódico 5-formil-2-furano ácido sulfônico (FFSA) e obtiveram uma quitosana sulfatada com GS de 0.32. Já Pires *et al.* (2013) sulfataram a quitosana utilizando ácido clorossulfônico como agente sulfatante, e obtiveram quitosanas sulfatadas com GS de 0.67 (Quitosana-S2) e 0.87 (Quitosana-S1). Zhang K. *et al.* (2010) sulfataram a quitosana sob condições homogêneas utilizando também ácido clorossulfônico como agente sulfatante, variando os parâmetros tempo e temperatura de

reação (T.A-50°C, 3-7.5h), onde obtiveram quitosanas sulfatadas com GS variando de 1.13 a 1.67.

#### ***4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com modo de Reflectância Total Atenuada (FTIR/ATR)***

Para verificar o sucesso da modificação química dos filmes produzidos, foi realizado análise em espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR). Foram observados os grupos funcionais presentes na cadeia de quitosana antes e depois das modificações realizadas.

Os espectros de infravermelho obtidos para os filmes de quitosana natural e os filmes de quitosanas modificadas podem ser observados na Figura 10. A Figura 10 (QN) mostra o espectro característico da estrutura de quitosana, com uma vibração a  $1654\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde ao estiramento da amida C=O (amida I), uma banda de deformação da amina primária N-H (amida II) a  $1590\text{ cm}^{-1}$ , uma vibração a  $1370\text{ cm}^{-1}$  da ligação C-H associado ao grupo acetamida (amida III), estiramento assimétrico C-O-C a  $1145\text{ cm}^{-1}$  e, em  $1029\text{ cm}^{-1}$  e  $1049\text{ cm}^{-1}$  correspondendo ao estiramento C-O da hidroxila primária e secundária (LV *et al.*, 2013). As bandas na região de  $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  são referentes às vibrações dos estiramentos N-H e O-H. Nos filmes QS2 e QS6 pode-se verificar que houve o aparecimento de novos picos referentes às vibrações das bandas referentes ao grupo sulfato ( $\text{RSO}_4^{2-}$ ) em  $1206\text{ cm}^{-1}$  (S=O) e a vibração referente ao estiramento C-O-S em  $794\text{ cm}^{-1}$ , indicando o sucesso da modificação nesses dois filmes. Para os demais filmes, não observou-se as vibrações características deste grupo, o que pode indicar que não houve uma introdução significativa do grupo  $\text{SO}_4^{2-}$  na cadeia de quitosana dessas amostras, justificada pela quantidade mínima de S visto através da análise elementar.

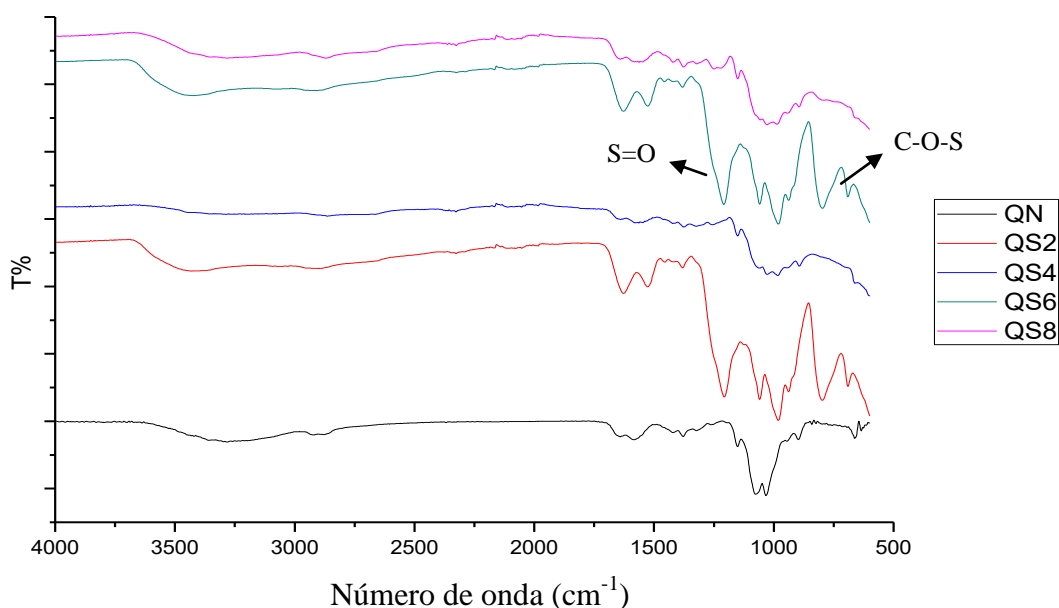
Observou-se ainda que, houve um deslocamento dos espectros referentes ao grupo amida I e II ( $1654$  e  $1590\text{ cm}^{-1}$ ) nos espectros dos filmes QS2 e QS6 para  $1625$  e  $1524\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, o que sugere uma substituição do grupo sulfato no grupo amina da cadeia polimérica. Tsai *et al.* (2010) observaram em seus estudos diferenças na absorbância da amida I ( $1638\text{ cm}^{-1}$ ) e II ( $1560\text{ cm}^{-1}$ ) após a modificação da quitosana para  $1560\text{ cm}^{-1}$  e  $1532\text{ cm}^{-1}$ , indicando como a reação envolvendo o grupo amino da quitosana e grupos amino para formar grupos amidas secundários. Uma mudança na região  $3200\text{ cm}^{-1}$  no espectro também foi observada para estes dois filmes, sugerindo uma redução dos grupos aminos disponíveis. Pires

*et al.* (2013) também observaram diferença na região  $3200\text{ cm}^{-1}$  entre os dois tipos de quitosana sulfatada estudadas, indicando substituição no grupo amino. A modificação no espectro referente às hidroxilas primária e secundária nos filmes de QS2 e QS6 com o deslocamento das vibrações pode sugerir que houve substituição também do grupo sulfato na hidroxila, sendo a hidroxila primária mais reativa que a secundária, uma vez que esta última é menos reativa e mais estericamente impedida. Os resultados de RMN<sup>13</sup>C definem com maior precisão a posição de substituição do grupo sulfato na cadeia de quitosana e são mostrados no item que segue.

A introdução de grupos sulfatos na cadeia de quitosana pode afetar suas propriedades químicas, físicas e biológicas. No caso da propriedade química, a presença de grupos sulfatos na cadeia de quitosana a torna hidrofílica, e dependendo do grau de substituição desses grupos na cadeia, sua solubilidade pode aumentar ou reduzir (JAYAKUMAR *et al.*, 2007; YEH & LIN, 2012; SUBHAPRADHA *et al.*, 2013a).

Diante dos resultados apresentados pela Análise Elementar e FTIR-ATR, o filme que indicou maior modificação com grupos  $\text{SO}_4^{2-}$  incorporado e maior GS (1.37) foi o QS6, sugerindo ter maior carga superficial negativa, o que reduz a adsorção de proteínas e a consequente adesão de plaquetas, levando a redução da trombogenicidade da quitosana. Desta forma, selecionou-se a amostra QS6 para prosseguir com as caracterizações e ensaios futuros.

FIGURA 10 – FTIR-ATR dos filmes de quitosana natural (QN), quitosana sulfatada com 2mL (QS2), 4mL (QS4), 6mL (QS6) e 8 mL (QS8) de ácido clorossulfônico.



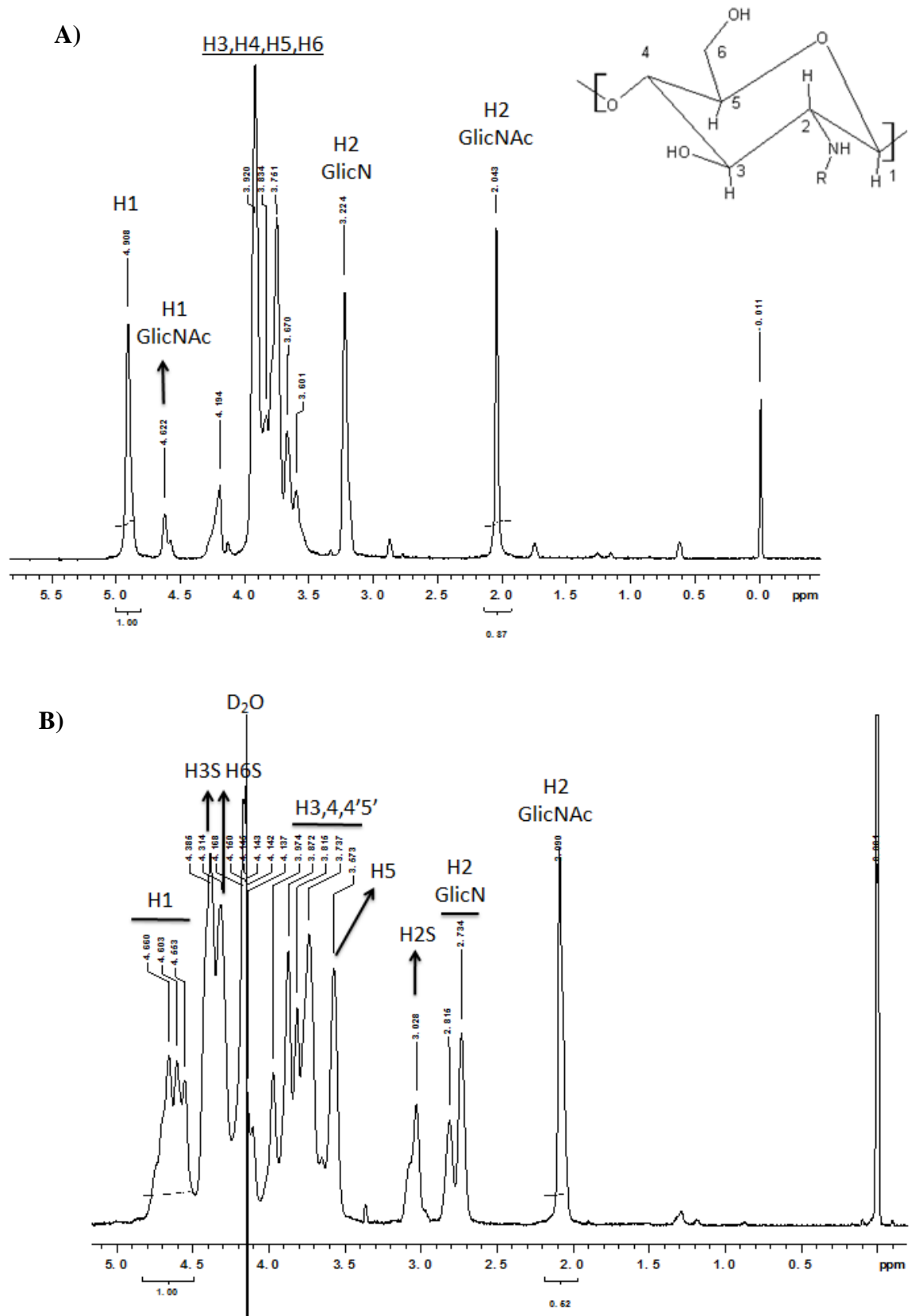
Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

#### 4.1.3.1 Determinação do Grau de desacetilação por Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN<sup>1</sup>H)

O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade importante a ser determinada no estudo de polímeros biomédicos, uma vez que este implica nas características físicas, químicas e biológicas do material, o que vai diferenciar sua aplicação dentro da área biomédica (GONSALVES *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2014). A análise de RMN<sup>1</sup>H tem sido bastante utilizada para determinar o grau de desacetilação da quitosana devido a sua precisão (ZHANG, K. *et al.*, 2010; MNATSAKANYAN *et al.*, 2013, PEREIRA *et al.*, 2015), fornecendo ainda informações sobre a distribuição dos prótons na cadeia de quitosana, assim como as diferentes posições (ZHANG, K. *et al.*, 2010). Tem-se encontrado na literatura estudos também das substituições do grupo sulfato na cadeia de quitosana sulfatada por RMN<sup>1</sup>H (VONGCHAN *et al.*, 2002; SUWAN *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012; SUBHAPRADHA *et al.*, 2013a). Utilizou-se desta técnica para estudar as estruturas dos filmes produzidos e o GD foi calculado de acordo com a Equação 2.

O GD obtido para a quitosana natural foi de 77%. Comparando os dois espectros de RMN<sup>1</sup>H obtidos para a quitosana natural e quitosana sulfatada (FIGURA 11), percebe-se uma clara alteração na estrutura dos espectros, o que confirma mais uma vez uma modificação química da quitosana. Na Fig. 11A, observa-se os espectros característicos da QN, onde o sinal em 4.9 ppm corresponde ao próton H1 da unidade GlicN e em 4.6 ppm ao H1 da unidade GlicNAc. Os sinais entre 3.6 a 3.9 ppm estão relacionados aos prótons H3 a H6. Em 3.2 ppm tem-se o sinal do H2 da unidade GlicN e em 2.0 ppm o sinal referente aos três átomos de H do grupo metil da unidade GlicNAc. Estes resultados encontrados estão de acordo com os apresentados na literatura (HIRAI *et al.*, 1991, HOLME & PERLIN, 1997; VONGCHAN *et al.*, 2002; SHELMA & SHARMA, 2011, PEREIRA *et al.*, 2015).

FIGURA 11 – Espectros de RMN<sup>1</sup>H da QN (A) e QS6 (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 11B mostra os espectros obtidos para a quitosana sulfatada. Pode-se observar que houve mudança nos sinais mostrados quando comparado ao polímero de origem, isso pode ser explicado pela introdução do grupo sulfato na cadeia que causou deslocamentos dos prótons. Segundo Zhang, K. *et al.* (2010) em seus estudos sobre a caracterização da quitosana sulfatada (CHS8, GS=1.29) por RMN<sup>1</sup>H, os prótons do carbono 6 referentes ao grupo hidroxila primária que foram completamente sulfatados exibiram sinal em 4.28 ppm. Já os prótons sem substituição exibiram sinais entre 3.75 e 4.0 ppm. Este sinal foi adjacente para o sinal de H5', que foi deslocado de 3.59 ppm (sinal atribuído ao H5) para a esta região devido a sulfatação na posição H6. Já Vongchan *et al.* (2002), também estudaram as substituições do grupo sulfato através do RMN<sup>1</sup>H na quitosana sulfatada (GS 2.13), onde atribuíram o sinal em 4 ppm referente ao H6 sulfatado e em 4.6 ppm ao H3 sulfatado. Holme & Perlin (1997), também sulfataram a quitosana e caracterizaram por RMN<sup>1</sup>H, atribuindo aos sinais 3.15 ppm e 2.74 ppm aos prótons H2 sulfatado e H2 da GlicN, respectivamente.

Com base nesses resultados da literatura, pode-se sugerir para os espectros da quitosana sulfatada do presente estudo (FIGURA 11B) que houve uma sulfatação no H6 do grupo hidroxila primária, com sinal em 4.31 ppm e no H3 referente a hidroxila secundária em 4.38 ppm. O sinal 3.57 foi atribuído ao H5, que foi deslocado devido a sulfatação no H6. Os sinais a 3.02 ppm e 2.73-2.81 ppm sugerem atribuição aos prótons H2 sulfatado e H2 da GlicN, respectivamente. A redução da intensidade do sinal correspondente ao H2 da unidade GlicN no espectro da quitosana sulfatada, comparado a quitosana de origem, pode reforçar o indício da substituição do grupo sulfato no grupo amino da unidade glicosídica, indicando a redução de grupos aminos livres. Segundo a literatura, o estudo desses sinais pode sugerir onde aconteceu uma possível substituição do grupo sulfato na cadeia polimérica, no entanto a localização com maior grau de confiabilidade pode ser dado pela análise de RMN<sup>13</sup>C.

#### 4.1.3.2 Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C

Espectros de RMN<sup>13</sup>C também foram realizados para estudar a estrutura dos polímeros e confirmar as posições de substituição do grupo sulfato na estrutura de quitosana modificada, uma vez que sua posição influencia na atividade anticoagulante do polímero sulfatado.

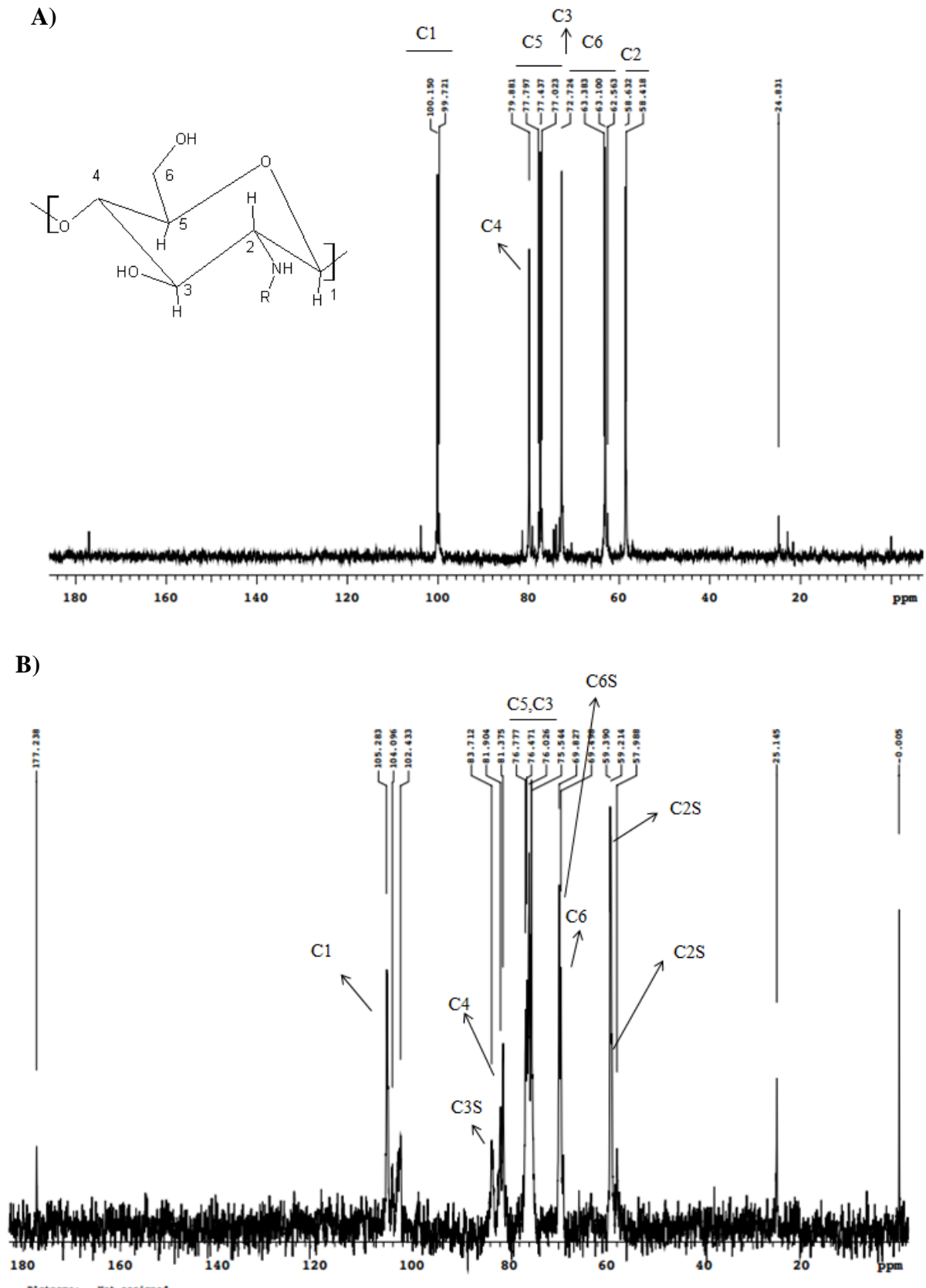
Os espectros para a QN e QS6 estão apresentados na Figura 12. Espectros com sinais característicos da quitosana natural (FIGURA 12A) foram obtidos e a sua distribuição pode ser vista na Tabela 4. Estes resultados foram similares ao encontrado por Gamzazade *et al.*

(1997) e Suwan *et al.* (2009) e confirmam as distribuições dos prótons feitos na análise de RMN<sup>1</sup>H.

Os espectros da quitosana sulfatada podem ser vistos na Figura 12B. Holme & Perlin (1997) atribuíram o sinal em 63.5 ppm ao C2 sulfatado, resultado esse próximo ao obtido neste estudo. Gamzazade *et al.* (1997), atribuíram o sinal em 59 ppm ao C2 sulfatado e observaram que o sinal em 98-99 ppm, atribuído ao C1, desapareceu, onde sugeriu que houve completa substituição no grupo amino. Observaram ainda substituição no C6 de suas amostras sulfatadas (SC1, 2 e 3), atribuindo a elas sinal entre 68.2 a 68.4 ppm.

Assim, através do espectro obtido para a quitosana sulfatada, observou-se sinal obtido em 57.9 ppm e em 59.2-59.3 ppm que foram atribuídos ao C2S e C2, respectivamente, indicando substituição parcial e pode-se observar que houve uma redução significativa no sinal referente ao C1 em 99-100, confirmando uma substituição do grupo sulfato no grupo amino livre da quitosana, como discutido anteriormente no RMN<sup>1</sup>H. O indício de sulfatação no C6 da quitosana modificada obtido no RMN<sup>1</sup>H também pode ser confirmado através do RMN<sup>13</sup>C, onde verificou-se sinal referente a sua substituição no C6 em 69.8 ppm, resultados condizentes ao encontrado na literatura (GAMZAZADE *et al.*, 1997; YUAN *et al.* 2009; ZHANG, *et al.*, 2011; PIRES *et al.*, 2013), percebendo sinal ainda a 69.4 ppm referente ao C6 não substituído, sendo também parcialmente substituído. A substituição no C3 também foi observado atribuído ao sinal em 83.7 ppm, onde foi parcialmente substituído. Percebeu-se que as hidroxilas primárias foram favoravelmente substituídas, isso se deve a este grupo ter a sua posição mais desprotegida na molécula, com relação ao grupo amino, sendo os primeiros a serem atacados por grupos sulfatos.

Com isso, a reação de sulfatação realizada neste estudo resultou em uma quitosana parcialmente 2,N-3,6,O-sulfatada. A substituição no grupo amino se torna requerida quando se quer obter uma propriedade anticoagulante do polímero, uma vez que o grupo amino reativo da quitosana é bloqueado, gerando carga negativa com o novo grupo funcional, o que aumenta a repulsão eletrostática entre proteínas do plasma reduzindo a adsorção na superfície do material e conseqüente formação de trombos. Neste caso da quitosana tri-sulfatada, favorecerá a uma maior carga eletronegativa, causando maior repulsão eletrostática.

FIGURA 12 – Espectros de RMN<sup>13</sup>C da QN (A) e QS6 (B).

FONTE: Elaborado pela autora.

TABELA 4– Deslocamentos químicos do  $^{13}\text{C}$  para QN e QS6 em ppm.

	QUITOSANA	QS6	C2S <sup>a</sup>	C36S <sup>b</sup>	C236S <sup>c</sup>
C1	99-100	105	105	98.1	96.5
C2	58.4	59.2-59.3	-	56.7	55.6
C2-S	-	57.9	63.5	-	55.2
C3	77-77.7	76-76.4	76.5	-	70.5
C3-S	-	83.7	-	77.3	75.6
C4	79.8	81.3-81.9	82	75.1	73.1
C5	72.7	76.7	78	74.3	72.7
C6	62.5-63.3	69.4	64	-	66.6
C6-S	-	69.8	-	68.2	66.6

<sup>a</sup>Quitosana N-sulfatada, Holme &Perlin (1997).

<sup>b</sup>Quitosana 3,6-disulfatada (SC-1), Gamzazade *et al.* (1997).

<sup>c</sup>Quitosana 2,3,6-sulfatada, Suwan *et al.* (2009).

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.4 Determinação da Massa Molecular

A massa molecular compreende um importante parâmetro no uso da quitosana em biomateriais, assim como o seu grau de desacetilação (GD). A massa molecular da quitosana é bastante variável, assim como seu GD, dependendo diretamente da origem da matéria-prima e do seu processamento. A quitosana sulfatada de baixa massa molecular é reportada na literatura ter tendência a uma melhor atividade anticoagulante (VIKHOREVA *et al.*, 2005), isso pode ser atribuído a sua maior similaridade à heparina, um anticoagulante natural do sangue, que possui baixa massa molecular (5000-25.000 Da) e é naturalmente sulfatada. Assim, a influência da massa molecular e grau de substituição em polissacarídeos sulfatados na sua atividade biológica são comumente relatados em trabalhos científicos envolvendo propriedades anticoagulantes (XING *et al.*, 2005).

O uso do GPC para determinar a massa molecular de quitosana é bastante comum, no entanto tem-se discutido o efeito da natureza química dos padrões que são utilizados para a calibração na determinação da massa molecular. No caso da quitosana, melhores resultados seriam obtidos utilizando quitosana como padrão, porém ainda não existe amostra comercial para este padrão (CANELLA & GARCIA, 2001). A viscosimetria é uma técnica simples também muito empregada na determinação da massa molar, em que não é preciso o uso de um

padrão. Neste caso, a massa molar é encontrada através da viscosidade intrínseca e constantes de Staudinger-Mark-Houwink (Equação 5).

Quitosana na faixa de 50.000 a 190.000 Da é considerada de baixa massa molecular pela literatura (HOU *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2014; OZ *et al.*, 2016). Desta forma, de acordo com os resultados obtidos pela viscosimetria, a quitosana natural trabalhada neste estudo e utilizada para a sulfatação foi de baixa massa molecular, com 78.093 Da, assim como seu derivado sulfatado, com 5.050 Da. Por GPC, a massa molecular da quitosana natural foi de 84.177 Da, não estando distante do valor encontrado pela viscosimetria, já que são duas técnicas diferentes. No estudo de Vikhoreva *et al.* (2005), em que sulfataram quitosana de baixa massa molecular, obtiveram uma quitosana sulfatada com massa molecular numa faixa de 9.000-35.000 Da.

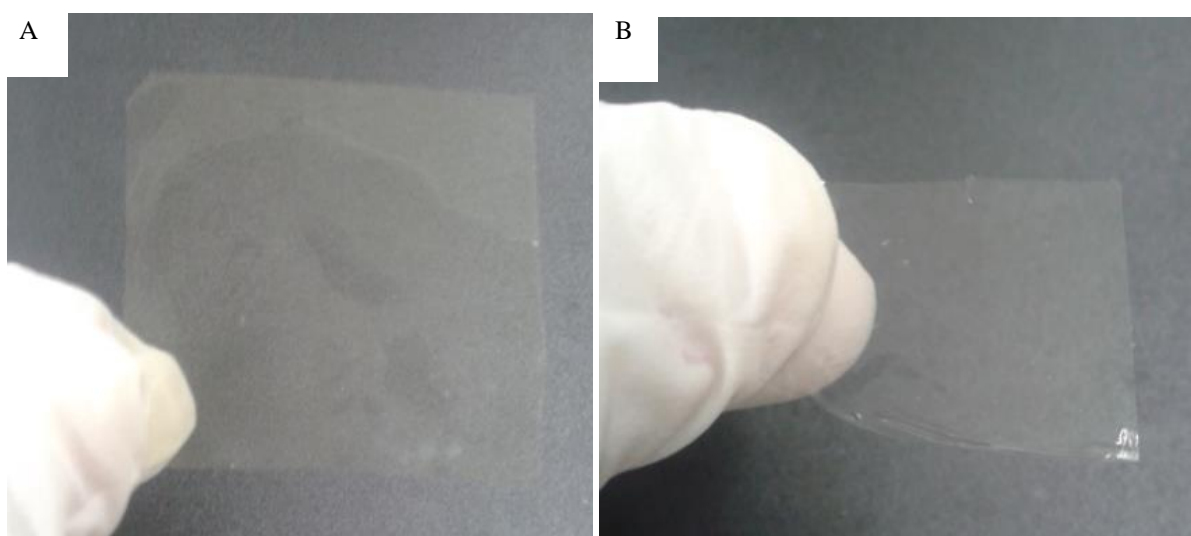
A baixa massa molecular da quitosana sulfatada obtida indica que houve uma degradação da cadeia polimérica durante o processo de sulfatação, afetando propriedades como a massa molecular, viscosidade e grau de desacetilação. A reação de sulfatação pode ocasionar essa degradação do polímero dependendo das condições em que são realizadas. O tempo de reação e temperatura são os fatores de maior importância para a degradação da cadeia polimérica (XING *et al.*, 2005; PIRES *et al.*, 2013). Vários pesquisadores observaram esse efeito na cadeia de quitosana após o processo de sulfatação que foram realizados em suas amostras estudadas (VIKHOREVA *et al.*, 2005; XING *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2013; PIRES *et al.*, 2013). No caso do presente estudo, temperatura de 40°C foi utilizada e um tempo de 5 h, o que pode sugerir que este tempo de reação em meio ácido pode ter levado a uma degradação polimérica por hidrólise ácida, no entanto, este resultado foi um produto desejável de baixa massa molecular, uma vez que obteve-se uma massa molecular próxima ao da heparina.

Como a reação de sulfatação introduz grupos sulfatos ( $-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ ) à cadeia de quitosana, espera-se um aumento na massa molecular e no seu volume hidrodinâmico caso não aconteça degradação da cadeia polimérica, esperando-se uma redução do seu volume de eluição em relação à quitosana natural, devido a esse aumento de massa molecular e a repulsão entre cargas negativas da molécula (CANELLA & GARCIA, 2001). Observou-se através da técnica de GPC, que o  $V_e$  da QS6 (24,44 mL) foi maior que o da QN (16,96 mL), com isso, pode-se confirmar a degradação polimérica, ou despolimerização do polímero sulfatado.

#### 4.1.5 Aspecto visual dos filmes

A Figura 13 mostra o aspecto visual dos filmes de quitosana natural e sulfatado. O filme de quitosana natural apresentou-se com um aspecto visual liso e translúcido. O filme QS6 apresentou-se com uma aparência lisa, translúcida e mais fina, já quando reticulada com glutaraldeído, ficou com um aspecto amarelado em função da formação da base de *Schiff* (C=N) com os grupos amino livres da quitosana (COSTA JR., 2008).

FIGURA 13- Aspecto visual dos filmes de QN (A) e QS6 (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura com espectrometria de Energia Dispersiva de raios-X (MEV/EDX)

Através das micrografias obtidas por MEV (FIGURA 14), observou-se superfícies lisas e sem porosidades para os filmes analisados. Características essas importantes de superfícies voltadas para uso em biomateriais de contato com o sangue, uma vez que a rugosidade da superfície implica na maior facilidade de adsorção de proteínas e elementos do sangue na superfície do material quando em contato com o fluxo sanguíneo. Já quando o material é poroso, se torna propenso ao intumescimento, facilitando o acúmulo de elementos do sangue nos seus poros e conseqüente formação de trombos no local.

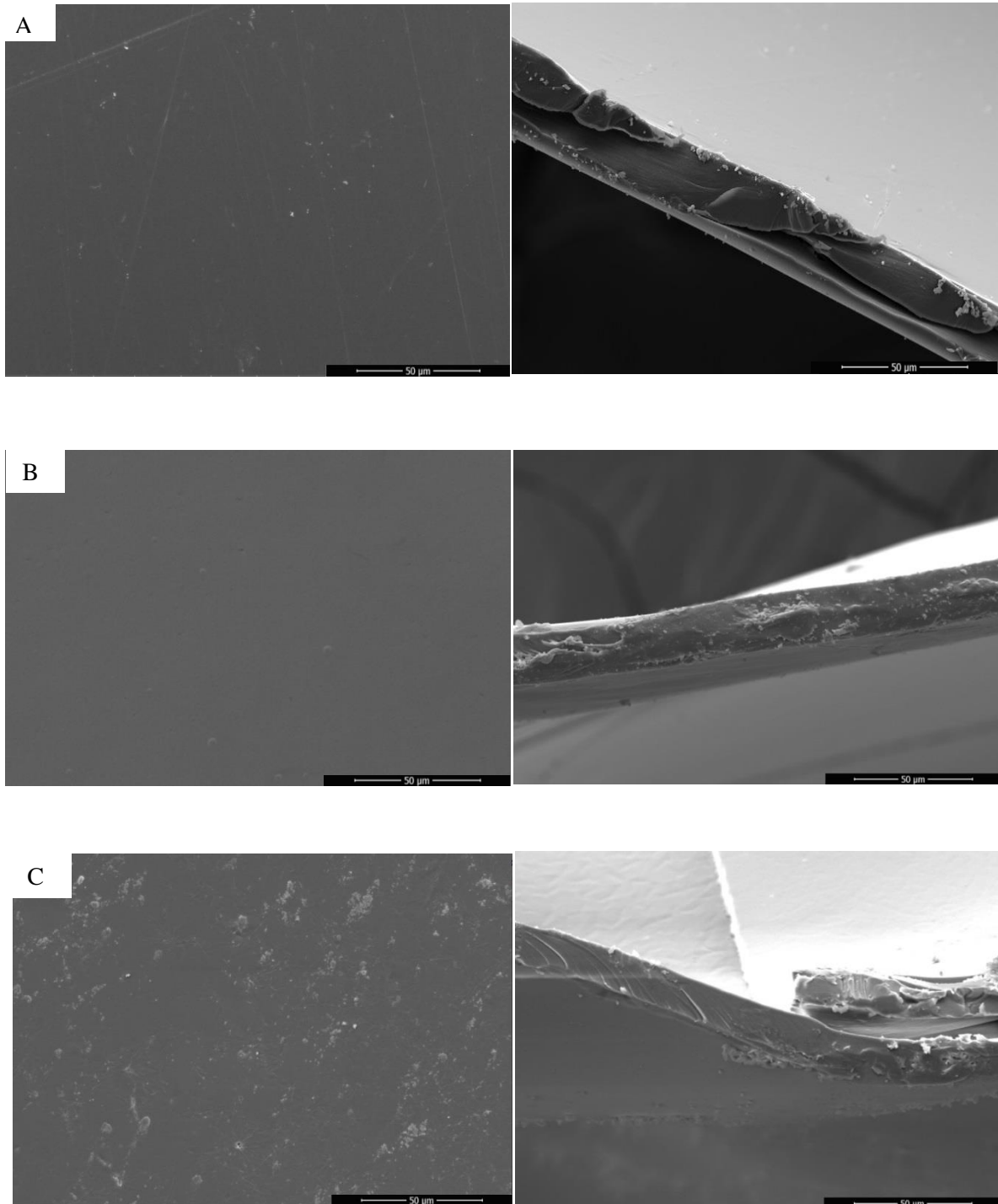
Através do EDX, obtiveram-se os mapas dos espectros dos elementos químicos presentes na cadeia polimérica de quitosana (C, O e N) e quitosana sulfatada (C, O, N e S)

que complementam os resultados obtidos na análise elementar. Na Figura 15A, pode-se observar os espectros para o filme de QN. Percebe-se a ausência do S em sua estrutura, isso porque, como já esperado, a quitosana não possui este elemento de forma natural em sua cadeia. A presença do Au foi devido à técnica de metalização realizado no material para visualização em MEV em todas as amostras analisadas. A homogeneidade da distribuição desses elementos na superfície pode ser visto através da Figura 15B.

A Figura 16A apresenta os espectros obtidos para a QS6. Neste caso observou-se o surgimento do S na composição do filme, assim como do Na, produto este da reação de sulfatação realizada ( $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ ), assim, reforçando o sucesso da sulfatação da quitosana analisada antes por análise elementar e FTIR. Na Figura 16B observou-se a homogeneidade da distribuição dos elementos no filme sulfatado.

Foi realizado ainda o EDX do filme reticulado com glutaraldeído para verificar se ocorreu alguma alteração nos principais elementos presentes na cadeia sulfatada, o resultado pode ser visto na Figura 17A. Observou-se nenhuma alteração nos elementos do polímeros, onde o elemento de maior interesse (S) também continua presente. Desta forma, a reticulação não afetou os grupos sulfatos de interesse, assim como esperado, e aumentou a estabilidade dos filmes em solução. A distribuição dos elementos foram homogêneos (FIGURA 17B).

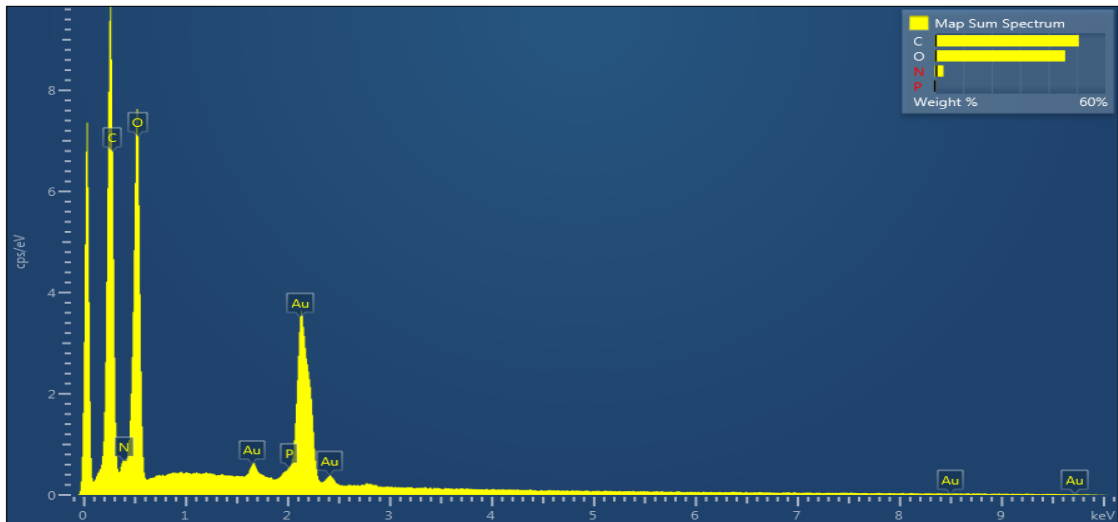
FIGURA 14 – Micrografias horizontal e transversal por MEV dos filmes de QN (A), QS6 (B) e QS6 reticulada com glutaraldeído 2,5% (C) com aumento de 1000X, barra de 50µm.



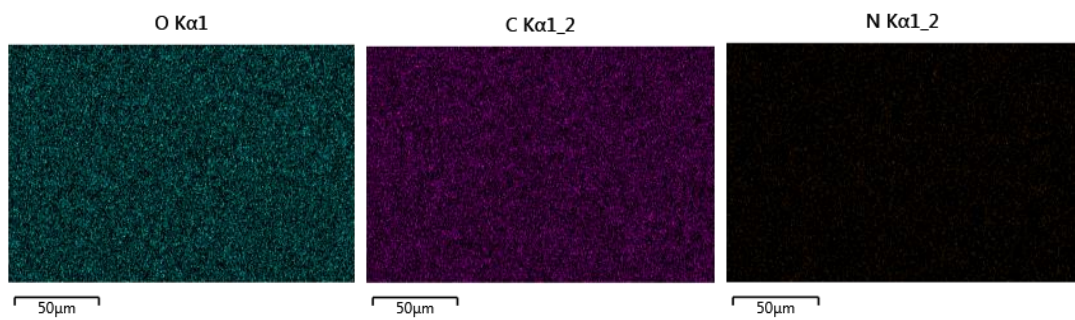
Fonte: Elaborada pela autora.

FIGURA 15– EDX do filme de QN (A) e distribuição dos elementos (B).

A)



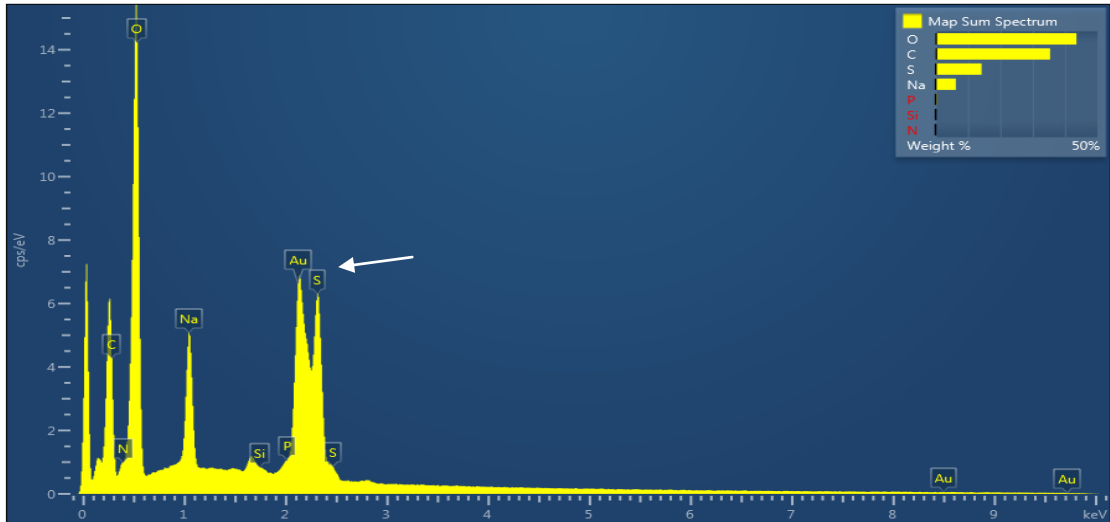
B)



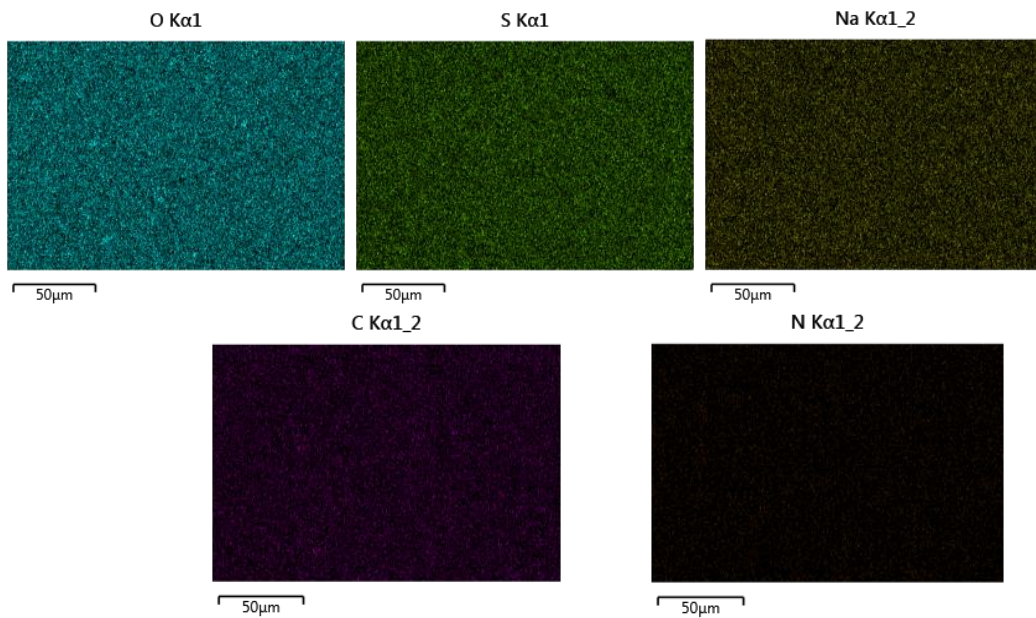
Fonte: Elaborada pela autora.

FIGURA 16 – EDX do filme de QS6 (A) e distribuição dos elementos (B).

A)



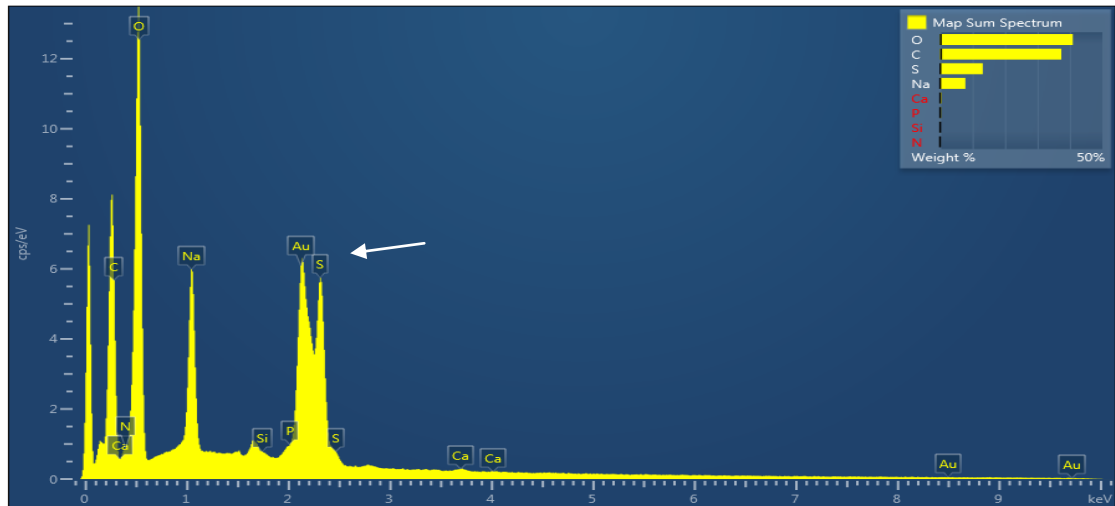
B)



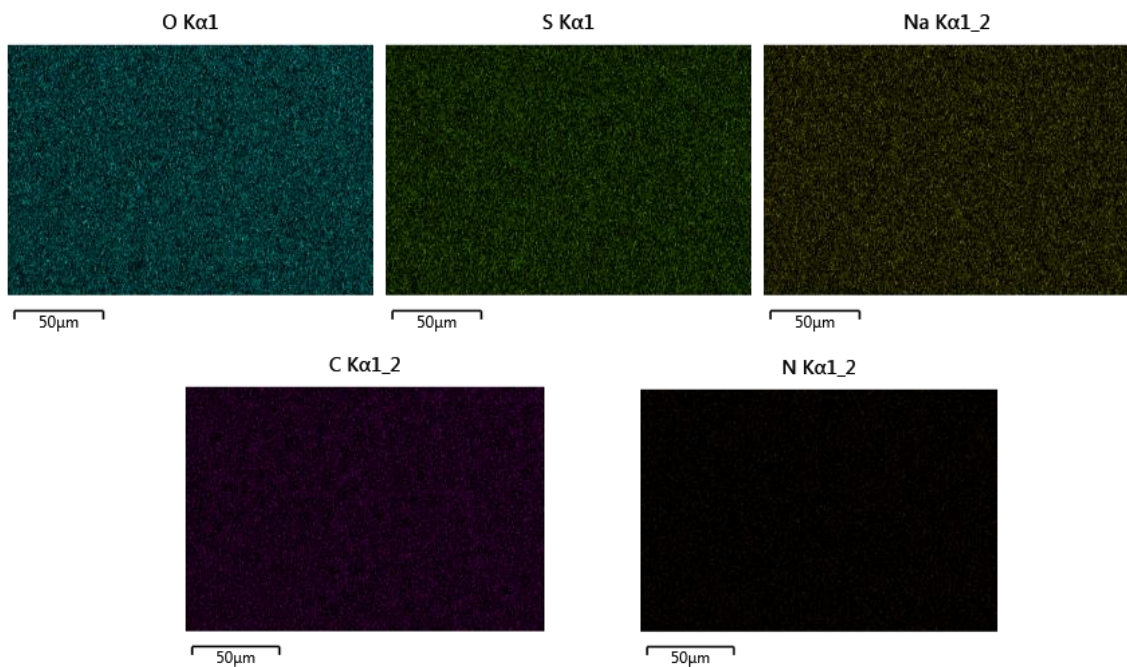
Fonte: Elaborada pela autora.

FIGURA 17 – EDX do filme de QS6 reticulado com 2,5% de glutaraldeído (A) e distribuição dos elementos (B).

A)



B)



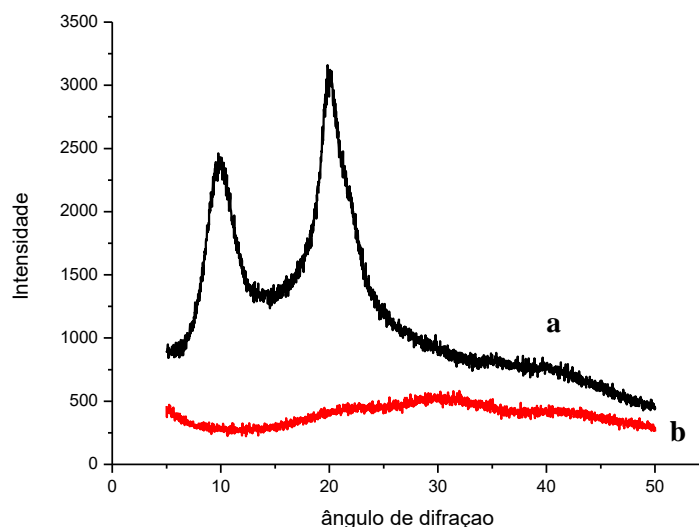
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.7 Difração de Raio-X (DRX)

A técnica de difração de raios-X é importante no estudo da identificação de domínios cristalinos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos. Os difratogramas fornecem características específicas de substâncias cristalinas através dos planos de difração e suas distâncias interplanares (SILVA, 2011). Desta forma, utilizou-se desta técnica para complementar os estudos da quitosana natural e modificada, de forma apoiar a modificação ocorrida na quitosana com o estudo da sua cristalinidade. O DRX foi realizado nas amostras na forma de pó.

Através dos difratogramas obtidos (FIGURA 18), pode-se observar diferentes graus de ordenamentos entre as amostras analisadas, o que deixa claro a mudança ocorrida. A QN mostrou picos semicristalinos em  $10^\circ$  e  $20^\circ$  em  $2\Theta$ , característicos para este polímero de acordo com a literatura (XUE *et al.*, 2013). Já para quitosana sulfatada, as reflexões  $10^\circ$  e  $20^\circ$  em  $2\Theta$  desapareceram, mostrando-se como uma forma amorfa. Isso indica que a reação de sulfatação da quitosana ocasionou mudança no seu ordenamento estrutural, sugerindo uma redução na sua capacidade de formar ligações de hidrogênio intermoleculares devido a substituição do grupo sulfato nos grupos  $-\text{OH}$  e/ou  $-\text{NH}_2$  da quitosana. Chaudhari & Murthy (2013) também observaram uma natureza amorfa da quitosana sulfatada em seus estudos e sugeriram que a incorporação de grupos sulfato na cadeia reduziu a capacidade do polímero em formar ligações de hidrogênio intermoleculares, fazendo com que este se tornasse amorfo. Antony *et al.* (2013) observaram em seus estudos uma redução da cristalinidade da quitosana após a sua modificação com isatina e atribuíram essa redução à deformação das forças de ligação de hidrogênio intermoleculares, isso devido aos grupos aminos livres ( $-\text{NH}_2$ ) formar bases de *Schiff* com a isatina.

FIGURA 18 – DRX com ângulo de difração  $2\theta$  de quitosana natural (a) e quitosana sulfatada (b)



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

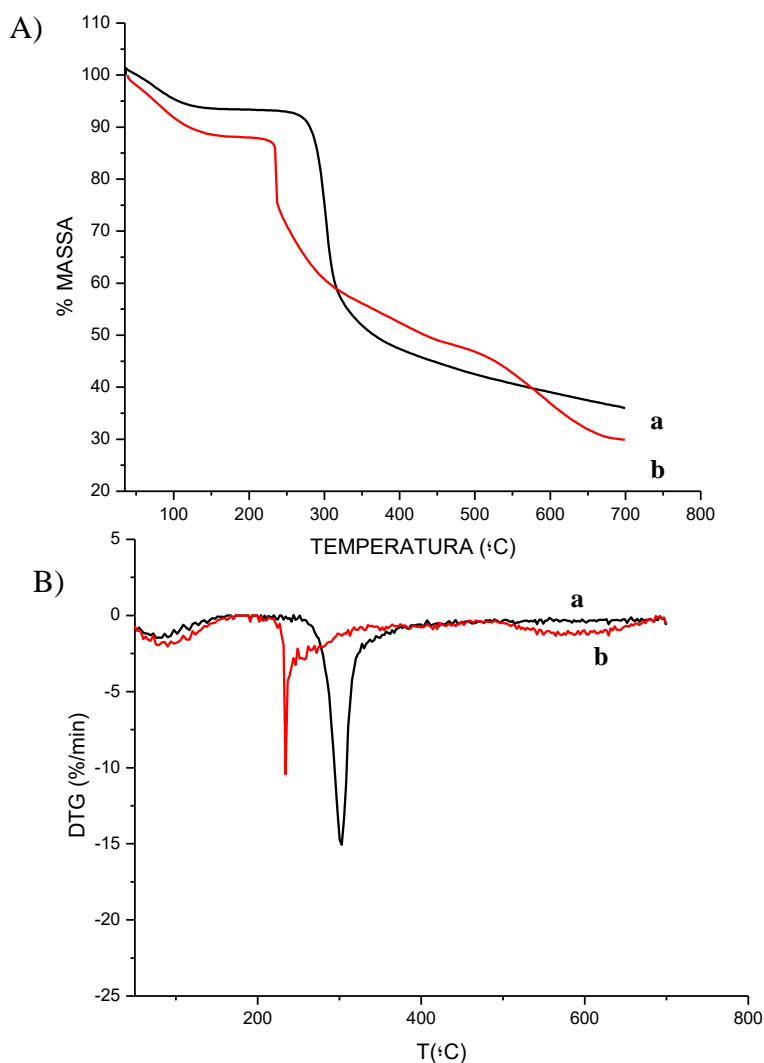
A análise termogravimétrica (TGA e DTG) foi realizada para as amostras de quitosana natural e quitosana sulfatada para verificar a estabilidade térmica antes e depois da modificação química.

Através dos resultados obtidos (FIGURA 19), observou-se que houve dois momentos importantes em perda de massa da quitosana natural e três momentos para a quitosana sulfatada. Para a QN (FIGURA 19 Aa), o primeiro momento foi aproximadamente na faixa de temperatura 52°C a 160°C, com 6,37% de perda de massa referente à desidratação da quitosana. O segundo e mais importante foi entre 249°C a 390 °C, com temperatura máxima de degradação em 303°C (FIGURA 19Ba), apresentando 44,92% aproximadamente de perda de massa, referente à decomposição térmica dos grupos GlicNAc da cadeia polimérica. A estabilidade da quitosana sulfatada teve uma redução comparada ao polímero de origem. No primeiro momento, entre 50°C a 168°C, referente à desidratação da amostra, houve uma perda de massa de 9,78%. Esse aumento de perda de massa pode ser explicado pelo fato da quitosana sulfatada ser mais hidrofílica (PIRES *et al.*, 2013). No segundo momento, entre 213°C a 340°C, com temperatura máxima de degradação em 234°C (FIGURA 19 Bb) referente à degradação térmica dos grupos GlicNAc da quitosana e grupos sulfatos, houve uma perda de massa em 30,96% aproximadamente. O terceiro momento de degradação da

amostra iniciou aproximadamente em 494°C e finalizando ao redor de 677°C, com perda de massa de 17,2%. Neste último momento, a temperatura máxima de decomposição foi em 564°C. A maior perda de massa da quitosana sulfatada aqui encontrada comparado com a quitosana natural (TABELA 5) justifica-se pela presença dos grupos sulfatos na cadeia polimérica. Estes resultados foram similares aos encontrados por Tsai *et al.* (2010) e Pires *et al.* (2013).

Os resultados sugerem que a modificação química da quitosana com grupos sulfatos levou a este polímero ter menor estabilidade térmica, isso porque a introdução destes grupos hidrofílicos na cadeia de quitosana desorganiza sua estrutura semicristalina, tornando-a mais hidrofílica e termicamente instável, corroborando com os resultados de DRX (TSAI *et al.*, 2010; SILVA, 2011).

FIGURA 19 – Curvas termogravimétricas: A) TGA e B) DTG da quitosana natural (a) e quitosana sulfatada (b).



Fonte: Elaborada pela autora.

TABELA 5 – Dados obtidos a partir das curvas termogravimétricas para QN e QS6.

Amostra	T <sub>i</sub> (°C) <sup>a</sup>	T <sub>máx</sub> (°C) <sup>b</sup>		Massa Residual (699°C) (%)
		II	III	
QN	249	303	-	36
QS6	213	234	564	29,8

<sup>a</sup>Temperatura inicial de decomposição

<sup>b</sup>Temperatura máxima de decomposição, a partir do DTG.

## 4.2 Estudos da hemocompatibilidade

### 4.2.1 Adsorção de proteínas

O processo de adsorção de proteínas é um importante estudo de hemocompatibilidade para biomateriais, uma vez que as proteínas são as primeiras a interagir com a superfície estranha conduzindo a respostas biológicas, tais como a interação com células, ativação da cascata de coagulação e do sistema imune, com a consequente formação de trombos e resposta inflamatória, assim como a rejeição de implantes (INDEST *et al.*, 2010; FRANZ *et al.*, 2011; KANG & LEE, 2012).

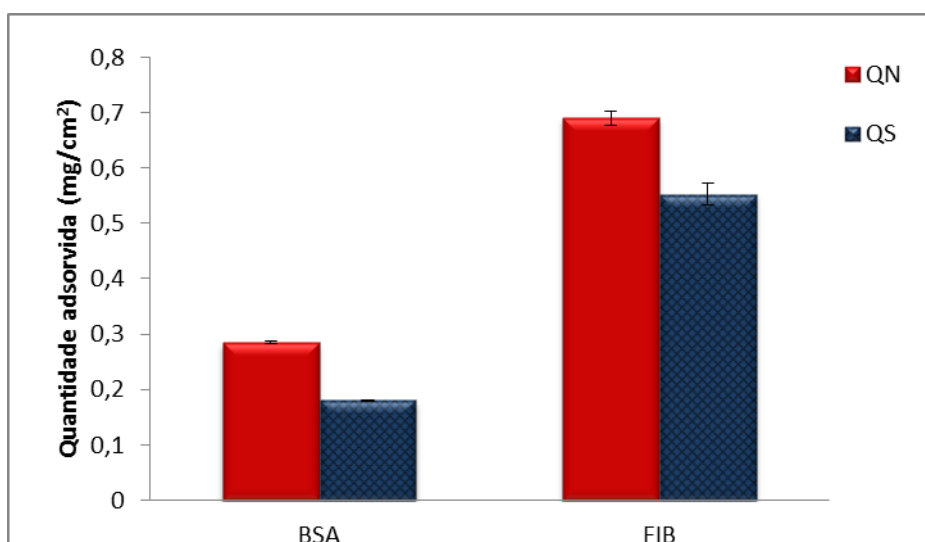
A albumina humana é a proteína presente em maior quantidade no sangue (~35–52 g/L), sendo uma das primeiras a entrarem em contato com o corpo estranho. Desta forma, a *bovine serum albumin* (BSA) foi uma das proteínas escolhidas para ser utilizada neste estudo, uma vez que possui semelhança química com a albumina humana. A segunda proteína selecionada foi o fibrinogênio, uma proteína do plasma e importante na adesão plaquetária, uma vez que possui a capacidade de ligar-se aos receptores presentes nas membranas de plaquetas (GP IIb/IIIa), ativando-as e conduzindo então ao processo trombogênico.

A interação dos filmes QN e QS6R com solução de BSA e Fibrinogênio do plasma bovino na concentração de 1mg/mL foi realizada *in vitro* para avaliar o comportamento do filme modificado quando em contato com essas proteínas do sangue e comparar com a quitosana de origem. Os resultados da quantidade adsorvida de proteína para cada filme encontram-se no Gráfico 1. A adsorção de proteínas no plasma é bem mais complexa, uma vez que envolve várias proteínas do sangue, sendo considerado um processo seletivo e competitivo (ZHANG *et al.*, 2008). No entanto, é necessário conhecer seus comportamentos individuais para melhor estudar suas interações.

Observou-se uma redução de 36,84% da quantidade de BSA adsorvida na superfície modificada, comparada com o filme de quitosana natural. Segundo Tangpasuthadol *et al.* (2003), em pH 7.4 o ácido carboxílico é convertido a íon carboxilato carregado negativamente. Assim, a BSA é rica em ácido carboxílico, adquirindo carga negativa em pH 7.4. A quitosana também possui ácido carboxílico em sua cadeia, porém a quantidade deste grupo químico altera de acordo com o GD do polímero. Dessa forma, em solução PBS com pH 7.4 (fisiológico) aconteceu uma repulsão eletrostática entre o filme polimérico e a BSA, o que explicou uma redução na quantidade adsorvida dessa proteína, mesmo para o filme não modificado. No entanto, a maior redução da quantidade adsorvida foi para o filme sulfatado devido à presença do grupo sulfato que tornou a cadeia mais eletronegativa, aumentando a repulsão eletrostática.

Para o fibrinogênio, pode-se observar que houve uma redução em 20% da quantidade adsorvida para o filme sulfatado em relação ao filme de quitosana natural, isso porque em pH fisiológico (pH 7.4) esta proteína também apresenta carga negativa, o que também ocasionou a repulsão eletrostática quando em contato com a superfície carregada negativamente. O fibrinogênio (MM 340 kDa) apresentou maior quantidade adsorvida quando comparado com a BSA, isso pode ser explicado devido às proteínas de maior peso ter maior facilidade em adsorver em superfícies quando comparado com proteínas menores (VOGLER, 2012), como foi o caso da BSA (60kDa).

Gráfico 1 – Adsorção de BSA e fibrinogênio em QN e QS6 reticulada com 2,5% de glutaraldeído.



Fonte: Elaborada pela autora.

Lima *et al.* (2013), estudaram a adsorção de BSA e Fibrinogênio em superfícies de quitosana sulfatada (GS 0.32) e observaram uma redução na quantidade adsorvida dessas proteínas em aproximadamente 19% e 3,85%, respectivamente. O presente estudo mostrou que um aumento do GS da quitosana sulfatada (1.37) foi capaz de reduzir ainda mais a adsorção dessas proteínas na superfície deste polímero modificado (36.84 e 20%, respectivamente), uma vez que se aumentou as cargas negativas da superfície.

Além da carga negativa apresentada pela quitosana sulfatada, a hidrofiliabilidade é outra característica importante para a redução da adsorção de BSA e Fibrinogênio, causada também pela inserção de grupos sulfatos (hidrofílicos) à cadeia polimérica. Xue *et al.* (2013) também observaram uma redução na adsorção de BSA e Fibrinogênio em membranas de polietersulfona (PES) modificadas com a quitosana sulfatada, e sugeriram que o aumento da hidrofiliabilidade e de cargas negativas na superfície das membranas foram importantes para essa redução na adsorção de proteínas. Chang & Chian (2013) estudaram a adsorção de proteína em filmes de quitosana modificada com plasma (hidrofílica) e observaram uma redução na adsorção de BSA. A superfície hidrofílica tem a capacidade de interagir com a água, reduzindo a sua interação com as proteínas em soluções de baixa concentração de proteínas (ZHANG *et al.*, 2008; VOGLER, 2012), ou seja, como os grupos hidrofílicos já estão interagidos com a água, não estarão disponíveis para interagir com as proteínas do plasma, conhecido como o “efeito de hidratação da água”, tornando a superfície biocompatível (KANG & LEE, 2012).

Neste trabalho, a quitosana sulfatada foi reticulada com glutaraldeído 2,5% para aumentar sua estabilidade em solução. A reticulação com este agente envolve os grupos aldeído e os grupos aminos livres da quitosana, formando uma base de *Schiff* (C=N) (COSTA JR, 2008), não alterando a disponibilidade dos grupos sulfatos na cadeia modificada. Através dos resultados de EDX pode-se observar que não houve a redução de enxofre no filme reticulado, sugerindo que não houve alteração nos grupos sulfatos adicionada à cadeia, permanecendo os grupos hidrofílicos. O resultado da adsorção de proteínas reforçou ainda que essa reticulação não alterou a propriedade da quitosana sulfatada, uma vez que apresentou uma redução na adsorção de ambas as proteínas.

#### 4.2.2 Adesão plaquetária

Proteínas tais como fibrinogênio, vitronectina, fibronectina e Fator de Von Willebrand, podem conduzir a ativação da cascata de coagulação quando pré-adsorvidas numa superfície estranha. Essas proteínas possuem receptores específicos nas membranas das plaquetas, chamados de integrinas, onde as plaquetas do plasma ligam-se e ativam-se (RATNER *et al.*, 2013).

Dentre estas proteínas, o fibrinogênio mostra-se como uma das principais proteínas da cascata de coagulação do sangue devido a sua capacidade não só em aderir plaquetas, mas como também de formar uma rede de fibrina (XU, BAUER & SIEDLECKI, 2014). Quando receptores presentes na membrana de plaquetas se ligam a uma proteína, inicia o processo de ativação das plaquetas, onde estas alteram sua conformação e liberam grânulos com função, por exemplo, de ativar novas plaquetas (ADP) e de clivar o fibrinogênio em fibrina (trombina), o que resulta na formação de uma rede de fibrinas e na estabilização do trombo na superfície (RATNER *et al.*, 2013; XU, BAUER & SIEDLECKI, 2014).

Com isso, a redução da adsorção dessas proteínas nas superfícies de biomateriais de contato com o sangue é desejável. Neste estudo, observou-se, através do ensaio de adsorção *in vitro*, que houve uma redução na adsorção de fibrinogênio na superfície modificada, o que sugere-se, como consequência, a uma redução na adesão de plaquetas na superfície, uma vez que esta é um componente importante neste processo de adesão celular e formação trombos. Isto foi confirmado pelo ensaio de adesão plaquetária observado através das microimagens obtidas tanto por MEV como por microscopia óptica, onde pode-se observar uma redução da quantidade de plaquetas aderidas na superfície sulfatada quando comparada com a superfície de quitosana natural em ambos os métodos de análise utilizados (FIGURAS 20 e 21).

A morfologia das plaquetas aderidas nas superfícies também pode ser observada de forma qualitativa através das microimagens de MEV. As plaquetas em ambas as superfícies estudadas apresentaram, de forma geral, uma forma arredondada, não sendo observados alongamentos de pseudópodes e com o mínimo de agregação, principalmente na superfície sulfatada. Foram consideradas como plaquetas as estruturas com diâmetros de 1 a 5  $\mu\text{m}$  (RATNER *et al.*, 2013; GALEA *et al.*, 2013).

FIGURA 20 – Imagens da microscopia óptica da adesão plaquetária em filme de QN (A) e QS6R (B), com aumento de 40X.

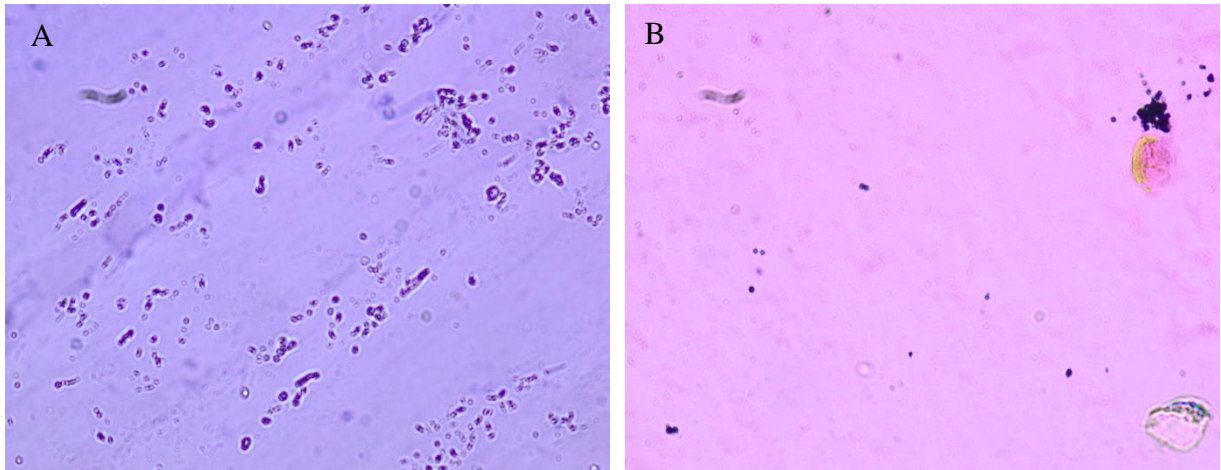
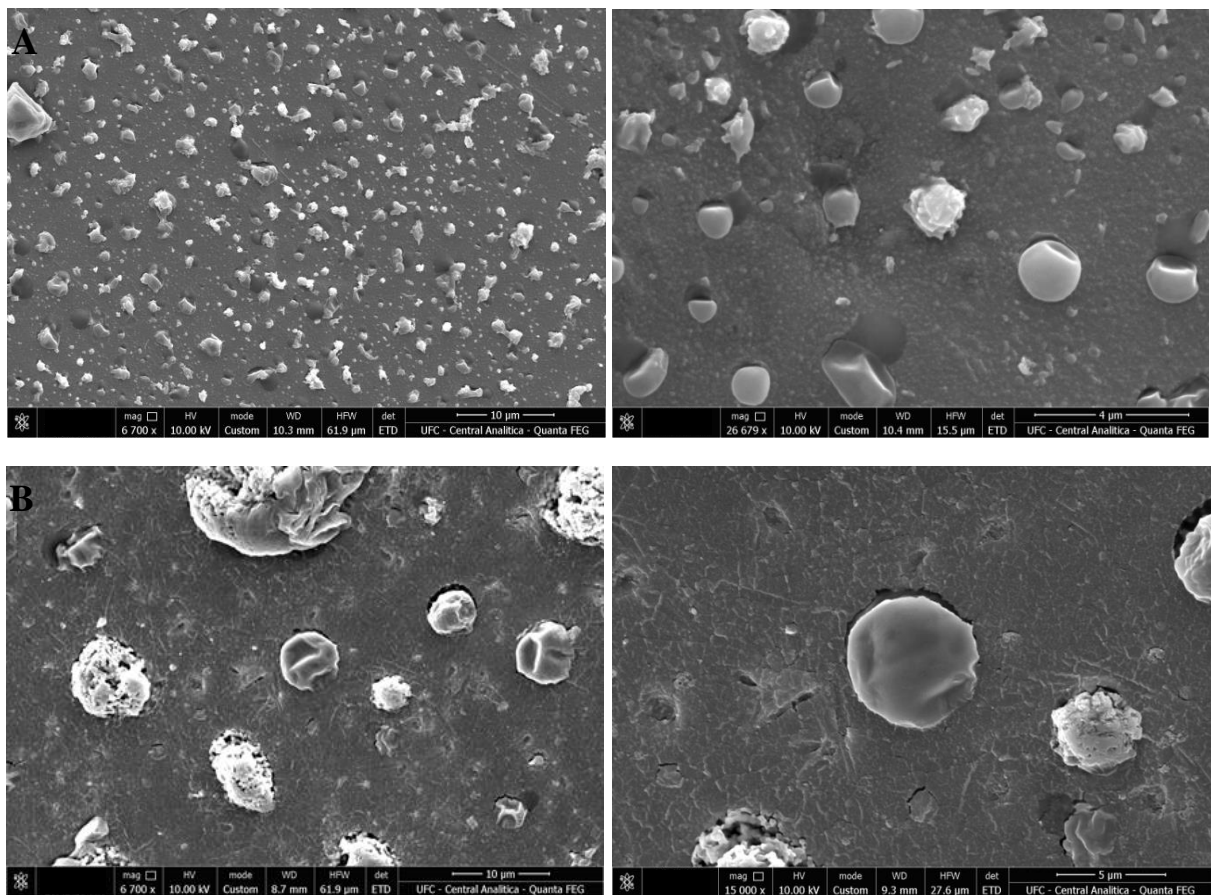


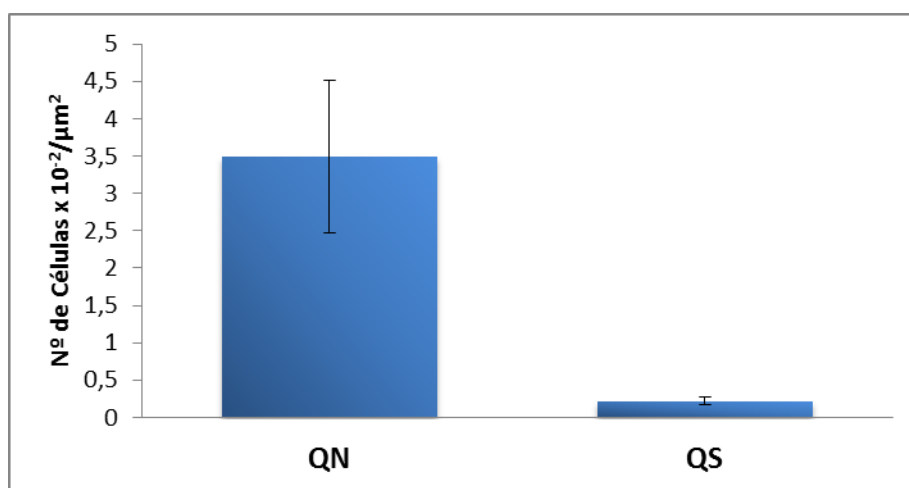
FIGURA 21 – MEV de plaquetas aderidas nos filmes de QN (A) e QS6R (B).



FONTE: Elaborado pela autora.

A contagem de plaquetas aderidas foi estimada utilizando-se a área das imagens e com a ajuda do programa *ImageJ*. A partir das imagens do MEV com área  $2799,81\mu\text{m}^2$ , foi feita uma média do número de plaquetas em cinco áreas diferentes de cada filme. A partir desta área, foi encontrado para a QN um número de plaquetas de  $3,49 \times 10^{-2}/\mu\text{m}^2$ , enquanto que para o filme de QS6R foi encontrado  $0,22 \times 10^{-2}/\mu\text{m}^2$  (GRÁFICO 2), indicando uma redução de 93,7% do número de plaquetas aderidas na superfície sulfatada, quando comparado a superfície de quitosana natural.

GRÁFICO 2 – Número de plaquetas aderidas nos filmes de QN (A) e QS6R (B) calculadas a partir do MEV.



FONTE: Elaborado pela autora.

Xue *et al.* (2013) estudaram a adesão de plaquetas em membranas de polietersulfona (PES) modificada com quitosana sulfatada em diferentes proporções, e observaram que as membranas modificadas reduziram a adesão de plaquetas nas superfícies. Atribuíram este resultado a relativa redução da adsorção de proteínas estudadas (BSA e BFG), assim como ao melhoramento da hidrofiliabilidade das membranas estudadas. Amiji (1998) estudou a adesão de plaquetas em superfície de quitosana anfotérica contendo grupos sulfatos, e verificou uma redução do número de plaquetas aderidas na superfície de  $73.3/25000\mu\text{m}^2$  (quitosana natural) para  $4.50/25000\mu\text{m}^2$  (quitosana sulfatada), correspondendo a uma redução de 93,8%, porcentagem bem próxima à encontrada neste estudo, no entanto, não foi realizado um estudo da adsorção de proteínas nestas superfícies. Já Li *et al.* (2008) estudaram o revestimento da superfície do titânio com multicamadas de colágeno e quitosana sulfatada, e observaram uma redução plaquetária de aproximadamente 80% em relação ao titânio não modificado.

Desta forma, a redução do número de plaquetas observada neste estudo para a superfície modificada em relação à superfície de origem, pode ser atribuída à modificação química realizada na quitosana que foi eficiente para reduzir a propriedade trombogênica do polímero, uma vez que se aumentou a repulsão eletrostática das proteínas do plasma (BSA e BFG) e melhorou-se a sua hidrofiliabilidade. Desta forma, conseguiu-se reduzir a trombogenicidade inicial da quitosana.

#### **4.2.3 Atividade anticoagulante**

Estudou-se o TTPa e TP da quitosana natural e sulfatada em diferentes concentrações no plasma (50, 100 e 200 µg/mL) e como padrão utilizou-se a heparina, de forma a avaliar o potencial anticoagulante da quitosana sulfatada produzido. Sugere-se que a quitosana sulfatada apresente atividade mimética à heparina, uma vez que suas estruturas são similares, influenciando no controle da fisiologia da coagulação quando complexada com a antitrombina, acelerando a inibição da trombina, e assim prevenindo a formação do coágulo ou trombo (SUBHAPRADHA *et al.*, 2013b). Os resultados do TTPa podem ser visto na Figura 22, enquanto que o TP é mostrado na Figura 23.

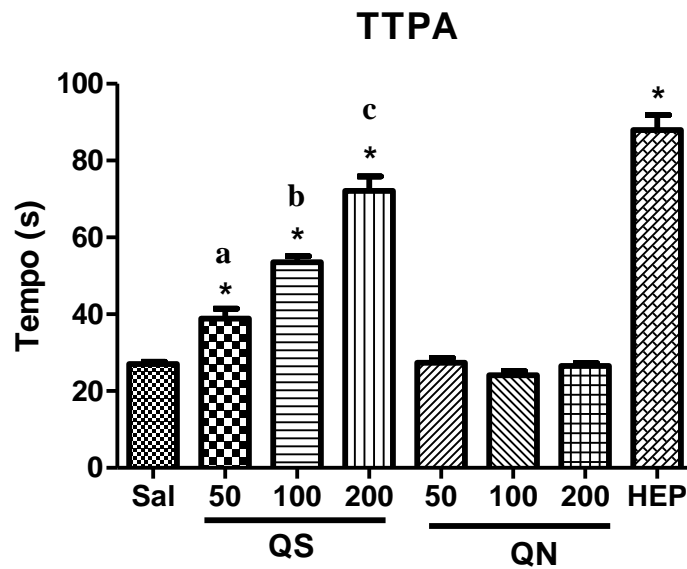
Para o TTPa, a quitosana natural apresentou atividade coagulante em 27.41s, 24.12s e 26.57s, não havendo diferença significativa entre si e o controle. Observou-se que as concentrações de quitosana sulfatada aumentaram o tempo de coagulação em relação a natural, observando ainda uma dose-dependência, em que, quanto maior a concentração no plasma, maior foi o tempo de coagulação (38.84s, 53.58s e 72.15s).

No caso do TP, observou-se que as concentrações de quitosana sulfatada testadas tiveram baixa atividade anticoagulante em relação ao controle (14.9s). No entanto, quando compara-se a QN (15.43s, 15.38s e 15.35s) com a QS (15.00s, 15.76s e 15.70s), percebe-se que houve um leve aumento do tempo de coagulação, no entanto, estes valores não foram significativos. A heparina mostrou efeito em 17.5s, também não induzindo forte efeito quando comparada ao controle, uma vez que o tempo de protrombina normal é de 12 a 15s (REIS *et al.*, 2005). Tanto a quitosana sulfatada quanto a heparina, assim como outros polissacarídeos sulfatados, não tem forte influência nesta fase da coagulação (ZHANG, Y. *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013).

Desta forma, a quitosana sulfatada mostrou maior efeito na fase intrínseca da coagulação e nenhum efeito significativo na fase extrínseca nas concentrações testadas (50,

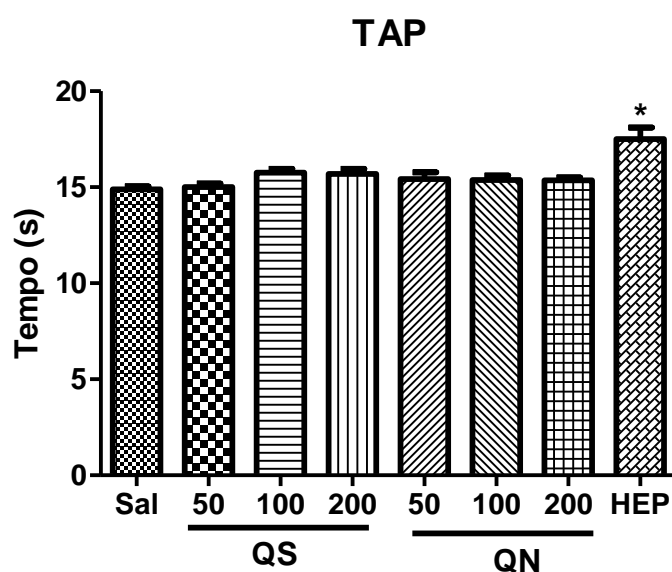
100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ). No entanto, quando comparada a quitosana natural, a atividade anticoagulante foi melhorada. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (SUWAN *et al.*, 2009; SUBHAPRADHA *et al.*, 2013b; YANG *et al.*, 2013). Liu *et al.* (2004) estudaram a atividade anticoagulante de membranas de quitosana N-sulfofurfuril reticulada e a amostra com maior grau de sulfatação (SuCS1) apresentou para o TTPa 59.1s e para o TP 15.8s, enquanto que a quitosana natural apresentou coagulação em 34.9s e 15.2s, respectivamente.

FIGURA 22 – Tempo de tromboplastina parcial ativada da QN e QS.



Efeito da quitosana natural e sulfatada no tempo de tromboplastina parcial ativada. Controle: Veículo (sol. NaCl 0.9%). HEP: heparina. \* vs. Sal, a vs 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , b vs 50 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , c vs 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $p < 0.05$ ; ANOVA e teste de Tukey, como *post hoc*)

FIGURA 23 – Tempo de protrombina da QN e QS.



Efeito da quitosana natural e sulfatada no tempo de protrombina. Controle: Veículo (sol. NaCl 0.9%). HEP: heparina. \* vs. Sal. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $p < 0.05$ ; ANOVA e teste de Tukey, como *post hoc*).

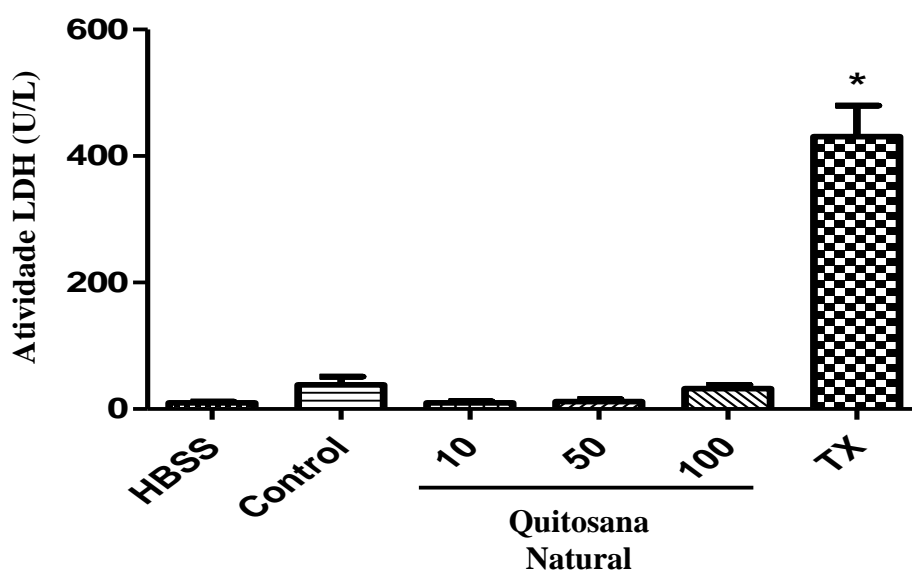
#### 4.2.4 Avaliação da citotoxicidade

Os resultados da citotoxicidade da quitosana natural e sulfatada mensurada através da atividade da enzima LDH sobre neutrófilos humanos estão representados nas Figuras 24 e 25, respectivamente. Observou-se que a quitosana natural nas concentrações 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  não induziu o aumento da atividade da LDH, apresentando  $9,05 \pm 2,49$ ;  $11,93 \pm 3,79$  e  $32,08 \pm 6,13$  U/L, respectivamente, não indicando citotoxicidade quando comparada ao grupo controle ( $38,41 \pm 13,08$  U/L). Não toxicidade também foi vista na quitosana sulfatada nas concentrações 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando ainda uma redução da atividade LDH sobre neutrófilos humanos quando comparada com a quitosana natural, apresentando atividade de  $5,01 \pm 1,37$ ;  $5,43 \pm 1,26$  e  $10,18 \pm 1,81$  U/L. Já o Triton X-100 0.2% (controle positivo) expressou aumento significativo da atividade LDH em ambas as amostras ( $430,7 \pm 48,9$  U/L). Observou-se ainda que, houve uma redução da atividade LDH do próprio solvente quando as quitosanas estavam presentes, observado aqui como o controle.

Esses resultados indicaram que ambas as amostras não foram tóxicas para a membrana celular, mesmo na maior concentração (100  $\mu\text{g/mL}$ ) para neutrófilos humanos estabelecidos pela atividade da enzima LDH. Segundo Costa Neto (2014), a viabilidade das células é

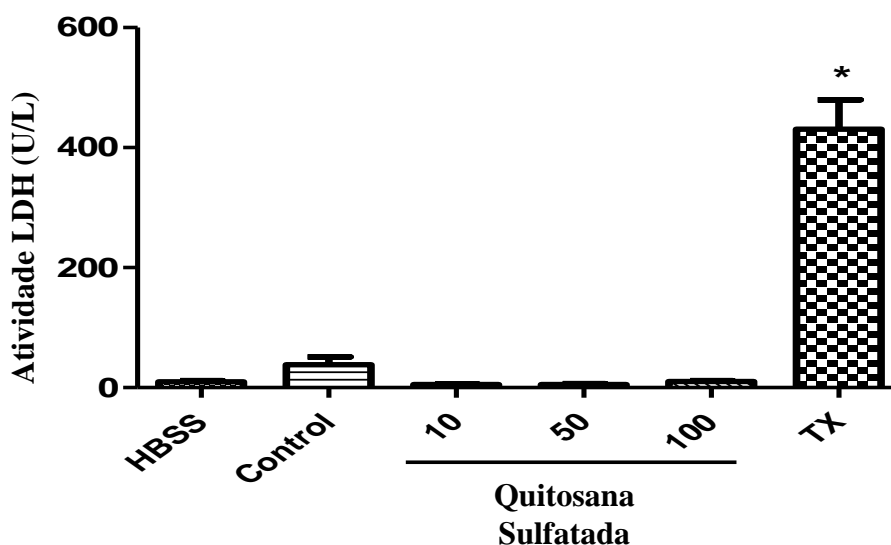
inversamente proporcional à essa quantidade de LDH liberada, desta forma, subentende-se que os polímeros em estudo também não afetaram a viabilidade celular. Estes resultados corroboram ainda com a literatura que afirmam a baixa citotoxicidade da quitosana (CAO *et al.*, 2014; JARDIM *et al.*, 2015).

FIGURA 24 - Efeito da citotoxicidade da quitosana natural sobre neutrófilos humanos.



Efeito da quitosana natural sobre a alteração da integridade da membrana de neutrófilos humanos, determinados pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Controle: Veículo (sol. 0.5% de ácido acético neutralizado com NaOH 2M). TX: Triton X-100 (0.2%). \* vs. HBSS: Solução Hanks (células não tratadas). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $p < 0.05$ ; ANOVA e teste de Tukey, como *post hoc*).

FIGURA 25 - Efeito da citotoxicidade da quitosana sulfatada sobre neutrófilos humanos.



Efeito da sulfatada sobre a alteração da integridade da membrana de neutrófilos humanos, determinados pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Controle: Veículo (sol. 0.5% de ácido acético neutralizado com NaOH 2M). TX: Triton X-100 (0.2%). \* vs. HBSS: Solução Hanks (células não tratadas). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $p < 0.05$ ; ANOVA e teste de Tukey, como *post hoc*).

## 5 CONCLUSÃO

A modificação química da quitosana por reação de sulfatação foi realizada com êxito, principalmente para a preparada com 6 mL de ácido clorossulfônico, escolhida para ser submetida às caracterizações e ensaios devido ao seu maior grau de substituição (1.37), onde se tratou de uma quitosana 2-N-3,6-O- sulfatada parcialmente. Os filmes mostraram-se lisos e sem porosidade, característica requerida para aplicações em biomateriais.

Esta quitosana modificada mostrou-se com estrutura e massa molecular semelhante à heparina, apresentando ainda efeitos hemocompatíveis similares, tais como a redução na adsorção de BSA e Fibrinogênio em 36,84% e 20%, respectivamente, redução da adesão plaquetária em 93.7%, ter atividade anticoagulante (na fase intrínseca da coagulação) quando comparado com a quitosana natural, e não apresentou citotoxicidade (LDH) para neutrófilos humanos (sistema imune inato), emergindo como um potencial substituto heparínico e para futuro uso em aplicações de contato com o sangue.

A reticulação dos filmes foi realizada apenas para o ensaio de adsorção de proteínas e adesão plaquetária, de forma a obter um filme insolúvel, uma vez que este derivado é solúvel,

e assim poder estudar essas reações *in vitro*. No entanto, não se faz necessário realizar este processo antes de ser aplicado a um dispositivo médico, por exemplo, o *stent*, uma vez que o próprio glutaraldeído é muitas vezes utilizado como *cross-linking* da quitosana sulfatada a estes dispositivos, já promovendo esta estabilidade, assim como outros tipos de agentes reticulantes que também podem ser utilizados. Para outros tipos de aplicações que não sejam dispositivos biomédicos e que se deseje a insolubilidade deste polímero, o mesmo pode ser utilizado, no entanto, testes mecânicos e melhorias da sua resistência física merecem serem melhores estudados.

De acordo com os resultados obtidos, o filme de quitosana sulfatada produzido apresentou propriedades hemocompatíveis melhoradas em relação a quitosana natural, mostrando potencial na mimetização da heparina e para aplicações biomédicas, devendo, no entanto, ser submetido a estudos mais detalhados.

### **5.1 Sugestões de estudos futuros**

- Estudar de forma detalhada a solubilidade e hidrofiliabilidade da quitosana sulfatada através de testes de solubilidade e ângulo de contato;
- Investigar de forma mais detalhada as propriedades hemocompatíveis deste polímero modificado através do estudo de agregação plaquetária, hemólise, adsorção de outras proteínas do sangue como imunoglobulinas e antitrombina;
- Estudar os efeitos no sistema imune de forma mais abrangente como, a atividade anti-inflamatória e a citotoxicidade através do teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio);
- Avaliar as respostas biológicas através de ensaios *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- AMIJI, M. Platelet adhesion and activation on an amphoteric chitosan derivative bearing sulfonate groups. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 10, p. 263, 1998.
- AMIJI, M. Synthesis of anionic poly (ethylene glycol) derivative for chitosan surface modification in blood-contacting applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, p. 193 - 199, 1997.
- ANTONY, R. *et al.* Synthesis, spectrochemical characterisation and catalytic activity of transition metal complexes derived from Schiff base modified chitosan. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 103, p. 423 – 430, 2013.
- ASSAD, A. R.; FEITOSA, A. T.; ASSAD, J. A. R. **Anestesia para implante de endopróteses vasculares**. Disponível em: <<http://www.saj.med.br/uploaded/File/artigos/Anestesia%20para%20procedimento%20endovascular.pdf>> Acesso em Julho de 2015.
- AVRAMOGLOU, T.; JOZEFONVICZ, J.; JOZEFOWICZ, M. Blood-Contacting Polymers. In: DUMITRIU, S. **Polymeric biomaterials**. Boca Raton, Florida: 2nd, p. 611, 2001.
- BALAN, V.; VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. **European Polymer Journal**, v. 53, p. 171 – 188, 2014.
- BENABBOU, R. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a combination of chitosan and divergicin M35. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 347 - 355, 2009.
- BEZERRA, A. M. **Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular**. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BRATS. **Avaliação das Próteses Endoluminais (“stents”) convencionais e farmacológicas no tratamento da doença arterial coronariana**. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS), n. 22, 2013. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>> acesso em out de 2014.
- BRITTO, D. de.; ASSIS, O. B. G. Chemical, biochemical, and microbiological aspects of chitosan quaternary salt as active coating on sliced apples. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 599 - 605, 2012.
- BULWAN, M. *et al.* Chitosan-Based Ultrathin Films as Antifouling, Anticoagulant and Antibacterial Protective Coatings. **Journal of Biomaterials Science**, v. 23, p. 1963 - 1980, 2012.
- CAMPELO, C. S. *et al.* In vitro evaluation of anti-calcification and anti-coagulation on sulfonated chitosan and carrageenan surfaces. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 241 – 248, 2016.

- CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel –influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13 - 17, 2001.
- CAO, L. *et al.* Vascularization and bone regeneration in a critical sized defect using 2-N,6-O-sulfated chitosan nanoparticles incorporating BMP-2. **Biomaterials**, v. 35, p. 684 - 698, 2014.
- CARREÓN, J. *et al.* Mercury recovery from aqueous solutions by polymer-enhanced ultrafiltration using a sulfate derivative of chitosan. **Membrane Water Treatment**, v. 1, n. 4, p. 231- 251, 2010.
- CHANG, S. H.; CHIAN, C. H. Plasma surface modification effects on biodegradability and protein adsorption properties of chitosan films. **Applied Surface Science**, v. 282, p. 735 - 740, 2013.
- CHANG, S. H.; CHIAN, C.H. Plasma surface modification effects on biodegradability and protein adsorption properties of chitosan films. **Applied Surface Science**, v. 282, p. 735 - 740, 2013.
- CHANG, S.H.; HUANG, J.-J. Biodegradability and anticoagulant properties of chitosan and sulfonated chitosan films coated on TiNi alloys. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, n. 23, p. 4959 - 4963, 2012.
- CHANG, S.H; HUANG, J. J. Biodegradability and anticoagulant properties of chitosan and sulfonated chitosan films coated on TiNi alloys. **Surface & Coatings Technology**, v. 206, p. 4959 - 4963, 2012.
- CHAUDHARI, L. B; MURTHY, Z. V. P. Preparation, Characterization, and Performance of Sulfated Chitosan/Polyacrylonitrile Composite Nanofiltration Membranes. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, p. 389 - 399, 2013.
- CHEN, L.; HAN, D.; JIANG, L. On improving blood compatibility: From bioinspired to synthetic design and fabrication of biointerfacial topography at micro/nano scales. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 2 - 7, 2011.
- CHORNY, M. *et al.* Targeting stents with local delivery of paclitaxelloaded magnetic nanoparticles using uniform fields. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8346 – 8351, 2010.
- CHUNG, T. W. *et al.* Adenosine diphosphate-decorated chitosan nanoparticles shorten blood clotting times, influencing the structures and varying the mechanical properties of the clots. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1655 - 1664, 2014.
- CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 4, p. 250 - 262, 2003.
- COSTA JR, E. S. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.** 2008. 133f. Tese

(Doutorado em Engenharia Metalúrgica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

COSTA NETO, B. P. da. **Micropartículas de quitosanaestruturadas com aerosil®: estabilidade, adsorção, encapsulação e liberação de substâncias ativas.** 2014. 164f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande de Norte, Natal, 2014.

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

CUMASHI, A. *et al.* A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541 - 52, 2007.

CURRY, S. *et al.* Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. **Nature structural biology**, v. 5, n. 9, p. 827 - 835, 1998.

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

DEPAN, D.; MISRA, R. D. K. The interplay between nanostructured carbon-grafted chitosan scaffolds and protein adsorption on the cellular response of osteoblasts: Structure–function property relationship. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 6084 - 6094, 2013.

DESAI, S.; BIDANDA, B.; BÁRTOLO P. Metallic and Ceramic Biomaterials: Current and Future Developments. In: Bártoło P. and Bidanda, B. **Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine**, p. 1 - 2, 2008.

DUMITRIU, S. **Polymeric biomaterials**. 2nd. Boca Raton, Florida: CRC Press/Taylor & Francis. 1168 p., 2001.

FAN, L. *et al.* Synthesis and anticoagulant activity of the quaternary ammonium chitosan sulfates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 31 - 37, 2012.

FEDEL, M. *et al.* Blood compatibility of polymers derived from natural materials. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 27, n. 4, p. 295 - 312, 2012.

FERREIRA, C. N. *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, n. 5, p. 416 - 421, 2010.

FISCHER, M. *et al.* The effect of octadecyl chain immobilization on the hemocompatibility of poly (2-hydroxyethyl methacrylate). **Biomaterials**, v. 33, p. 7677 - 7685, 2012.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 229 - 237, 2001.

FRANZ, S. *et al.*, Immune responses to implants - A review of the implications for the design

of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**, v. 32, p. 6692 - 6709, 2011.

FREITAS, S. C.; BARBOSA, M. A.; MARTINS, M. C. L. The effect of immobilization of thrombin inhibitors onto self-assembled monolayers on the adsorption and activity of thrombin. **Biomaterials**, v. 31, p. 3772 – 3780, 2010.

GABRIEL, L. P. **Caracterização de Poliuretano a Base de Açáí Formulado para Construção de Dispositivos Biomédicos**. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2012.

GALEA, L. *et al.* Control of the size, shape and composition of highly uniform, non-agglomerated, sub-micrometer b-tricalcium phosphate and dicalcium phosphate platelets. **Biomaterials**, v. 34, p. 6388 - 6401, 2013.

GAMZAZADE, A. *et al.* Structural features of sulfated chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 113 - 116, 1997.

GARCIA, R. B. *et al.* Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 486 - 492, 2008.

GHOSH, T. *et al.* Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**, v. 19, n. 1, p. 2 - 15, 2009.

GOMIDE, V. S. **Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos**. 2005. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas, 2005.

GONÇALVES, I. C., *et al.* Protein adsorption and clotting time of Phema hydrogels modified with C18 ligands to adsorb albumin selectively and reversibly. **Biomaterials**, v. 30, p. 5541 – 5551, 2009.

GONSALVES, A. A. *et al.* Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215 - 1223, 2011.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. **Biomaterials**, v. 25, p. 5681 – 5703, 2004.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, 2004.

GUSTAFSON, S. The influence of sulfated polysaccharides on the circulating levels of hyaluronan. **Glycobiology**, v. 7, n. 8, p. 1209 - 1214, 1997.

HAAG, R. *et al.* Protein Interactions with Polymer Coatings and Biomaterials. **Angewandte Chemie International Edition**, v.53, p. 8004 – 8031, 2014.

HAMERSCHLAK, N.; ROSENFELD, L. G. M. Utilização da Heparina e dos Anticoagulantes Orais na Prevenção e Tratamento da Trombose Venosa Profunda e da Embolia Pulmonar.

**Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v. 67, n. 3, p. 209 - 213, 1996.

HIRAI, A. *et al.* Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, p. 87 - 94, 1991.

HOFFMAN, A. S. Blood - Materials interactions: An overview. In: COOPER & PEPPAS. **Biomaterials**. Washington: American Chemical Society, p. 3 – 8, 1982.

HOLMBERG, M. *et al.* Protein aggregation and degradation during iodine labeling and its consequences for protein adsorption to biomaterials. **Analytical Biochemistry**, v. 361, p. 120 – 125, 2007.

HOLME, K. R; PERLIN, A. S. Chitosan N-sulfate. A water-soluble polyelectrolyte. **Carbohydrate Research**, v. 302, p. 7 - 12, 1997.

HOU, Z. *et al.* Effect of chitosan molecular weight on the stability and rheological properties of b-carotene emulsions stabilized by soybean soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 205 - 211, 2012.

HU, J.; LI, S.; LIU, B. Adsorption of BSA onto sulfonated microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 259 - 263, 2005.

INDEST, T. *et al.* Adsorption of human serum albumin (HSA) on modified PET films monitored by QCM-D, XPS and AFM. **Colloids and Surfaces A: Physicochem**, v. 360, p. 210 – 219, 2010.

JARDIM, K. V. *et al.* Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 56, p. 294 – 304, 2015.

JAYAKUMAR, R. *et al.* Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 55, p. 675 – 709, 2010.

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

JUNG, F.; BRAUNE, S.; LENDLEIN, A. Haemocompatibility testing of biomaterials using human platelets. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 53, p. 97 – 115, 2013.

JUNQUEIRA, D. R. G. *et al.* Farmacovigilância da heparina no Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 3, p. 328 - 332, 2011.

JUSTI, K. C. Imobilização de agentes complexantes no biopolímero quitosana – equilíbrio de adsorção de íons metálicos em solução aquosa. 2006. 151f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

KANG, C. K; LEE, Y. S. Carbohydrate polymer grafting on stainless steel surface and its biocompatibility study. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p.1670 – 1675, 2012.

KANG, M. L. *et al.* Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 35, p. 9984 - 9994, 2014.

KARADENIZ, F.*et al.* Sulfation of chitosan oligomers enhances their anti-adipogenic effect in 3T3-L1 adipocytes. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 666 – 671, 2011.

KARTHIK, R. *et al.* Structural characterization and in vitro biomedical activities of sulfated chitosan from *Sepia pharaonis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 319 – 328, 2016.

LARSSON, M. *et al.* Biomedical applications and colloidal properties of amphiphilically modified chitosan hybrids. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1307 – 1328, 2013.

LEE, C.; HUANG, C.; LEE, Y. Preparation of amphiphilic poly (L-lactide)-graft-chondroitin sulfate copolymer self-aggregates and its aggregation behavior. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1179 - 86, 2006.

LI, Q-L.*et al.* Anticoagulant surface modification of titanium via layer-by-layer assembly of collagen and sulfated chitosan multilayers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89, n. 3, p. 575 - 584, 2009.

LIMA, P. H. L. *et al.* Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and  $\kappa$ -carrageenan films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 719 – 725, 2013.

LIU, M. *et al.* Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 186 - 191, 2013.

LIU, W. *et al.* Anticoagulation Activity of Crosslinked *N*-SulfofurfurylChitosan Membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 94, p. 53 – 56, 2004.

LV, S. *et al.* Structure and Characterization of Sulfated Chitosan Superplasticizer. **Journal American Ceramic Society**, v. 96, n. 6, p. 1923 – 1929, 2013.

MA, J.; SAHAI, Y. Chitosan biopolymer for fuel cell applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 955 – 975, 2013.

MAHANTA, A. K. *et al.* Polyurethane-Grafted Chitosan as New Biomaterials for Controlled Drug Delivery. **Macromolecules**, v. 48, p. 2654 – 2666, 2015.

MAIA, M. *et al.* Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 3, p. 566 - 572, 2010.

MC-GOWAN, I. Microbicides: a new frontier in HIV prevention. **Biologicals**, v. 34, p. 241-255, 2006.

MNATSAKANYAN, M. *et al.* Separation of chitosan by degree of acetylation using simple free solution capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 6873 – 6877, 2013.

MOURA NETO, E. de. **Síntese de nanopáticas da galactomanana da fava danta (*dimorphandra gardneriana*) modificada**. 2013. 132f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MOURAO, P. A. S. *et al.* Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23973 - 84, 1996.

NERY, J. C. **Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas**. 2014.79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

NETO, E. M. *et al.* Preparation and Characterization of a Chemically Sulfated Cashew Gum Polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1953 - 1960, 2011.

NEVES, A. L. P. **Preparação e caracterização de nanopáticas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana**. 2013. TESE (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

NOGUEIRA, F. T. **Síntese e caracterização de membranas de filme fino composto de polissulfona/quitosana reticulada com glutaraldeído**. 2012. 205f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NOH, H.; VOGLER, E.A. Volumetric interpretation of protein adsorption: Competition from mixtures and the *Vroman* effect. **Biomaterials**, v. 28, p. 405 – 422, 2007.

OZ, F. *et al.* The effects of direct addition of low and medium molecular weight chitosan on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef chop. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 861 - 867, 2016.

PEREIRA, A .G. B. *et al.*  $^1\text{H}$  NMR and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC surface characterization of chitosan–chitin sheath-core nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 46 – 52, 2015.

PIRES, N. R. *et al.* Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 92 – 99, 2013.

PIRES, R. *et al.* Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957 -971, 2015.

QU, J. *et al.* The preparation and characterization of chitosan rods modified with  $\text{Fe}^{3+}$  by a chelation mechanism. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 822 – 827, 2011.

RATNER, B. D. *et al.* Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. 3 ed. 2013.

RAVEENDRAN, S. *et al.* Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano

platforms. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, p. 605 – 626, 2013.

REIS, P. R. M. *et al.* Avaliação da determinação do tempo de protrombina em amostras de sangue colhidas por duas diferentes técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 251 - 255, 2005.

RINAUDO, M. MILAS, M.; DUNG, P. L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, 1993.

RODRIGUES, J. A. G.; FARIAS, W. R. L. Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas *Halymenia spp.*: ferramenta taxonômica para algas. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 1, 2009.

RUBIO, M. L. **Estudo de potenciais inibidores de infecção causada por Vírus Sincicial Respiratório em cultura de célula**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Genética)-Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

SANTOS, A - T. L. *et al.* Antifibrinolíticos e Cirurgia Cardíaca com Circulação Extracorpórea. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 5, p. 549 - 564, 2007.

SAUERESSIG, M. G. *et al.* A correção das estenoses traqueobrônquicas mediante o emprego de órteses. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 28, n. 2, 2002.

SHELMA, R., SHARMA, C. P. Development of lauroyl sulfated chitosan for enhancing hemocompatibility of chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 561 – 570, 2011.

SHIBANO, M. *et al.* Facile synthesis of acyl chitosan isothiocyanates and their application to porphyrin-appended chitosan derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 279 – 285, 2014.

SILVA, D. S. **Estudos físico-químicos de O-carboximetilação de quitosana**. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade de São Paulo, Instituto de química de São Carlos, São Carlos, 2011.

SILVA, L. C. R. P. da. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas com atividade anticoagulante. 2012. 74f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2012.

SOUZA, M. C. R. de. *et al.* Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 153 - 60, 2007.

SPERLING, C. *et al.* Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. **Biomaterials**, v. 30, p. 4447 – 4456, 2009.

SUBHAPRADHA, N. *et al.* Sulfation of  $\beta$ -chitosan and evaluation of biological activity from

gladius of *Sepioteuthis lessoniana*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 336 – 340, 2013a.

SUBHAPRADHA, N. *et al.* Anticoagulant and antioxidant activity of sulfated chitosan from the shell of donacid clam *Donax scortum* (Linnaeus, 1758). **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, v. 13, p. 39 - 45, 2013b.

SUWAN, J. *et al.* Sulfonation of papain-treated chitosan and its mechanism for anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1190 – 1196, 2009.

TANGPASUTHADOL, V. *et al.* Surface modification of chitosan films. Effects of hydrophobicity on protein adsorption. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 937 – 942, 2003.

TSAI, H. S. *et al.* Preparation and properties of sulfopropyl chitosan derivatives with various sulfonation degree. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, p. 1686 – 1693, 2010.

VAKILI, M. *et al.* Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 115 – 130, 2014.

VÄLIMAA, T. *et al.* Viscoelastic memory and self-expansion of self-reinforced bioabsorbable stents. **Biomaterials**, v. 23, p. 3575 – 3582, 2002.

VIKHOREVA, G. *et al.* Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulfated chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 327 – 332, 2005.

VINO, A. B. *et al.* Extraction, characterization and in vitro antioxidative potential of chitosan and sulfated chitosan from Cuttlebone of *Sepia aculeate* Orbigny, 1848. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S334 - S341, 2012.

VOGLER, E. A. Protein adsorption in three dimensions. **Biomaterials**, v. 33, p. 1201 - 1237, 2012.

VOGLER, E. A.; SIEDLECKI, C. A. Contact activation of blood-plasma coagulation. **Biomaterials**, v. 30, p. 1857 – 1869, 2009.

VOLPI, N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. **Inflammopharmacology**, v. 19, p. 299 – 306, 2011.

VONGCHAN, P. *et al.* Anticoagulant activity of a sulfated chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1239 – 1242, 2002.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 127 - 32, 2008.

WANG, J. L. *et al.* Electropolymerization of dopamine for surface modification of complex-shaped cardiovascular stents. **Biomaterials**, v. 35, p. 7679 - 7689, 2014.

WANG, X. *et al.* Improvement in hemocompatibility of chitosan/soy protein composite

membranes by heparinization. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 22, p. 143 – 150, 2012.

WEI, W. *et al.* A Comprehensive Compositional Analysis of Heparin/Heparan Sulfate-Derived Disaccharides from Human Serum. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 3703 – 3708, 2011.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. **Progress in Biomedical Engineering**, v. 4, 1986.

WITVROUW, M.; CLERCQ, E. de. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **General Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 497 - 511, 1997.

WU, C. *et al.* Determination of the degree of deacetylation of chitosan by capillary zone electrophoresis. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 236 – 244, 2014.

WU, H. *et al.* Fabrication of core-shell microspheres using alginate and chitosan-polycaprolactone for controlled release of vascular endothelial growth factor. **Reactive and Functional Polymers**, v. 72, n. 7, p. 427 - 437, 2012.

XING, R. *et al.* Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 148 – 154, 2005.

XING, R. *et al.* Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 148 – 154, 2005.

XU, L-C.; BAUER, J. W.; SIEDLECKI, C. A. Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 124, p. 49 – 68, 2014.

XUE, J. *et al.* Blood compatibility of polyethersulfone membrane by blending a sulfated derivative of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 64 – 71, 2013.

YANG, B. *et al.* Hyphenated techniques for the analysis of heparin and heparan sulfate. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 541 – 557, 2011.

YANG, J. *et al.* Preparation, characterization and in vitro anticoagulant activity of highly sulfated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 25 – 31, 2013.

YEH, H. Y.; LIN, J.-C. Surface characterization and *in vitro* platelet compatibility study of surface sulfonated chitosan membrane with amino group protection–deprotection strategy. **Journal of biomaterials science**, v. 19, n. 3, p. 291 – 310, 2008.

YEH, H. Y.; LIN, J.-C. Surface Phosphorylation for Polyelectrolyte Complex of Chitosan and Its Sulfonated Derivative: Surface Analysis, Blood Compatibility and Adipose Derived Stem Cell Contact Properties. **Journal of Biomaterials Science**, v. 23, p. 233 – 250, 2012.

YUAN, L. *et al.* Biomacromolecular affinity: Interactions between lysozyme and regioselectively sulfated chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, p. 346 –

350, 2009.

ZHANG, K. *et al.* FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 60 – 65, 2011.

ZHANG, K. *et al.* NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution. **Polymer**, v. 51, p. 4698 - 4705, 2010.

ZHANG, Y. *et al.* Modification, characterization and structure–anticoagulant activity relationships of persimmon polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 515 – 520, 2010.

ZHANG, Z. *et al.* Blood compatibility of surfaces with superlow protein adsorption. **Biomaterials**, v. 29, p.4285 – 4291, 2008.

ZULUETA, M. M. L. *et al.* Synthetic heparin and heparan sulfate oligosaccharides and their protein interactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, p. 1023 – 1029, 2013.