



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**SANDY DANIELLE LUCINDO GOMES**

**ESTUDOS PRELIMINARES DA HEMOCOMPATIBILIDADE DE BLENDA  
POLIMÉRICAS DE QUITOSANA E AGARANA DA ALGA *Gracilaria birdiae***

**FORTALEZA**

**2019**

SANDY DANIELLE LUCINDO GOMES

ESTUDOS PRELIMINARES DA HEMOCOMPATIBILIDADE DE BLENDA  
POLIMÉRICAS DE QUITOSANA E AGARANA DA ALGA *Gracilaria birdiae*

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira

FORTALEZA

2019

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)

---

G617e Gomes, Sandy Danielle Lucindo.

Estudos preliminares da hemocompatibilidade de blendas poliméricas de quitosana e agarana da alga *Gracilaria birdiae* / Sandy Danielle Lucindo Gomes. – 2019.  
44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

1. Recobrimento. 2. Polímeros. 3. Agaranas. 4. Hemocompatibilidade. 5. Quitosana. I. Título.

CDD 660

---

SANDY DANIELLE LUCINDO GOMES

ESTUDOS PRELIMINARES DA HEMOCOMPATIBILIDADE DE BLENDA  
POLIMÉRICAS DE QUITOSANA E AGARANA DA ALGA *Gracilaria birdiae*

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Fábila Karine Andrade  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus.

Aos meus pais Valéria e Clécio.

Aos meu avós Zezildo e Francisca.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus. À minha mãe Valéria. Ao meu orientador Rodrigo pela oportunidade. À doutora Fábria e professora Rilvia pela disponibilidade. À professora Kalyne do CEFAC , Liara, Karen e Glauco. Aos amigos Tiago, Rosy e Italo. Aos colegas do NPL Jane, Silvia, Érika, Dani, Nonato, Anaftália, Matheus e John. Aos amigos de graduação Brenda, Alysson, André, Vivi, Emanuel e Larissa. Aos meus avós paternos Zezildo e Francisca que sempre me incentivaram a estudar.

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

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original..”

**Albert Einstein**

## RESUMO

Alterações cardiovasculares muitas vezes exigem intervenções como a implantação de stents para liberação do fluxo sanguíneo. Entretanto, stents metálicos são com frequência associados à problemas de trombose. Blendas poliméricas de quitosana e polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae* foram desenvolvidas a fim de combinar as vantagens dos dois biopolímeros formando um revestimento polimérico para uma futura aplicação em stents metálicos, com o intuito de melhorar a hemocompatibilidade destes dispositivos. Polissacarídeos sulfatados (PS) provenientes de algas vermelhas são macromoléculas bioativas nas quais estão presentes grupamentos sulfatos no lugar de grupos hidroxilas. Devido à presença de grupos sulfatos os PS apresentam atividades biológicas de interesse para aplicação como revestimento, por exemplo, antitrombótica e anticoagulante. Contudo, os polissacarídeos em sua maioria são solúveis em água. Desse modo, a formação de um filme é impossibilitada. Para alterar melhorar as características físicas do filme será proposto uma blenda de quitosana e agarana com, pois a quitosana tem sido estudada como um excelente formador de filmes. O PS utilizado foi caracterizado como uma galactana sulfatada do tipo agarana. A atividade anticoagulante do PS foi investigada pelos testes de tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) e tempo de protrombina (TP). O PS estudado foi capaz de prolongar o tempo de coagulação no teste de TTPA. As blendas foram obtidas variando-se as concentrações dos polímeros nas proporções de agarana e quitosana de 75:25 (25Q/75A), 50:50 (50Q/50A) e 25:75 (75Q/25A). Como controle foi usado o filme contendo apenas quitosana ou somente agarana. Os filmes obtidos foram reticulados com glutaraldeído para aumentar sua estabilidade física. A caracterização dos filmes foi feita por espectroscopia de infravermelho (FTIR) e análises termogravimétricas. Para avaliar a hemocompatibilidade dos filmes, foi estudada a adsorção de proteínas importantes nos processos de coagulação, albumina de soro bovino (BSA) e fibrinogênio, na superfície dos filmes reticulados. O aumento da porcentagem do PS nas blendas reduziram a adsorção de proteínas em comparação com filmes de quitosana pura. Os resultados sugerem que a blenda híbrida de quitosana e PS (agarana) é um biomaterial promissor para uso como revestimento polimérico em dispositivos como stents.

**Palavras-chave:** Agaranas. revestimento. Blendas.



## ABSTRACT

Cardiovascular diseases can be treated with stents implantation to release blood flow. However, metal stents are associated with thrombosis problems. Polymeric blends of chitosan and sulfated polysaccharide, extracted from the red algae *Gracilaria birdiae*, were developed in order to combine the biopolymer advantages. the hybrid could be used as coating for metallic stents increasing the hemocompatibility of the device. PS sulphated polysaccharides extracted of red algae are bioactive macromolecules in which sulfate groups are present instead of hydroxyl groups. Due to sulfated groups , the polysaccharide presents biological activities such as antithrombotic, anticoagulant and immunostimulant that could be used for application as coating,. However, polysaccharides are mostly water soluble and the formation of a film is difficult. To overcome this problem, a chitosan and agaran blend will be developed. Indeed, chitosan has been studied as an excellent film former. The PS used was characterized as a sulfated galactan of the agaran type. The anticoagulant activity of PS was investigated through the standard coagulation assays APTT and PT . PS (agaran) was able to prolong coagulation time in APTT test. Compositions of various agaran-chitosan blend were developed.. According to the ratios 75:25 (25Q/75A), 50 :50 (50Q/50A), 25:75 (75Q/25A). The blends were characterized by infrared spectroscopy and thermographs (FTIR and TG). The films were cross-linked with glutaraldehyde to increase their stability and decrease the degree of swelling. The adsorption of important proteins on the surface of the crosslinked films was studied, during the coagulation processes . The increasing percentage of PS in the hybrid reduced the adsorption of BSA and fibrinogen in comparison with films of natural chitosan. hybrids of chitosan and PS (agaran) is a promising biomaterial for use as a polymeric coating on devices such as stents.

**Keywords:** Agaran . *Coating*. hybrids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Implantação de stent metálico intravascular.....	16
Figura 2 – Cascata da coagulação mostrando via intrínseca e extrínseca .....	17
Figura 3 – Estrutura da unidade dissacarídica repetitiva de heparina.....	18
Figura 4 – Estrutura da agararose e da agaropectina.....	19
Figura 5 – Estrutura química da quitosana .....	20
Figura 6 – Compatibilidade entre polímeros para obtenção de blenda.....	22
Figura 7 – Reticulação de polissacarídeo com glutaraldeído.....	23
Figura 8 – Metodologia utilizada nos ensaios de coagulação TTPA e TP.....	24
Figura 9 – Metodologia para obtenção das blendas.....	26
Figura10 – Atividade anticoagulante do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> avaliada pelo teste de tempo de tromboplastina ativado (TTPA).....	29
Figura11 – Atividade anticoagulante do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> avaliada pelo teste tempo de protrombina (TP). 30	30
Figura12 – FTIR FTIR- do filme do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> obtido pelo método <i>casting</i> .....	31
Figura13 – FTIR do filme de quitosana obtido pelo método <i>casting</i> .....	32
Figura14 – FTIR da blenda 25Q/75A de quitosana e agarana obtido pelo método <i>casting</i> .....	33
Figura15 – FTIR da blenda 50Q/50A de quitosana e agarana obtido pelo método <i>casting</i> .....	33
Figura16 – FTIR da blenda 75Q/25A de quitosana e agarana obtido pelo método <i>casting</i> .....	34

Figura17 – FTIR dos filmes e blendas desenvolvidos por casting sem reticulação (■):100Q; (■):25Q/75A; (■):50Q/50A; (■):75Q/25A; (■) 100A.....	34
Figura18 – TG dos filmes e blendas desenvolvidos por casting sem reticulação: (■):100Q (■):25Q/75A; (■):50Q/50A; (■):75Q/25A; (■) 100A.....	36
Figura19 – DTG dos filmes e blendas desenvolvidos por casting sem reticulação (■):100Q; (■):25Q/75A; (■):50Q/50A; (■):75Q/25A; (■) 100A.....	36
Figura20 – Aspecto claro da blenda 25Q/75A (A) e aspecto escurecido da blenda 25Q/75A após reticulação com glutaraldeído (B).....	37
Figura21 – Grau de intumescimento das blendas sem reticulação em tampão PBS a e pH 7,4 a temperatura ambiente. (■): 25Q/75A; (●):50Q/50A; (▲): 75Q/25A; (▼) 100Q.....	381
Figura22 – Adsorção de BSA em tampão PBS a pH 7,4 temperatura 37 °C nas blenda: reticuladas em glutaraldeído 2,5% . (■):25Q/75A; (■):50Q/50A; (■):75Q/25A (■)100Q.....	39
Figura23 – Adsorção de fibrinogênio em tampão PBS a pH 7,4 a temperatura 37 °C na: blendas reticuladas em glutaraldeído 2,5% . (■):25Q/75A; (■):50Q/50A; (■):75Q/25A; (■): 100Q.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Códigos e composições das blendas.....	25
Tabela 2 – Atividade anticoagulante do polissacarídeo sulfatado de <i>Gracilaria Birdiae</i> avaliada pelo teste do TTPA.....	28
Tabela 3 – A perda de massa dos filmes em estágios.....	35
Tabela 4 – Grau de intumescimento das blendas após reticulação.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
Blenda1	25Q/75A
Blenda2	50Q/50A
Blenda3	75Q/25A
FIB	Fibrinogênio
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GB	<i>Gracilaria Birdiae</i>
GlcNAc	2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose (GlcNAc)
GlcN	2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose
GLU	Glutaraldeído
QUIT	Quitosana
TAP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
TG	Termogravimétrica

## Sumário

1.1.Objetivo geral .....	15
1.2.Objetivos específicos .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1.Stents/Revestimento .....	16
2.2.Homeostase e Cascata de coagulação .....	17
2.3.Heparina .....	18
2.4.Polissacarídeos sulfatados/Agarana .....	18
2.5.Quitosana .....	19
2.5.Filmes e Blendas .....	20
2.6.Reticulação x Intumescimento de filmes.....	22
3.METODOLOGIA .....	23
3.1. Materiais .....	23
3.2. Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> .....	24
3.3.Produção das blendas Agarana-Quitosana nas diferentes proporções pelo método de <i>casting</i> . .....	24
3.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier .....	25
3.5. Termogravimetria .....	26
3.6.Reticulação das blendas/ Intumescimento.....	26
3.7. Adsorção de proteínas .....	27
4.RESULTADOS .....	27
4.1. Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> do PS .....	27
4.2.Formulação Blendas.....	29
4.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-).....	30
4.4. Análise termogavimétrica .....	34
4.5. Grau de intumescimento.....	36
4.6. Adsorção de proteínas .....	37
5.CONCLUSÕES .....	39
6.REFERÊNCIAS.....	40

## 1.INTRODUÇÃO

Com o ritmo acelerado do dia a dia e aumento no consumo de *fast food*, observa-se um aumento de incidência das doenças arterial coronária. Há uma obstrução da artéria coronária reduzindo a irrigação sanguínea no musculo do coração. As artérias podem ser bloqueadas por acúmulo de gordura.

A fim de restaurar o fluxo sanguíneo na artéria coronária muitas vezes dispositivos do tipo *stents*, tubos feitos de aço inoxidável ou liga de cobalto no formato de malha, são implantados nas artérias. Entretanto, estes dispositivos médicos podem interagir negativamente com os tecidos circundantes, causando inflamação crônica, endotelização disfuncional, irritação física, trombose e corrosão.

A fim de superar os problemas de corrosão e formação de trombos, modificações nas superfícies metálicas têm sido propostas, como revestimento polimérico sobre essas superfícies. Polímeros biodegradáveis têm sido utilizados devido suas características de biodegradação, biocompatibilidade. Polissacarídeos sulfatados provenientes de algas são macromoléculas bioativas nas quais estão presentes grupamentos sulfatos no lugar de grupos hidroxilas. Estes polímeros apresentam atividades biológicas de interesse para aplicação como revestimento, por exemplo, antitrombótica e anticoagulante..

Agarans são polímeros lineares que apresentam certo grau de substituição na sua estrutura básica. Agarana é uma mistura de uma fração neutra e cíclica (agarose) e uma aniônica (agarpectina). Os grupos sulfatos e piruvatos são encontrados na agarpectina. Algas do gênero *Gracilariales* e *Gelidiales* são fontes do polissacarídeo sulfatado que apresentam atividades anticoagulante e antioxidante.

Quitosana obtida da desacetilação da quitina apresenta uma cadeia linear, composta por unidades de D-glicosamina e N-acetilglicosamina ligadas via  $\beta(1-4)$  ligação glicosídica. Por ser biocompatível, biodegradável e não tóxica, a quitosana é usada como biomaterial na engenharia de tecidos. A disponibilidade de grupos amino e hidroxilas tornam o polímero suscetível a modificações químicas, desenvolvidas em alguns casos com o intuito de melhorar a performance deste polímero. Polissacarídeos sulfatados apresentam atividades antitrombóticas sendo uma boa opção para o desenvolvimento de um revestimento polimérico para stents, no entanto como desvantagem apresentam alta solubilidade em meio aquoso. Desse modo, a formação de um revestimento é impossibilitada. Para superar este impedimento, propôs-se uma blenda de agarana: quitosana reticulada com glutaraldeído.

O desenvolvimento de uma blenda polimérica de agarana e quitosana foi proposta a fim de agregar a atividade antitrombogênica dos polissacarídeos sulfatados aos filmes.

## **1.1.Objetivo geral**

O objetivo do trabalho foi desenvolver e realizar estudos preliminares da hemocompatibilidade de blendas poliméricas a partir seguintes polímeros: quitosana e agarana (polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae*).

## **1.2.Objetivos específicos**

- O potencial anticoagulante da agarana foi investigado pelos testes do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) e tempo de protrombina (TP);
- Blendas foram preparadas variando as proporções dos dois polímeros e reticuladas com glutaraldeído;
- As propriedades físico-químicas das blendas reticuladas foram investigadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e termogravimetria (TG);
- Para avaliar a hemocompatibilidade dos filmes reticulados, ensaios de adsorção de proteínas albumina de soro bovino (BSA) e fibrinogênio (FIB) foram realizados nas blendas desenvolvidas.



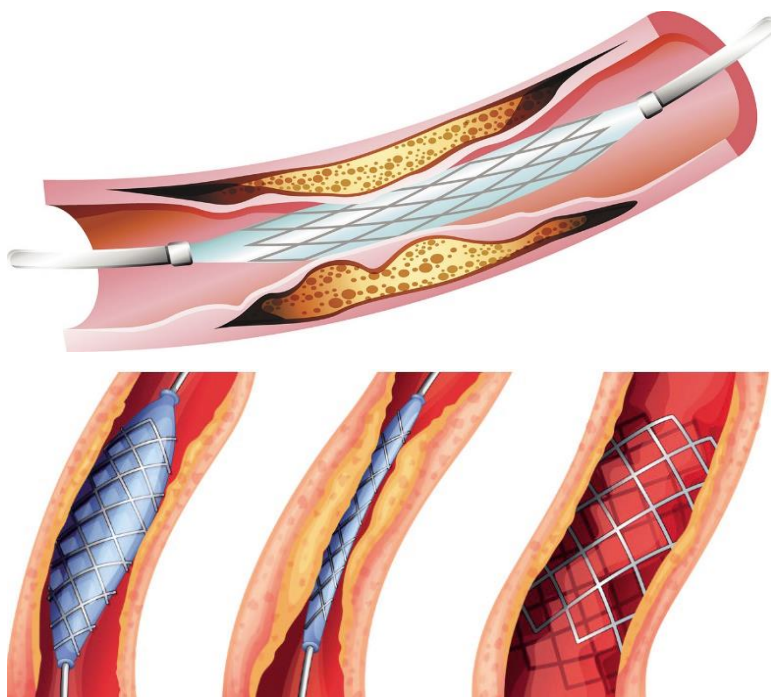
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Stents/Revestimento

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2019), globalmente 30% das mortes são causadas por doenças cardiovasculares. A doença arterial coronária (DAC) é causada por uma obstrução das artérias e vasos que irrigam o músculo do coração. Sendo também a principal causa de morte mais comum em adultos com diabetes melitus (OSTO; COSENTINO, 2010). Nos últimos anos, intervenções coronárias percutâneas se tornaram amplamente usadas nos tratamentos de doenças cardiovasculares e são as técnicas mais modernas de revascularização de artérias coronárias. Dentre os dispositivos implantáveis stents coronários são os implantes vasculares dominantes em intervenções coronárias percutâneas.

Stents são malhas cilíndricas expansíveis utilizadas para restaurar o fluxo sanguíneo suprimido pela doença arterial coronária. Entretanto, o dispositivo pode interagir negativamente com os componentes sanguíneos promovendo a formação de coágulos. Para se contornar esses problemas muitas vezes faz-se necessário o desenvolvimento de revestimentos poliméricos biocompatíveis a fim de melhorar a hemocompatibilidade do dispositivo (REBELO, 2017, p.240).

**Figura 1: Implantação de stent metálico intravascular.**



## 2.2. Homeostase e Cascata de coagulação

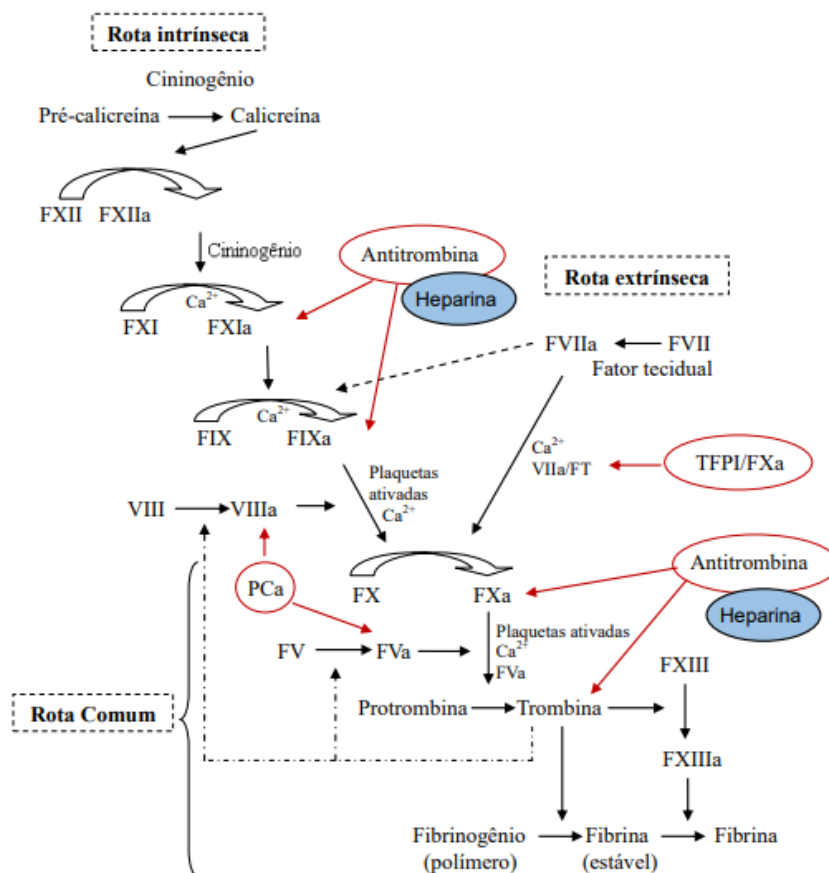
Hemostasia é o conjunto de eventos bioquímicos e mecânicos que possibilitam a permanência da circulação sanguínea líquida nos vasos. O sistema homeostático é composto por plaquetas, vasos, proteínas da coagulação, anticoagulantes naturais e um sistema de fibrinólise.

Quando um vaso é lesado há a formação de um coágulo para coibir hemorragia para reparar a lesão e depois há a dissolução do coágulo formado. Biomateriais quando em contato com o sangue podem induzir inflamação e trombose. Desse modo, faz-se necessário melhorar a hemocompatibilidade de superfícies (MORAES, 2014, p. 28)

A iniciação da coagulação do sangue se faz mediante expressão do seu componente crítico, o fator tecidual (FT), e sua exposição ao espaço intravascular.

Ensaio típico de coagulação tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) investigam fatores associados às vias extrínseca e intrínseca respectivamente. Assim, TP investiga os fatores XII, X, II e I enquanto que o TTPA investiga os fatores XI, IX e X.

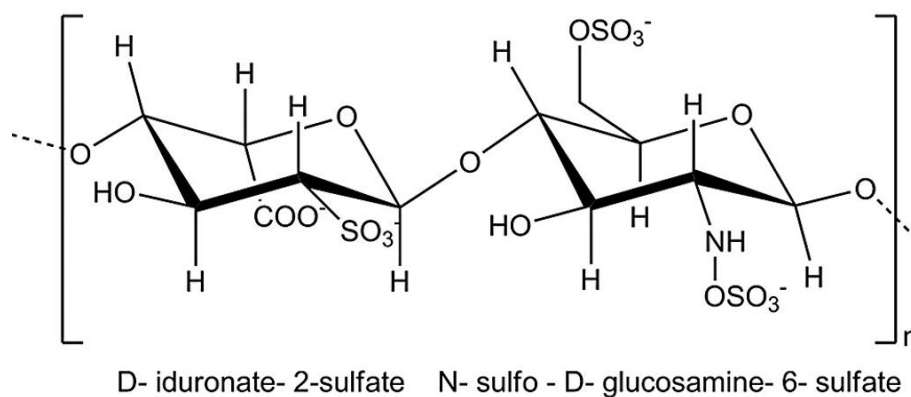
**Figura 2 : cascata da coagulação** mostrando rota intrínseca e extrínseca.



### 2.3.Heparina

Heparina é um agente anticoagulante e antitrombótico clássico composta por unidades de ácido hexurônico e D-glicosamina, onde o ácido hexurônico pode ser ácido L-idurônico ou D-glicurônico, ligadas por ligações 1,4-glicosídicas (MORAES, 2016, p .28). A presença de grupos carboxila e extensa sulfatação de O e N confere natureza aniônica da heparina.

**Figura 3: Estrutura da unidade dissacarídica repetitiva de heparina.**



Fonte: RAVEENDRAN, 2013, p, 616.

O anticoagulante apresenta uma grande atividade da antitrombina (ATIII) para subsequente inibição do fator Xa e IIa (trombina ). Entretanto o fármaco apresenta desvantagens por ser extraído de intestinos suínos e bovinos. Requer um extenso processo de purificação a fim de evitar contaminação dos pacientes e um grande número de animais para suprir a demanda mundial por heparina. Apresenta ainda alta geração de subprodutos durante processamento. (Taylor et al , 2019, p 2). Nesse contexto, a busca por novos materiais que simulem uma superfície heparinizada e não apresentem as desvantagens da droga intensificou-se.

Nesse contexto, polissacarídeos de algas marinhas são moléculas promissoras na substituição da heparina. Pois, são moléculas sulfatadas semelhante a heparina apresentando potencial anticoagulante e antitrombótico, não são tóxicas, disponíveis na natureza e de fácil obtenção.

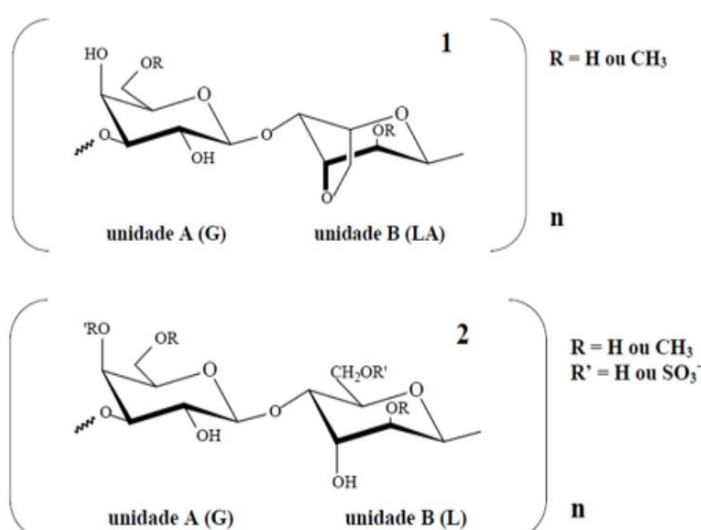
### 2.4.Polissacarídeos sulfatados/Agarana

Polissacarídeos são polímeros naturais e macromoléculas formadas pela união de monômeros. Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas bioativas encontradas em algas marinhas, possuindo alguns grupos hidroxila dos resíduos de açúcar substituídos por grupamentos sulfato (PÉREZ-RECALDE et al., 2014, p.1370). As macromoléculas possuem atividades biológicas como anticoagulante, antitrombótica, anti-tumor, , antioxidante (CHEN; HUANG, 2018, p. 746; LIU et al., 2018, p. 2), antiviral, anti-hiperlipêmica e anti-HIV (BATTULGA, 2019, p. 909). Carragenanas e agaranas são os PS de algas marinhas mais

conhecidos (VASCONCELOS et al, 2015, p.11).

Agarana é um polissacarídeo linear formado por uma fração neutra a agarose e uma fração aniônica a agarpectina que contém grupos aniônicos como sulfatos. (CHAGAS, 2018, p.22). A agarose apresentada na Figura 4 (A) é um copolímero alternado de (1→3)-β- D-galactose (unidade A) e (1→4)-3,6-anidro- α -L-galactose (unidade B). A agarpectina é semelhante a agarose, mas apresenta grupo aniônicos como piruvato, glicuronato e sulfato (VASCONCELOS et al., 2015, p. 11). Agarpectina está representada na figura 4(B) é formada por (1→3)-β- D-galactose (unidade A) e (1→4)-α -L-galactose (unidade B).

**Figura 4 : Agarose (A) e Agarpectina(B)**



Fonte: CHAGAS, 2018, p 22.

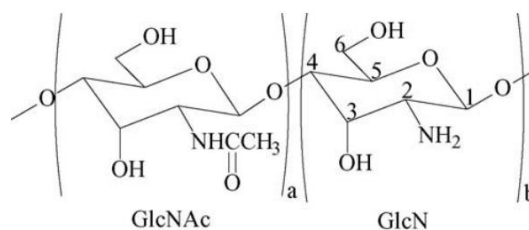
Propriedades anticoagulantes foram detectadas em polissacarídeos sulfatados extraídos de algas vermelhas ( CHAGAS, 2018, p. 58). A atividade anticoagulante dos polissacarídeos são avaliadas pelos testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e tempo de protrombina (TP) que investigam as vias intrínseca e extrínseca respectivamente.

## 2.5. Quitosana

A quitosana é um biopolímero biocompatível, não-toxico, biodegradável, antioxidante e anticâncer. O biopolímero é composto de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN). A última unidade corresponde a mais de 50-60% do polímero (SILVA, 2017, p.7).

Obtida da N-desacetilação da quitina que tem seus grupos acetamido de unidades GlcNAc hidrolisados resultando em unidades GlcN (GUINESI; CAVALHEIRO, 2006, p. 128).

**Figura 5: Estrutura química quitosana.**



Fonte: CHEUNG, 2006, P. 127

Devido a protonação de grupos amino das unidades GlcN, cargas positivas estão presentes ao longo da cadeia e o polímero torna-se solúvel em meio aquoso moderadamente ácido. Comportando-se ainda como eletrólitos catiônicos nesses meios, as propriedades antibacterianas da quitosana são atribuídas à interação de sua cadeia carregada positivamente com as cargas negativas presentes nas membranas celulares de bactérias (KONG, 2010, p.52).

Os grupos hidroxila primário e secundário além do grupo amino tornam a molécula mais suscetível a modificações químicas interferindo também nas características físico-químicas da quitosana (CHEUNG, 2015, p 5157). A sulfatação da quitosana tem se mostrado eficiente para melhorar a hemocompatibilidade do polissacarídeo (MORAES *et al.*, 2016. P.71). Curativos para feridas e nanossistemas para a entrega de fármacos são exemplos de aplicações da quitosana na Medicina e Indústria Farmacêutica.

## 2.5.Filmes e Blendas

Filmes são barreiras a agentes externos nos quais a interação dos componentes do material determinam as propriedades mecânicas. As características dos filmes dependem das concentrações, temperatura de secagem e do suporte utilizado (THARANATHAN, 2003, p 28). Os filmes apresentam propriedades específicas que variam de acordo com o material escolhido. A técnica de *casting* é a mais utilizada para obtenção de filmes em escala laboratorial, dispersando-se a solução precursora do filme sobre uma superfície uniforme. Quando o solvente evapora (naturalmente ou em estufa), o filme é formado sobre a superfície.

Blenda polimérica é a hibridização ou mistura de polímeros. A fim de se melhorar as características físicas, químicas e mecânicas, os constituintes das blendas são escolhidos combinando as vantagens destes ou compensando as possíveis deficiências dos componentes individuais. A cadeia polimérica da blenda molecularmente pode apresentar um sistema homogêneo, ou seja, miscível. Desse modo, os sistemas podem mostrar uma miscibilidade total, miscibilidade parcial ou imiscibilidade. Para que haja homogeneidade ou miscibilidade, de acordo com a termodinâmica, a energia livre de Gibbs de mistura deve ser menor que zero

(PRADO, 2017, p.10).

A adição de quitosana em blendas melhora a estabilidade térmica e propriedades mecânicas do híbrido (MUJTABA et al., 2019, p.890) enquanto que o aumento do polissacarídeo sulfatado potencializa a bioatividade dos filmes compósitos. Scaffold de agarose e quitosana foram desenvolvidas para reduzir o tamanho dos poros na estrutura e aumentar a estabilidade em meio aquoso com uso em potencial para aplicações biomédicas como recuperação de tecidos (FELFEL et al., 2018, p. 59).

No desenvolvimento de um material híbrido ou blenda a miscibilidade entre os polímeros e a homogeneidade da mistura são fatores determinante para o sucesso do material (KOH, 1998, P.129).

A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) determina a miscibilidade de um sistema polimérico. Quando a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é menor que zero, teremos uma blenda miscível, ou seja, a blenda polimérica é termodinamicamente favorável.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

$\Delta G$ - variação da energia livre de Gibbs;

$\Delta H$ - variação da entalpia (Energia de cada polímero da reação);

$\Delta S$ - variação da entropia (Grau de desordem);

T- Temperatura absoluta.

Quando os componentes apresentam estruturas similares a miscibilidade é  $\Delta G < 0$ . Ligações de hidrogênio e força dipolo-dipolo são interações intermoleculares que favorecem a miscibilidade da mistura.

Miscíveis: interações específicas entre os segmentos dos polímeros impedem a separação de fases. Polímeros formam uma única fase misturados em nível molecular. Apresentam um valor de Tg entre o valor das Tg's dos polímeros puros.

Imiscíveis: são independentes. Número de componentes determina número de fases. Apresentam Tg iguais aos dos polímeros individuais.

Parcialmente miscíveis: essas blendas apresentam valores de Tg relativos aos seus componentes, entre os valores dos polímeros individuais.

Blendas imiscíveis, de acordo com a figura 6 , podem apresentar sinergismo ( propriedades dos polímeros puros são superiores a blendas em determinadas composições), aditivismo ( propriedades não são alteradas nas blendas em relação aos polímeros puros) ou incompatibilidade ( as propriedades atingidas pelas blendas em determinadas composições são inferiores as propriedades dos polímeros puros).

**Figura 6: Compatibilidade de entre polímeros para obtenção de blendas.**



Fonte : VIEGAS, 2016, p 14

## 2.6.Reticulação x Intumescimento de filmes

Utilização de biopolímeros é vantajoso se comparado a polímeros sintéticos em função da biocompatibilidade.

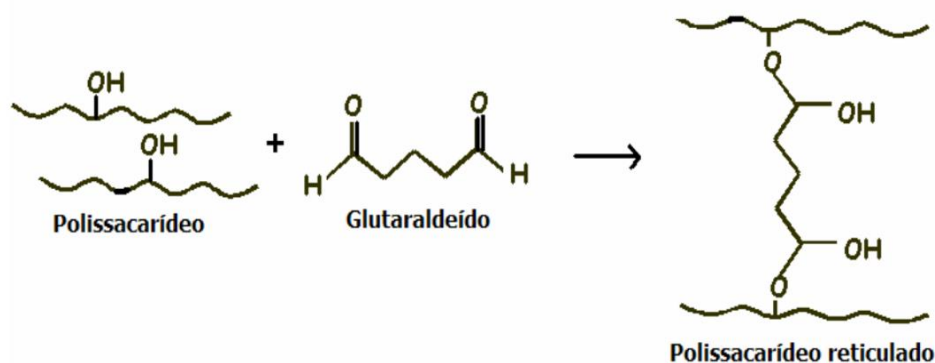
Os complexos polieletrólitos apresentam grupos ionizáveis um anionico e outro cationico. As interações eletrostáticas ocorrem entre sítios iônicos opostos dos políons. Forças intermoleculares estabelecem uma reticulação iônica estabilizada pela presença de grupos hidrofóbicos. Estas interações diretas entre as cadeias poliméricas formam redes de complexos de polieletrólitos com uma estrutura não permanente quando evitado o uso de agentes reticulantes covalentes (HAMMAN, 2010)

Em alguns casos faz-se necessário reforçar química e fisicamente a blenda para uma aplicação como revestimento. Agentes reticulantes, por exemplo o glutaraldeído, aumentam a resistência à água e melhoram a rigidez e coesão por meio da formação de ligações cruzadas (PEPPAS, et al., 2000, p. 1191).

Grupos funcionais como -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub> no polissacarídeo reagem com o aldeído formando ligações cruzadas propiciando a formação de pontes (reticulação covalente) entre as cadeias do polissacarídeo (HENNINK, VAN NOSTRUM, 2002, P 223 ).

O glutaraldeído é um dialdeído, alifático líquido considerado tóxico que realiza uma reticulação covalente em polissacarídeos. Blendas e filmes de polissacarídeos estão sendo reticulados com glutaraldeído (PRADO 2017, p. 13). A reticulação de um polissacarídeo segue na figura 7

**Figura 7 - Reticulação de polissacarídeo com glutaraldeído**



Fonte : Cunha, 2006

O intumescimento trata-se da difusão de moléculas de solvente para o interior de filmes, inicialmente preenchendo espaços vazios, levando a modificações no arranjo espacial da cadeia polimérica e culminando no aumento do volume da amostra (TURBIANI, 2007, p 41). De acordo com o nível de reticulação, as ligações cruzadas entre as cadeias impedem a separação da cadeia e a entrada de solvente de baixo peso molecular na fase polimérica. Desse modo, inchamento limitado pode ser observado no polímero reticulado (LUCAS et al., 2006, p. 41)

O grau de intumescimento (GI) varia com as seguintes variáveis: interação com o solvente e grau de reticulação do filme. Quanto maior a solubilidade do filme com o meio, maior será a variação do GI. (TURBIANI, 2007, p. 42)

Quando o intumescimento é ilimitado o polímero absorve as moléculas do solvente antes da dissolução total. Já para uma interação limitada entre polímero e solvente, a cadeia polimérica não é separada completamente. Ou seja, há uma porção de solvente no polímero e outra de solvente puro ou com polímero diluído (TURBIANI, 2007, p. 43).

### 3.METODOLOGIA

#### 3.1. Materiais

Quitosana adquirida da Sigma-Aldrich (Brasil), Albumina sérica bovina (BSA CÓD. A2153) da Sigma Aldrich e fibrinogênio de plasma bovino (CÓD. F8630-16) também da Sigma Aldrich, Hidróxido de sódio (NaOH) da Labsynth e glutaraldeído da VETEC Química Fina (Brasil).

O polissacarídeo sulfatado foi cedido pelo Prof. Bartolomeu Souza do Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Ceará. Para a obtenção do PS da alga vermelha *Gracilaria birdiae* coletada na praia de Trairí no litoral do Ceará. Foi utilizada a metodologia de extração descrita por BARTOLOMEU et al. (2012).

Sangue humano foi coletado de doadores saudáveis em tubos de 3,6 mL contendo citrato



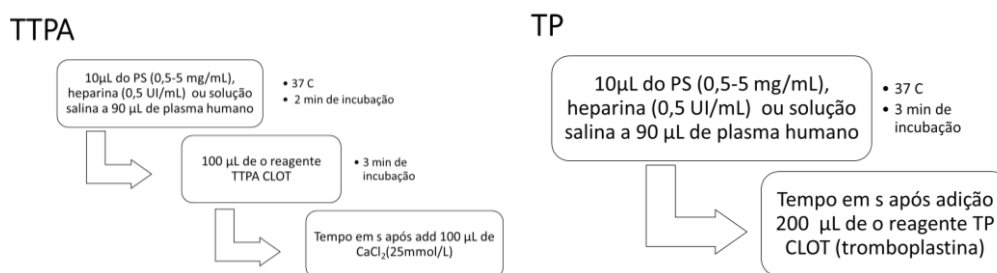
3,2% e centrifugado a 1165 G por 15 minutos. Kits para testes TTPA CLOT e TP CLOT da Bios Diagnóstica.

### 3.2. Atividade anticoagulante *in vitro*

Tempo de tromboplastina parcialmente ativado (TTPA) foi analisado com o kit CLOT (BIOS diagnóstica). Utilizou-se plasma humano rico em plaquetas (PRP) e heparina foi utilizada como controle positivo. Para o TTPA, foram adicionados 10µL do PS (0,5-5 mg/mL), heparina (0,5µg/mL) ou solução salina a 90 µL de plasma humano incubados a 37 °C durante 2 minutos, sob agitação magnética. Então foi adicionado 100 µL de o reagente TTPA CLOT (fosfolípido que é um substituto plaquetário) à mistura e incubados por mais 3 minutos. O tempo de coagulação em segundos foi avaliado após o início da reação pela adição de 100 µL de CaCl<sub>2</sub>(25mmol/L). Os testes foram realizados em duplicata de acordo com o manual do fabricante. Foi obtida uma relação entre o tempo de coagulação na presença (T<sub>1</sub>) e ausência (T<sub>2</sub>) do PS.

Tempo de protrombina (TP) foi analisado com kit CLOT (BIOS diagnóstica). Utilizou-se plasma humano e heparina foi o controle positivo. Para TP, foram adicionados 10µL do PS (0,5-5 mg/mL), heparina (0,5µg/mL) ou solução salina a 90 µL de plasma rico em plaquetas (PRP) humano incubados a 37 C durante 3 minutos, sob agitação magnética. Após a adição de 200 µL de tromboplastina (reagente TP CLOT), o tempo de coagulação foi avaliado em segundos.

**Figura 8: Metodologia utilizada nos ensaios de coagulação TTPA e TP.**



Fonte : autora.

### 3.3. Produção das blendas Agarana-Quitosana nas diferentes proporções pelo método de *casting*.

A solução de quitosana 2% foi preparada com a dispersão de 1 g de quitosana em 50 mL de água deionizada a temperatura ambiente com 1,25 mL de ácido acético (2,5 % v/v) sob

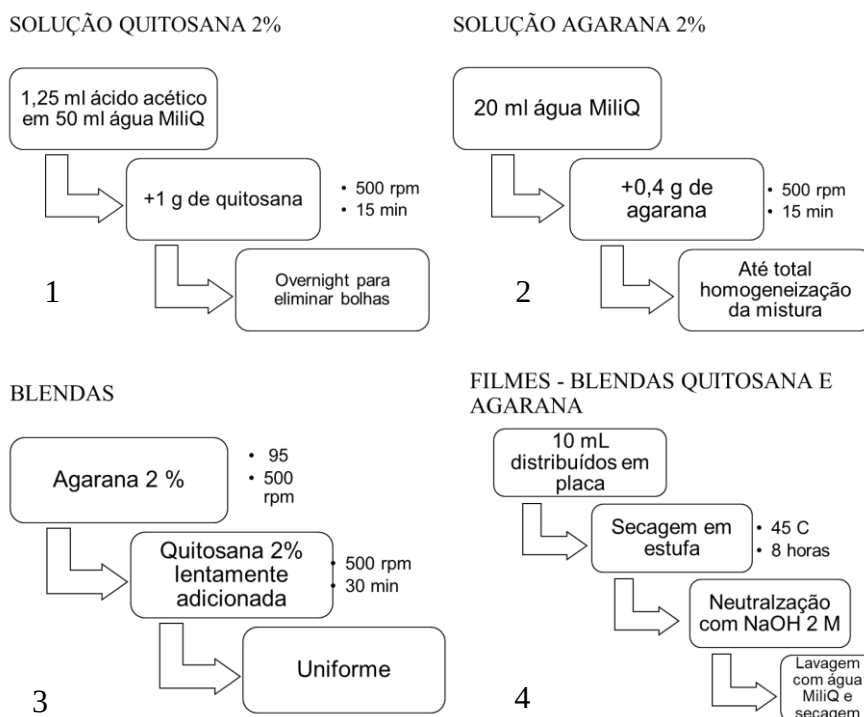
agitação vigorosa por 15 minutos. O PS- Agarana 2% foi dissolvido em água deionizada. Foram feitas as mistura das soluções em diferentes proporções de acordo com a Tabela 1 . A quitosana foi adicionada aos poucos ao PS aquecido sob agitação até completa homogeneização da solução. As misturas foram vertidas em placas e secas em estufa a 45°C até completa evaporação do solvente.

**Tabela 1 :Códigos e composições das blendas**

Código da blenda	Fração em peso da blenda		Solução de PS- Agarana (mL)	Solução de Quitosana (mL)
	Agarana (%)	Quitosana (%)		
100A	100	0	10	0
25Q/75A	75	25	7,5	2,5
50Q/50A	50	50	5	5
75Q/25A	25	75	2,5	7,5
100Q	0	100	0	10

Fonte : Autora

**Figura 9: Processo de obtenção das blendas.**



Fonte : autora

### 3.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Para avaliar os grupos funcionais presentes na estrutura dos filmes de agarana, quitosana

e nas blendas 25Q/75A, 50Q/75A e 75Q/25A formuladas sem reticulação, foi utilizada a técnica de FTIR. As análises foram feitas na Embrapa Agroindústria Topical (Fortaleza-CE), sendo conduzida em espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier modelo Cary 660 da Agilent. As medidas foram feitas em modo de refletância total atenuada (ATR) diretamente sobre os filmes. A faixa de comprimento de onda analisada foi de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Foram efetuadas 32 varreduras em cada amostra.

### 3.5. Termogravimetria

Análise Termogravimétrica (TG) dos filmes de agarana, quitosana e das blendas 25Q/75A, 50Q/75A e 75Q/25A indica a estabilidade térmica dos filmes sem reticulação quando submetidos à aquecimento. A análise foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Adsorção e Captura de  $\text{CO}_2$  (LPA) em um equipamento Analisador térmico simultâneo STA 409 C/CD da marca Netzsch, a partir da temperatura ambiente até 600°C, em atmosfera ar sintético, com fluxo de 20 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C / min em alumina. Foi obtido um gráfico do percentual de massa perdida em função da temperatura.

### 3.6. Reticulação das blendas/ Intumescimento

Foi realizada a reticulação das amostras a fim de se reduzir a solubilidade das blendas em solução. As blendas já padronizadas foram completamente imersas em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) por 1 hora. 1,25 ml de glutaraldeído foi diluído para 50 ml com água deionizada. Em seguida, as blendas foram lavadas com etanol três vezes a fim de se retirar o excesso do reticulante e com água destilada. Foram secas em temperatura ambiente.

O grau de Intumescimento das blendas foi calculado antes e após a reticulação a fim de comprovar a reticulação da amostra. A massa inicial de uma amostra das blendas foram pesadas e imersas em tampão PBS pH: 7,4. A blenda foi retirada do solvente, retirou-se o excesso de umidade na superfície da amostra com o papel de filtro e posteriormente a amostra foi pesada.

$$GI = \frac{(M_u - M_s)}{M_s} \text{ (Equação 2)}$$

Onde GI é o grau de intumescimento do filme;

$M_u$  é a massa úmida pesada;

$M_s$  é a massa seca.

### 3.7. Adsorção de proteínas

As blendas reticuladas foram padronizadas com uma área de 1 cm<sup>2</sup> e imersas em solução PBS pH 7,4 por 1 hora a 37 °C em banho termostático com agitação suave. O PBS foi removido e 3 mL de solução de BSA ou fibrinogênio (1 mg/mL) em PBS (pH 7.4) foi adicionada e incubada a 37°C por 2 horas. As absorbâncias das soluções de fibrinogênio e BSA foram medida em espectrofotômetro Biomate 3S em 280 nm. A curva padrão da proteína foi obtida previamente. A quantidade de proteína adsorvida nos filmes foi estimada pela equação 3.

$$Q = \frac{(C_0 - C_f) * V}{A} \text{ (Equação 3)}$$

C<sub>0</sub> e C<sub>f</sub> são concentrações de proteínas antes e depois da adsorção,

V é o total volume da solução em mL;

A é a área do filme em cm<sup>2</sup>.

## 4.RESULTADOS

### 4.1. Atividade anticoagulante *in vitro* do PS

O teste de TTPA simula a ativação do mecanismo intrínseco e comum da coagulação sanguínea. O prolongamento do teste em relação ao grupo controle indica a presença de um inibidor da via intrínseca (fatores VIII, IX, XI e XII). A presença do cálcio no plasma é necessária a fim de se ativar a cascata da coagulação. A atividade anticoagulante foi estimada utilizando kits padrões de coagulação TP e TTPA da CLOT

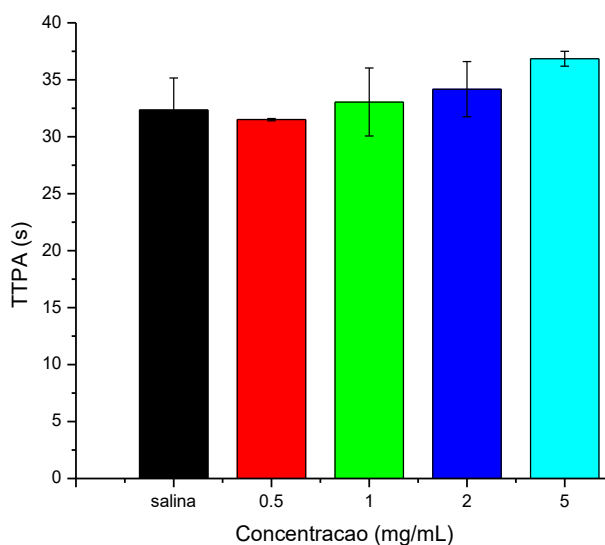
O polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae* aumentou o tempo de coagulação no teste de TTPA (Figura 5) em função da concentração. O tempo de coagulação sanguínea para o teste de TTPA após a adição do polissacarídeo sulfatado nas concentrações de 0,5, 1, 2, 5 mg/ml foi respectivamente de 31,5s ± 0,1, 33,05s ± 2,98, 34,17s ± 2,42 e 36,85 s ± 0,65. A maior concentração utilizada (5mg/ml) prolongou o TTPA em 1,13 vezes o controle (32,35 s). O resultado está de acordo com a literatura (GHLISSI et al, 2019, p 339) que achou o valor de 1,33 vezes com a concentração de 500µg/mL do PS extraído da *Globularia alypum*. Foi obtida uma relação entre o tempo de coagulação na presença (T<sub>1</sub>) e ausência (T<sub>2</sub>) do polissacarídeo sulfatado.

**Tabela 2: Atividade anticoagulante do polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria Birdiae* avaliada pelo teste do TTPA**

Concentração do PS(mg/mL)	TTPA (S)	T <sub>1</sub> /T <sub>0</sub>
0,0	32,35 ± 2,80	-
0,5	31,50±0,10	0,97
1,0	33,05±2,98	1,02
2,0	34,17±2,42	1,05
5,0	36,85±0,65	1,13
Heparina 0,5 µg/mL	>200 s	-

Fonte: autora

**Figura 10. Atividade anticoagulante do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae* avaliada pelo teste de tempo de tromboplastina ativado (TTPA)**



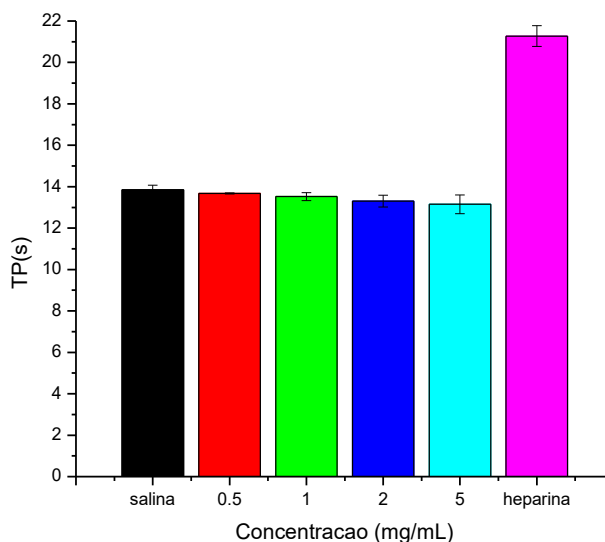
Fonte: autora

O teste de TP (tempo de protrombina) investiga o sistema extrínseco da coagulação. A adição da tromboplastina ao teste ativa o fator VII que ativa a via extrínseca. Há a formação do complexo protrombinase (ancorado pela tromboplastina). Trombina é gerada e atua no fibrinogênio formando a fibrina (estabilizada pelo fator XIII). O tempo de coagulação sanguínea prolongado para o teste de TP indicam inibição do sistema extrínseco (Figura 6)

Após a adição do polissacarídeo sulfatado nas concentrações de 0,5; 1; 2; 5 mg/ml os tempos de coagulação foram respectivamente de 13,67 s ± 0,02, 13,52 s ± 0,19, 13,3 s ± 0,28 e 13,15 s ± 0,45. A heparina apresentou o tempo de 21,27 s ± 8,09. O polissacarídeo não apresentou

ação anticoagulante sobre o sistema extrínseco de coagulação. Resultado semelhante foi reportado na literatura para o polissacarídeo sulfatado extraído de *G. acerosa* que não mostrou atividade no TP (CHAGAS, 2018, p 60).

**Figura 11.: Atividade anticoagulante do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae* avaliada pelo teste de tempo de protrombina (TP).**



Fonte: autora

Polissacarídeos sulfatados são reportados como agente anticoagulante, antioxidante e anti-inflamatório (CHAGAS, 2018, p 61; SANTOS, 2026, p.30). A eficiência do PS tem sido relacionada na literatura com os monossacarídeos formadores do polímero, número e posição dos grupos sulfatados (GHLISSI et al, 2019, p 339). A densidade de cargas ao redor do grupo sulfatado possuem importante atividade biológica. A atividade como anticoagulante aumentou com o aumento do grau de substituição após modificações químicas e com o aumento da massa molar do polissacarídeo estudado por LLOYD et al., (2017, p. 453). Polisacarídeos sulfatados extraídos de algas verdes tiveram seu grau de sulfatação aumentado quimicamente melhorando atividade nos teste de TTPA e TP. Provavelmente houve um aumento da compatibilidade geométrica entre o polissacarídeo e sítios de ligação dos fatores de coagulação antitrombina Xa e IIa (ADRIEN et al., 2019, p 301).

## 4.2. Formulação Blendas

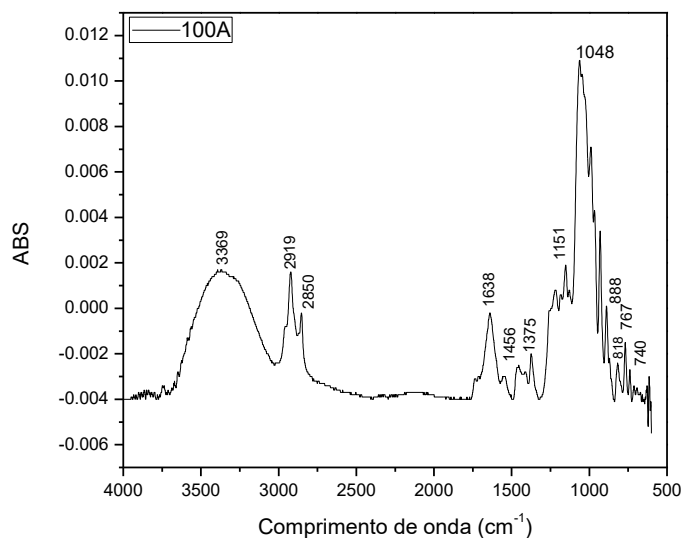
A agarana por apresentar grupos sulfatos em sua cadeia aumenta a repulsão eletrostática

com proteínas como o BSA. Entretanto, o polímero é solúvel em água. A fim de formar filmes insolúveis, a agarana foi misturada com a quitosana, combinando assim vantagens dos dois materiais, devido a formação de um complexo estável polieletrólítico. Blendas do polissacarídeo sulfatado (agarana) com quitosana foram obtidas pelo método de *casting*, variando-se as concentrações dos polímeros. A combinações foram as seguintes 75:25 (25Q/75A), 50:50 (50Q/50A) e 25:75 (25Q/75A).

#### 4.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-)

O FTIR é aplicado a fim de investigar a composição dos grupos funcionais de filmes e blendas. Fornece informações moleculares dos polímeros e suas interações (HAMDI et al., 2019 p.807).

**Figura 12: FTIR- do filme do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *Gracilaria birdiae* obtido pelo método *casting*.**



Fonte: autora

A atividade anticoagulante e antitrombótica do PS se deve a presença de grupamentos sulfato no polissacarídeo ligados aos resíduos de galactose na forma de éster ( $O-SO_3^-$ ) (CHAGAS, 2018, P. 52).

As bandas  $1375\text{ cm}^{-1}$  e  $1225\text{ cm}^{-1}$  demonstram a presença de Éster sulfato e  $O=S=O$  estiramento assimétrico respectivamente, ou seja, indicam a presença de grupamentos sulfato na molécula (JUNIOR, 2018, p. 51).

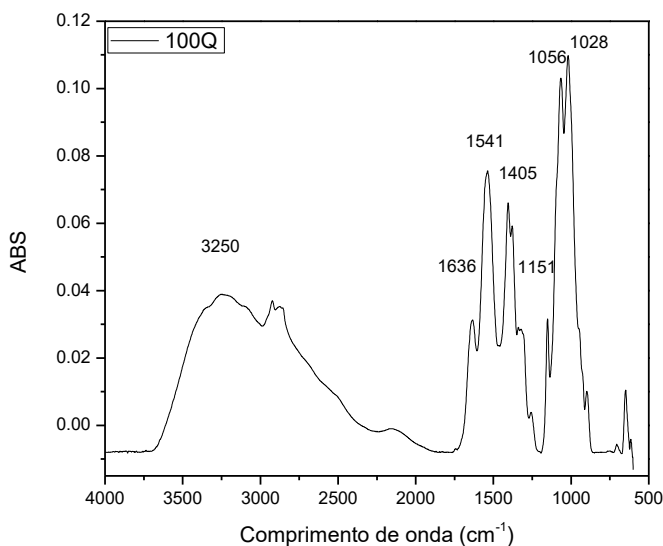
As bandas  $825\text{ cm}^{-1}$  (Galactose-4-sulfato) e  $767\text{ cm}^{-1}$  (Galactose-6-sulfato) indicam a posição dos grupos sulfato 4-O-sulfato no resíduo de D-galactose e na 6-O-sulfato da L-galactose da agarpectina (LYOYD et al., 1961, p 110).

Já as bandas  $750\text{ cm}^{-1}$  e  $880\text{ cm}^{-1}$  indicam sulfatação no C-2 de 3,6-anidro-L-galactose e no C-4 da unidade D-galactose presentes na agarose (LYOYD et al., 1961, p 101).

As demais bandas significativas demonstram a presença de um esqueleto da galactana (C-O + C-OH) em  $1048\text{ cm}^{-1}$ , (C-O-C) de 3,6-anidrogalactose em  $930\text{ cm}^{-1}$ . A banda  $893\text{ cm}^{-1}$  caracteriza o polissacarídeo como sendo ágar (CHAGAS, 2018, p.52).

O filme de quitosana exibe uma banda característica entre  $3000$  e  $3500\text{ cm}^{-1}$  com pico em  $3250\text{ cm}^{-1}$  atribuído a  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{OH}$ . O pico  $1650\text{ cm}^{-1}$  indica o estiramento da amida (C=O-NHR) e o pico  $1540\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de angulação na ligação do grupo amino (NH) (CARNEIRO et al, 2013, p 1075). A banda  $1151\text{ cm}^{-1}$  típica da ligação glicosídica  $\beta$  (1-4) entre unidades monoméricas da quitosana. O pico em  $1057\text{ cm}^{-1}$  devido ao alongamento da ligação (C-O-C) no anel glicosídico. Já em  $1022\text{ cm}^{-1}$  tem-se a ligação C-N (MORAES et al, 2014, p.50).

**Figura 13: FTIR do filme de quitosana obtido pelo método *casting*.**



Fonte: autora

As blendas 1, 2 e 3 mostram uma combinação dos grupos funcionais presentes na quitosana e no PS-agarana. Aumentando a quantidade de quitosana nas blendas, tem-se um aumento da intensidade das bandas  $1560\text{ cm}^{-1}$  referente a ligação NH e  $1380\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação assimétrica angular do da ligação CH.

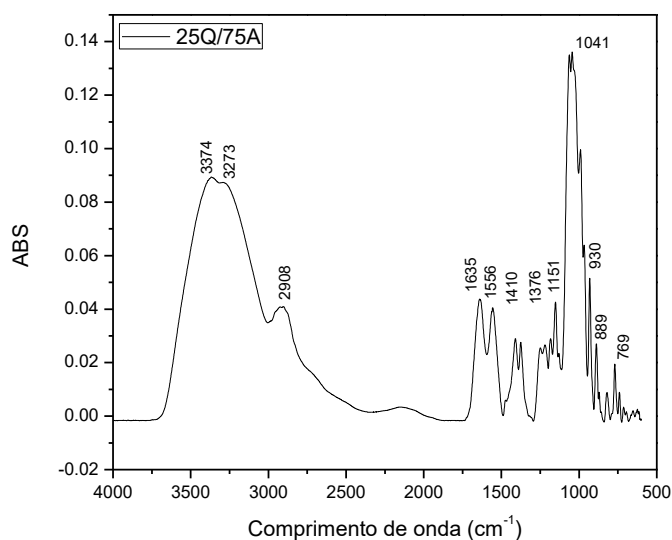


As bandas típicas do  $\text{-NH}_2$  e  $\text{-OH}$  apareceram em uma frequência ligeiramente maior nas blendas  $3368\text{ cm}^{-1}$  em relação a posição de  $3250\text{ cm}^{-1}$  no filme de quitosana. A mudança foi atribuída, em trabalhos anteriores, a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos  $\text{-NH}_2/\text{-OH}$  da quitosana e os grupos  $\text{-OH}$  do polissacarídeo (FELFEL, 2018, p.64; TRIVEDI; RAO; KUMAR, 2013, p. ).

O filme de PS-Agarana puro e as blendas mostraram as bandas características das agarras em  $930\text{cm}^{-1}$  (3,6-anidrogactose),  $1151$  e  $1040\text{cm}^{-1}$  (C-O)

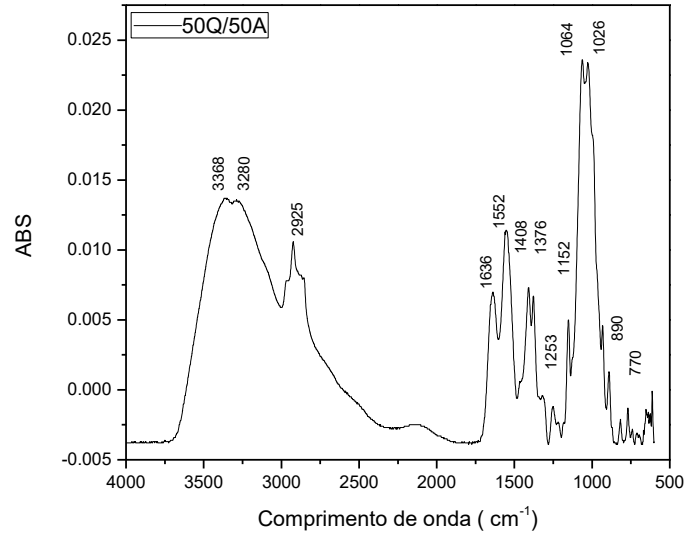
As blendas exibiram as bandas características dos grupos sulfatados presentes no polissacarídeo ( $750, 880, 1375, 1225\text{ cm}^{-1}$ ).

**Figura 14: FTIR da blenda 1 de quitosana e agarana obtido pelo método *casting***



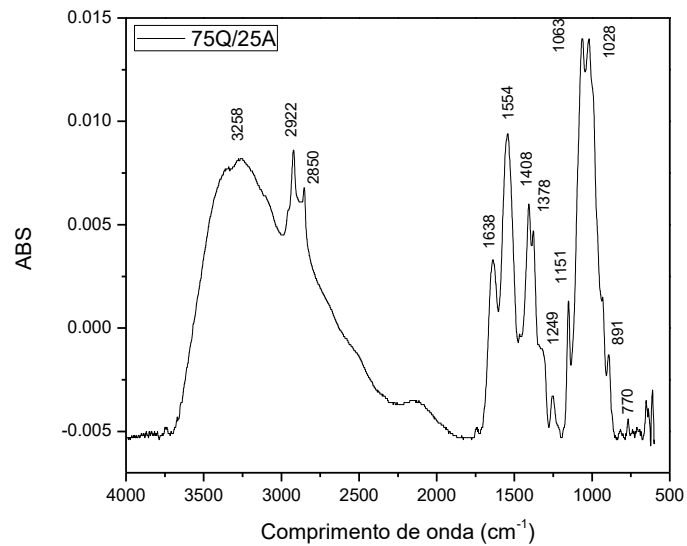
Fonte: autora

**Figura 15: FTIR da blenda 2 de quitosana e agarana obtido pelo método *casting*.**



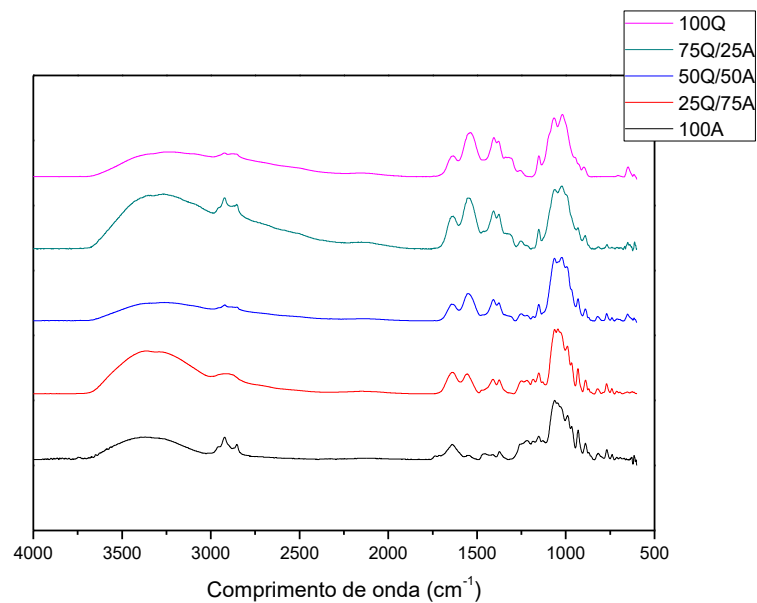
Fonte: autora

**Figura 16: FTIR da blenda 3 de quitosana e agarana obtido pelo método *casting*.**



Fonte: autora

**Figura 17: FTIR dos filmes e blendas desenvolvidos por casting sem reticulação: (■):100Q; (■):.75Q/25A; (■): 50Q/50A; (■): . 25Q/75A; (■): 100A**



Fonte: autora

#### 4.4. Análise termogravimétrica

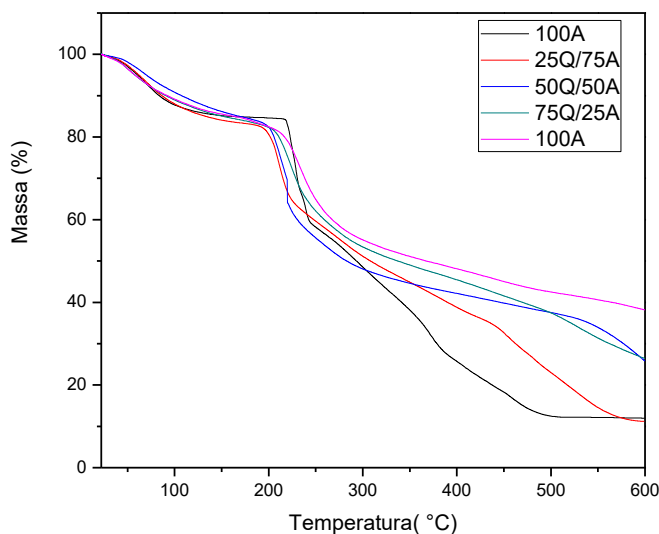
As curvas termogravimétricas (TGA) e suas derivadas (DTG) são apresentadas nas Figura 18 e 19. A perda de massa dos filmes foi observada em nos seguintes estágios descritos na tabela 3:

Primeiro estágio deve-se a perda de humidade dos filmes que ocorreu entre 90 e 100°C. Segundo estágio mostra a decomposição inicial dos polissacarídeos. A temperatura de decomposição das blendas híbridas (Figura 16) foram inferiores (210°C, 220°C ,223 °C) à temperatura da quitosana e agarana de 234°C e 228 °C respectivamente. Resultado atribuído à redução de peso molecular da quitosana aquecida durante a preparação da blenda (FELFEL et al., 2019, p.63).

A 50:50 (50Q/50A) mostrou um aumento massa residual quando comparado com as outras blendas. Esse resultado foi reportado na literatura e se deve a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias de quitosana e -agarana (FELFEL et al., 2019, p.63). Estudos anteriores obtiveram um aumento da massa residual da blenda devido a ligações covalentes obtidas entre quitosana e agarose via crosslinking com genipina (CHAUDHARY et al., 2015, p.2).

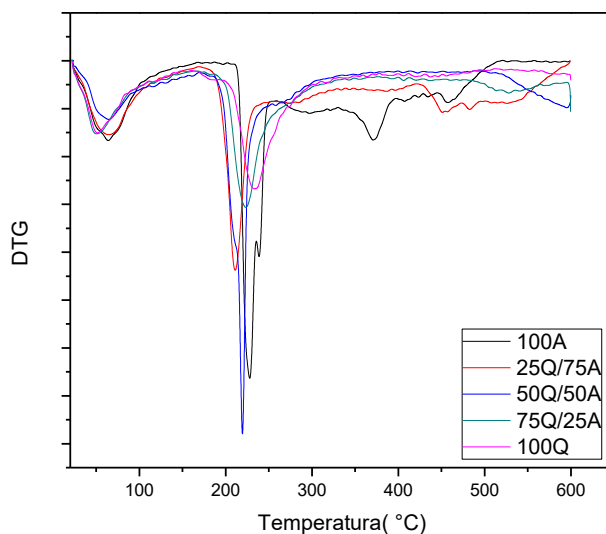
Conforme foi adicionado quitosana nas blendas houve um aumento da temperatura de decomposição das blendas 25:75 (25Q/75A), 50:50 (50Q/50A) e 75:25 (25Q/75A) respectivamente 210°C, 220°C e 223 °C resultado atribuído a estabilidade térmica adicionada às blendas pela estrutura semicristalina da quitosana(VIEGAS, 2016 , P.56).

**Figura 18: TG dos filmes e blendas desenvolvidos por casting sem reticulação:**  
 ( ■ ):100Q; ( ■ ):25Q/75A; ( ■ ): 50Q/50A; ( ■ ): . 75Q/25A; ( ■ ): 100A.



Fonte: autora

**Figura 19: DTG dos filmes e blendas desenvolvidos por casting sem reticulação:**  
 ( ■ ):100Q; ( ■ ):25Q/75A; ( ■ ): 50Q/50A; ( ■ ): . 75Q/25A; ( ■ ): 100A.



Fonte: autora

#### 4.5. Grau de intumescimento

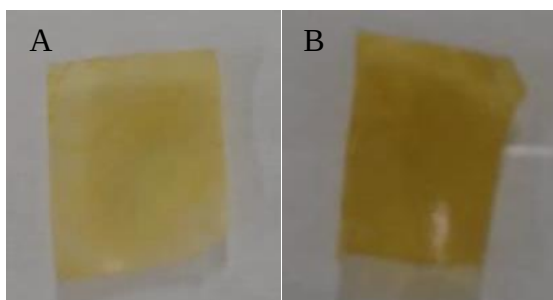
O complexo polieletrólítico formado entre a agarana e a quitosana é o resultado da interação eletrostática entre grupos carregados negativamente (poliânion) e grupos amino da quitosana carregados positivamente (policátion)(MACIEL, 2015, p 14). As interações conferem propriedades únicas diferentes daquelas apresentadas pelos componentes iniciais melhorando a estabilidade química. A solubilidade no meio pode se dar devido ao excesso de cargas resultante da formação de complexos não estequiométricos. Desse modo, foi realizada a reticulação covalente pelo glutaraldeído de grupos livres não reagidos como aminas e hidroxilas reduzindo assim a interação com o solvente.

Conforme adicionou-se agarana nas blendas houve um maior intumescimento dos filmes (figura 19). A agarana favorece as interações com solventes e promove maior intumescimento da amostra. A fim de reduzir o intumescimento e solubilidade dos filme em solução a 25:75(25Q/75A), 50:50 (50Q/50A), 75:25 (75Q/25A) e o filme de quitosana foram reticulados em glutaraldeído 2,5%. Os grupos aldeídos e aminos livres na quitosana foram reticulados formando uma base *Schiff* (C=N). O excesso do glutaraldeído foi lavado por pelo menos 3 vezes com etanol e água deslitada com o objetivo de reduzir a toxicidade causada pelo reticulante.

O grau de intumescimento é um indicador da reticulação obtida (TURBIANI, 2007, p. 46). Um menor grau de intumescimento foi obtido pelos filmes reticulados quando comparados aqueles que não foram submetidos a reticulação (Tabela 4). Demonstrando que o glutaraldeído possa ter reduzido a solvatação dos filmes.

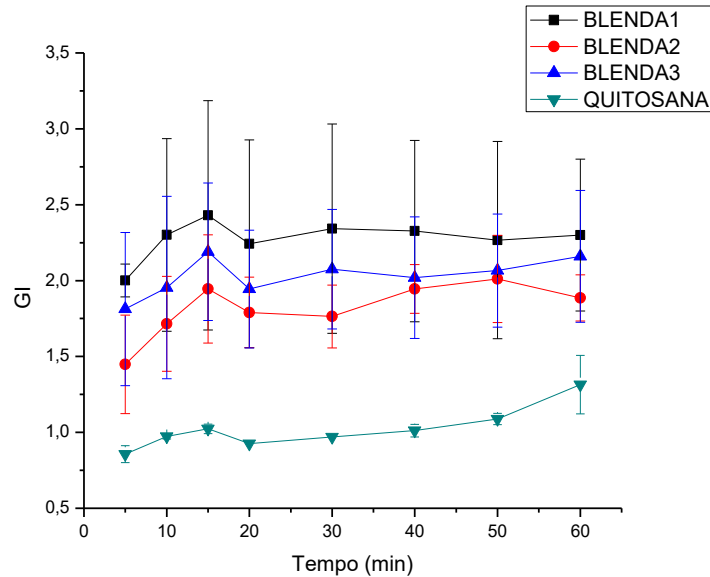
O filme, após a reticulação com glutaraldeído, mostrou-se escurecido e quebradiço (Figura 20). Resultado reportado anteriormente em literatura por MORAES (2016, p. 59) atribuído à formação de iminas ou base de *Schiff* (C=N) com grupos amino livres da quitosana.

**Figura 20: Aspecto claro da blenda 25Q/75A (A) e aspecto escurecido da blenda 25Q/75A após reticulação com glutaraldeído (B)**



Fonte: autora

**Figura .21: Grau de intumescimento das blendas sem reticulação em tampão PBS e pH 7,4 a 25 °C. (■):25Q/75A; (●):50Q/50A; (▲): 75Q/25A ; (▼): 100Q.**



Fonte: autora

**Tabela 4: Grau de intumescimento das blendas após reticulação:**

	BLEND A 25Q/75A	BLEND A 50Q/75A	BLEND A 75Q/25A	QUITOSANA 100Q
GI	1,76	0,90	0,93	0,78

#### 4.6. Adsorção de proteínas

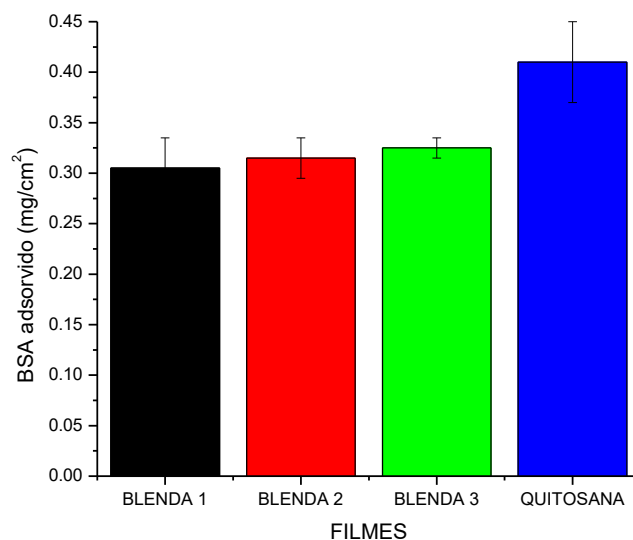
A adesão de proteínas desempenha papel importante na interação do biomaterial com os tecidos. Quando o material é implantado, ocorre uma interação das proteínas com a superfície. Características da superfície assim como parâmetros da própria proteína influenciam no processo. A adsorção de proteínas na superfície é o primeiro passo para a formação de trombos (MORAES, 2014, p. 29). Primeiramente, proteínas de menor peso molecular são adsorvidas e substituídas por proteínas de maior peso molecular e afinidade com a superfícies *Efeito de Vroman* (,RIBEIRO, 2009, p.16 )

Superfície livre de formação de trombos deve inibir a adsorção de proteínas, a formação da trombina e adesão e agregação plaquetária. Albumina é considerada uma proteína benéfica pois a adsorção desta na superfície inibe a formação de trombos. Enquanto que o fibrinogênio não é considerada benéfica pois está relacionada com o processo de formação de

trombos (RIBEIRO, 2009, p. 17). Em função da capacidade de aderir-se as plaquetas e formar a rede de fibrina na qual agregam-se as plaquetas e elementos do sangue o fibrinogênio causa a formação de trombos (MORAES, 2014, p. 14)

A albumina do soro bovino apresenta uma estrutura semelhante a albumina humana (HSA) (FERREIRA, 2009, p.). A *albumina sérica bovina* BSA possui ponto isoelétrico em pH de 4.7 até 5.0. Em pH 7 a proteína está carregada negativamente assim como a superfície do biomaterial rico em grupos sulfatados. Observou-se uma redução de 25,3% de BSA adsorvida na blenda 1 em comparação com o filme de quitosana. Devido a presença de grupos sulfatados na blenda 1 rica em PS-agarana houve uma repulsão entre a proteína carregada negativamente e a superfície. Resultados semelhantes foram reportados na literatura para quitosana modificada quimicamente (a fim de aumentar o grau de sulfatação do polissacarídeo) que reduziu em 38,84% a quantidade de BSA adsorvida em relação a quitosana natural (MORAES et al., 2016, p. 69)

**Figura 22: Adsorção de *albumina sérica bovina* em tampão PBS a pH 7.4 a temperatura 37 °C nas blendas reticuladas em glutaraldeído 2,5% . (■): 25Q/75A; (■): 50Q/50A; (■):75Q/25A; (■): 100Q**

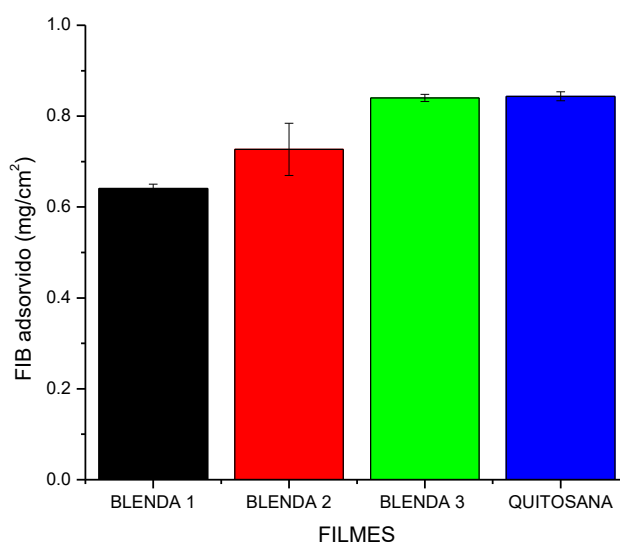


Fonte: autora

Houve uma redução de 24.18% e 13.94% das blendas 25Q/75A e 50Q/50A

respectivamente em relação a quantidade de fibrinogênio adsorvido no filme de quitosana. A blenda 75Q/25A não apresentou uma redução a adsorção de fibrinogênio significativa se comparado com o filme puro de quitosana. Em Ph 7.4 o fibrinogênio apresenta cargas negativas, desse modo, houve repulsão com as blendas carregadas negativamente em função da presença do polissacarídeo sulfatados. Pelo fibrinogênio ser uma proteína de peso molecular superior ao BSA, a proteína foi mais adsorvida sobre a superfície quando comparado ao resultado anterior de adsorção do BSA. Resultado semelhante foi reportado na literatura para a quitosana sulfatada (MORAES et al., 2016, p 70).

**Figura 23: Adsorção de Fibrinogênio nas blendas reticuladas em glutaraldeído 2,5 % em tampão PBS a pH 7,4 a 37 °C. (■):25Q/75A; (■):50Q/50A; (■):75Q/25A; (■):100Q**



Fonte: autora

## 5.CONCLUSÕES

A agarana apresentou atividade anticoagulante para a via intrínseca prolongando o tempo de coagulação no teste de TTPA em 13%. As blendas foram desenvolvidas mantiveram os picos em FTIR referentes aos grupos sulfatados presentes no filme feito apenas com a agarana. As blendas foram reticulados com glutaraldeído apresentando uma redução no grau de intumescimento e aumento da rigidez e coesão das amostras. A blenda 25Q/75A formulada apresentou uma redução de proteínas (BSA e fibrinogênio) adsorvidas sobre a superfície em 25,30% e 24,18% respectivamente. Indicando uma possível redução de formação de trombos.



Trabalhos futuros poderiam estudar o revestimento de superfícies metálicas pelas blendas desenvolvidas.

## 6.REFERÊNCIAS

ADRIEN, Amandine et al. Anticoagulant Activity of Sulfated Ulvan Isolated from the Green Macroalga *Ulva rigida*. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.291-310, 14 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md17050291>.

BATTULGA, Tungalag et al. Analysis of interaction between sulfated polysaccharides and HIV oligopeptides by surface plasmon resonance. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 125, p.909-914, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.010>.

CARNEIRO, Thiane N. et al. BSA and Fibrinogen Adsorption on Chitosan/ $\kappa$ -Carrageenan Polyelectrolyte Complexes. *Macromolecular Bioscience*, [s.l.], v. 13, n. 8, p.1072-1083, 14 jun. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.201200482>.

CHAGAS, Francisco Diego da Silva. Caracterização estrutural e propriedades bioativas dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa*. 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2018.

CHAOUCH, Mohamed Aymen et al. Access to new anticoagulant by sulfation of pectin-like polysaccharides isolated from *Opuntia ficus indica* cladodes. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 120, p.1794-1800, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.130>.

CHAUDHARY, J. P., VADODARIYA, N., NATARAJ, S. K., & MEENA, R. (2015). Chitosan-based aerogel membrane for robust oil-in-water emulsion separation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(44), 24957–24962.

CHEN, Ling; HUANG, Gangliang. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 126, p.743-746, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.261>.

CHEUNG, Randy et al. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.5156-5186, 14 ago. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md13085156>.

COMA, V.; DESCHAMPS, A.; MARTIAL-GROS, A. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-Antimicrobial assessment on dairy-related contaminants. *Journal of Food Science*, V68. N.9, p.2788-2792, 2003.

CUNHA, P.L.R. Desenvolvimento de polissacarídeos com ação terapêutica em osteoartrite. 169f. Tese de doutorado (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FELFEL, Reda M. et al. Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*, [s.l.], v. 204, p.59-67, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.002>.

FERREIRA, Ernando Silva. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Física Aplicada A Medicina, Física e Matematica, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GANESAN, Abirami Ramu et al. Development of edible film from *Acanthophora spicifera*: Structural, rheological and functional properties. *Food Bioscience*, [s.l.], v. 23, p.121-128, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.009>.

GHLISSI, Zohra et al. Sulfated polysaccharide isolated from *Globularia alypum* L.: Structural characterization, in vivo and in vitro anticoagulant activity, and toxicological profile. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [s.l.], v. 123, p.335-342, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.044>.

GUINESI, Luciana Simionatto; CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta*, [s.l.], v. 444, n. 2, p.128-133, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2006.03.003>.

HAMMAN, J.H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

HAMDI, Marwa et al. Bioactive composite films with chitosan and carotenoproteins extract from blue crab shells: Biological potential and structural, thermal, and mechanical characterization. *Food Hydrocolloids*, [s.l.], v. 89, p.802-812, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.062>.

HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 223-236, 2002.

JÚNIO, Lindauro da Costa Pereira. **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL QUÍMICO, PROPRIEDADES REOLÓGICAS E EFEITO ANTIOXIDANTE DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA ALGA MARINHA *Acanthophora spicifera***. 2018. 76 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

KACZMAREK, B.; SIONKOWSKA, A.. Chitosan/collagen blends with inorganic

and organic additive-A review. **Advances In Polymer Technology**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.2367-2376, 9 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adv.21912>.

KOH, K. A.; KIM, J. H.; LEE, D. H.; LEE, M.; JEONG, H. M. *Eur. Polymers*, v.34, p. 1229, 1998

KONG, Ming et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 144, n. 1, p.51-63, 15 nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>.

LI, Xiaoyun et al. Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 123, p.477-484, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.215>.

LIANG, Li et al. Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin ( Cucurbita pepo , Lady Godiva) polysaccharide. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 106, p.447-455, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.035>.

LIANG, Wanai et al. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 101, p.776-785, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.010>.

LLOYD, A. G.; DOGSON, K. S.; PRICE, R. G.; ROSE, F. A. Infrared studies on sulphate esters. I. Polysaccharides sulphates. *Biochimica Biophysica Acta*, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 108-115, 1961.

LUCAS, E. F., SOARES, B. G., MONTEIRO, E. Caracterização de Polímeros - determinação de peso molecular e análise térmica. Editora e-papers, Rio de JaneiroRJ, 2001.

MACIEL; V, B, V. Complexos dos polieletrólitos quitosana e pectina para obtenção de sistemas carreadores de compostos bioativos. Campinas, faculdade de engenharia química, UNICAMP, Campinas, 175 p , 2015.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Revisão. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, nº 1, p. 137-156, 2010.

MUJTABA, Muhammad et al. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 121, p.889-904, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.109>.

MORAES, Anaftália Felismino. **QUITOSANA SULFATADA:**

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA HEMOCOMPATIBILIDADE.** 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

OSTO, Elena; COSENTINO, Francesco. The Role of Oxidative Stress in Endothelial Dysfunction and Vascular Inflammation. **Nitric Oxide**, [s.l.], p.705-754, 2010. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-373866-0.00022-8>.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. PAINTER, T. J. In: **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983.

PEPPAS, N. A. *et al.* Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: A nanotechnology perspective. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v.89, n. 5, p.1191-2011.

PRADO, Natália Soares. **ESTUDO DA RETICULAÇÃO DE BLENDA DE GOMA DE LINHAÇA/ÁGAR UTILIZANDO NANOCRISTAIS DE CELULOSE COMO REFORÇO.** 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

RAVEENDRAN, S. *et al.* Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano 87 platforms. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 9, p. 605 – 626, 2013.

REBELO, Rita; FERNANDES, Margarida; FANGUEIRO, Raul. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. **Procedia Engineering**, [s.l.], v. 200, p.236-243, 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.034>.

RECALDE, Mercedes Perez *et al.* Carrageenan and agar structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 136, p.1370-1378, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.007>.

RIBEIRO, Carla de Oliveira; **COMPORTAMENTO DE PROTEÍNAS EM STENTS VASCULARES MODIFICADOS POR PULVERIZAÇÃO CATÓDICA.** 2009, Coimbra. Departamento de física, 79

SANTOS, Pablo de Castro. Obtenção de polissacarídeos sulfatados da alga vermelha comestível *Gracilaria birdiae* e suas influências na formação e morfologia de cristais de oxalato de cálcio. 2016. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SILVA, Ana Paula Prudente e. Desenvolvimento e caracterização de filmes de quitosana reforçados com whiskers de beta quitina. 2017. 47 f. Monografia (Especialização) - Curso de Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos,

2017.

SOUZA, Bartolomeu W.s. et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.287-292, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.005>.

TAYLOR, Sarah L. et al. By-Products of Heparin Production Provide a Diverse Source of Heparin-like and Heparan Sulfate Glycosaminoglycans. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-12, 25 fev. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-39093-6>.

THARANATHAN, R.N. Biodegradable films and composite coating: past, presente and future. *Trends in Food Science and Techology*. V. 14, p. 71- 78, 2003

TRIVEDI, Tushar J.; RAO, K. Srinivasa; KUMAR, Arvind. Facile preparation of agarose–chitosan hybrid materials and nanocomposite ionogels using an ionic liquid via dissolution, regeneration and sol–gel transition. **Green Chem.**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.320-330, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3gc41317a>.

TURBIANI, Franciele Rezende Barbosa. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES ATIVOS DE ALGINATO DE SÓDIO RETICULADOS COM BENZOATO DE CÁLCIO**. 2007. 126 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Biblioteca Universitária. **Guia de normalização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, 2013.

VASCONCELOS, Andreanne Gomes; ARAÚJO, Karla Vasconcelos de; SANTANA, Lucas de Araújo Bastos. POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE ALGAS MARINHAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS: UMA REVISÃO. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde** Issn: 2236-1103, [s.l.], v. 5, n. 3, p.27-51, 6 set. 2015. *Revista Brasileira de Inovacao Tecnologica em Saude (R-BITS)*. <http://dx.doi.org/10.18816/r-bits.v5i3.5898>.

VIEGAS, Larissa Paiva. Preparacao e caracterizacao de filmes biodegradaveis a partir de amido com quitosana para aplicacao em embalagens de alimentos. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência dos Materiais, Centro de Ciencias e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes Rj, 2016.

World health organization, cardiovascular diseases, ([https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))), 2019

Y. Liu, S. Wang, W. Lan, Fabrication of antibacterial chitosan-PVA blended film

using electrospray technique for food packaging applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2017) 848–854.