



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

SANDY DANIELLE LUCINDO GOMES

**AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE DE REVESTIMENTOS
POLIMÉRICOS DE QUITOSANA SULFATADA SOBRE LIGAS METÁLICAS DE
AÇO INOXIDÁVEL E LIGAS DE TITÂNIO MODIFICADAS COM CRESCIMENTO
DE NANOTUBOS DE TiO₂**

FORTALEZA

2023

SANDY DANIELLE LUCINDO GOMES

**AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE DE REVESTIMENTOS
POLIMÉRICOS DE QUITOSANA SULFATADA SOBRE LIGAS METÁLICAS DE
AÇO INOXIDÁVEL E LIGAS DE TITÂNIO MODIFICADAS COM CRESCIMENTO
DE NANOTUBOS DE TiO₂**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

G617a Gomes, Sandy Danielle Lucindo.
Avaliação da hemocompatibilidade de revestimentos poliméricos de quitosana sulfatada sobre ligas metálicas de aço inoxidável e ligas de titânio modificadas com crescimento de nanotubos de TiO₂ / Sandy Danielle Lucindo Gomes. – 2023.
110 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

1. Hemocompatibilidade. 2. Quitosana Sulfatada. 3. Stents metálicos. I. Título.

CDD 660

SANDY DANIELLE LUCINDO GOMES

**AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE DE REVESTIMENTOS
POLIMÉRICOS DE QUITOSANA SULFATADA SOBRE LIGAS METÁLICAS DE
AÇO INOXIDÁVEL E LIGAS DE TITÂNIO MODIFICADAS COM CRESCIMENTO
DE NANOTUBOS DE TiO₂**

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A autora gostaria de agradecer à Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) matam 17,7 milhões de pessoas a cada ano, correspondendo a 31% de todas as mortes globais em 2020 e impulsionando o uso de *stents* coronarianos. Muitas vezes, os *stents* metálicos, ao interagirem com o sangue, podem sofrer corrosão do material e favorecerem à formação de trombos no local do implante, resultando na falha do dispositivo. A fim de melhorar a performance destes dispositivos, recentemente a quitosana sulfatada foi proposta como revestimento polimérico, aumentando a hemocompatibilidade das superfícies metálicas dos *stents* cardiovasculares. A quitosana é um polímero biocompatível com grupos amino e hidroxilas ao longo da cadeia, facilitando, assim, a sua modificação química. Neste trabalho, foram produzidos revestimentos poliméricos de quitosana sulfatada (QS) sobre as ligas de aço inoxidável 316L e de titânio (Ti10Mo8Nb6Zr) modificada com crescimento de nanotubos de TiO₂, e comparada com a quitosana natural. Inicialmente, a quitosana natural (QN) foi sulfatada com ácido clorossulfônico, em seguida, foram desenvolvidos filmes de quitosana sulfatada e natural reticulados ou não com glutaraldeído para avaliação da citotoxicidade. Posteriormente, as superfícies metálicas de aço inoxidável e ligas de titânio, foram recobertas com QS e QN, por meio de uma camada de polidopamina e um braço de ligação de polietileno glicol. A quitosana sulfatada desenvolvida apresentou no espectro do FTIR as bandas referentes aos grupos sulfatados adicionados na cadeia polimérica. Ademais, na concentração de 200 µg/mL a QS foi capaz de prolongar o tempo de coagulação em 2,5 comparada a QN. A QS não foi capaz de induzir a agregação plaquetária. Os filmes de QS e QN contendo a menor concentração do agente de glutaraldeído (0,03% v/v) não foram tóxicos às células da linhagem L929 (fibroblastos). Através do ensaio de adesão plaquetária, foi possível identificar que, dentre as superfícies metálicas, as superfícies de titânio demonstraram maior hemocompatibilidade quando comparadas às amostras de aço inoxidável, apresentando uma menor porcentagem de área coberta por plaquetas $27,2 \pm 4,9$ versus $60,5 \pm 4,3$. Já em relação aos recobrimentos, as superfícies metálicas revestidas com QS apresentaram uma menor ativação plaquetária, sendo a superfície de titânio recoberta com QS a amostra que apresentou a menor porcentagem de cobertura de plaquetas ($13,7\% \pm 3,5$), podendo inferir que esse foi o material que apresentou maior potencial para o recobrimento de dispositivos médicos que permanecem em contato com o sangue, podendo auxiliar no tratamento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Hemocompatibilidade; Quitosana Sulfatada; *Stents* metálicos.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, cardiovascular disease (CVD) kills 17.7 million people each year, accounting for 31% of all global deaths in 2020, driving the use of coronary stents. Often, metallic stents, when interacting with blood, can suffer corrosion of the material and favor thrombus formation at the implantation site resulting in device failure. In order to improve the performance of these devices, sulfated chitosan has recently been proposed as a polymeric coating, increasing the hemocompatibility of the metallic surfaces of cardiovascular stents. Chitosan is a biocompatible polymer with amino and hydroxyl groups along the chain, thus facilitating its chemical modification. In this work, polymeric coatings of sulfated chitosan (QS) were produced on 316L stainless steel and titanium alloys (Ti10Mo8Nb6Zr) modified with TiO₂ nanotube growth and compared with natural chitosan. Initially, natural chitosan (QN) was sulfated with chlorosulfonic acid, then sulfated and natural chitosan films crosslinked or not with glutaraldehyde were developed for cytotoxicity evaluation. Subsequently, the metallic surfaces of stainless steel and titanium alloys were coated with QS and QN by means of a polydopamine layer and a polyethylene glycol bonding arm. The developed sulfated chitosan showed in the FTIR spectrum the bands referring to the sulfated groups added in the polymer chain. In addition, at a concentration of 200 µg/mL QS was able to prolong the clotting time by 2.5 compared to QN. QS was not able to induce platelet aggregation. QS and QN films containing the lowest concentration of glutaraldehyde agent (0.03% v/v) were not toxic to L929 cells (fibroblasts). Through the platelet adhesion assay, it was possible to identify that, among the metallic surfaces, titanium surfaces showed greater hemocompatibility when compared to stainless steel samples, presenting a lower percentage of area covered by platelets 27.2 ± 4.9 versus 60.5 ± 4.3 . Regarding the coatings, the metal surfaces coated with QS presented a lower platelet activation, being the titanium surface coated with QS the sample that presented the lowest percentage of platelet coverage ($13.7\% \pm 3.5$), inferring that this was the material that presented the greatest potential for the coating of medical devices that remain in contact with the blood, being able to assist in the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: Hemocompatibility, Sulfated Chitosan, Metallic Stents.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Composição do aço inoxidável 316L.....	21
Tabela 2	- Tipos de <i>stents</i> cardiovasculares.....	24
Tabela 3	- Amostras de quitosana natural, sulfatada e as concentrações de reticulante testadas.....	50
Tabela 4	- Efeito da quitosana sulfatada (QS) e quitosana natural (QN) incubadas no plasma rico em plaquetas (PRP) em diferentes tempos de incubação e concentrações.....	63
Tabela 5	- Termogravimetria dos filmes desenvolvidos.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação da estrutura metálica de <i>stent</i> coronariano antes e após expansão com o balão cateter na cirurgia de angioplastia.....	20
Figura 2	- Estruturas cristalinas de TiO ₂ (a) anatase (tetragonal), (b) rutilo (tetragonal), e (c) bruquita (cristalina ortorrômbica).....	23
Figura 3	- Sistema de hemostasia e reparo tecidual disparados por lesão em vaso sanguíneo.....	31
Figura 4	- Ilustração representativa dos megacariócitos e plaquetas. Borda do megacariócito soltando-se e formando os fragmentos celulares que são as plaquetas (A). Plaquetas inativas ao lado de eritrócito para comparação (B). Plaqueta ativada (C).....	32
Figura 5	- Imagem do MEV de plaqueta inativa (A), plaquetas ativadas (B) e (C). Escala de 1µm.....	33
Figura 6	- Imagem AFM das superfícies de aço inoxidável, aço inoxidável com dopamina, aço inoxidável com quitosana e aço inoxidável com quitosana sulfatada submetidas ao teste de adesão plaquetária.....	34
Figura 7	- Cascata da coagulação com proteínas plasmáticas inativas (caixa branca) ativadas a cada etapa das vias intrínseca, extrínseca e comum.....	36
Figura 8	- Estrutura química da heparina.....	39
Figura 9	- Estrutura química da quitosana natural (A) e sulfatada (B).....	40
Figura 10	- Síntese da quitosana sulfatada com ácido clorossulfônico.....	41
Figura 11	- Mecanismos adesivos dos grupos catecois.....	43
Figura 12	- Esquema ilustrativo das etapas desenvolvidas no presente trabalho.....	44
Figura 13	- Esquema da metodologia utilizada para realizar a dissolução da quitosana em dimetilformamida (A) e a reação de sulfatação da quitosana natural com ácido clorossulfônico (B).....	47
Figura 14	- Esquema da metodologia utilizada no ensaio de agregação plaquetária para obtenção de PRP e PPP.....	48
Figura 15	- Esquema da metodologia utilizada no ensaio de agregação plaquetária para obtenção da porcentagem de agregação plaquetária induzida pelas amostras de QS e QN avaliadas nos tempos de 5, 10 e 15 minutos de incubação.....	49

Figura 16 - Metodologia utilizada nos ensaios de coagulação TTPA (A) e TP (B).....	50
Figura 17 - Esquema da metodologia utilizada no desenvolvimento dos filmes de quitosana natural (QN) ou quitosana sulfatada (QS), com ou sem o reticulante glutaraldeído.....	51
Figura 18 - Esquema da metodologia utilizada para realização do teste de citotoxicidade.....	54
Figura 19 - Corte do aço inoxidável 316L. Imagem transversal (A) e imagem superior da peça (B).....	54
Figura 20 - Peças de Ti10Mo8Nb6Zr que receberam o crescimento de nanotubos de titânio pela técnica de extrusão em canal angular com ângulo de $\phi=120^\circ$ na temperatura de $T=250^\circ\text{C}$ com $n=4$. Imagem transversal (A) e imagem superior (B).....	55
Figura 21 - Fluxograma de processo de revestimento de ligas de aço inoxidável e TiO_2 com quitosana natural e quitosana sulfatada.....	56
Figura 22 - Representação esquemática da metodologia utilizada no processo de recobrimento das superfícies das ligas de aço inoxidável e titânio.....	58
Figura 23 - Representação do recobrimento das superfícies de aço inoxidável ou nanotubos de TiO_2 com a QN e QS. A primeira etapa é a funcionalização da superfície com a dopamina (A), seguido de ativação com PEGb (B) e finalizando com o enxerto de QN ou QS (C).....	58
Figura 24 - Metodologia utilizada no ensaio de adesão plaquetária.....	60
Figura 25 - Aspecto da quitosana sulfatada obtida após liofilização.....	61
Figura 26 - Aspecto dos filmes em contato com água. Quitosana sulfatada (QS), quitosana sulfatada com 0,03% de glutaraldeído (QS0,03), quitosana sulfatada com 0,08% de glutaraldeído (QS0,08), quitosana natural (QN), quitosana natural com 0,03% de glutaraldeído (QN0,03), quitosana natural com 0,08% de glutaraldeído (QN0,08).....	62
Figura 27 - Efeito da quitosana sulfatada (QS), da quitosana natural (QN), ácido acético 1% (veículo) e do controle positivo ou agonista (ADP) incubados em PRP por 15 minutos em perfil de agregação fornecido pelo equipamento agregômetro no qual é possível identificar a curva do perfil da agregação em porcentagem pelo tempo em segundos.....	63

Figura 28 - Efeito da quitosana sulfatada (QS), da quitosana natural (QN), ácido acético 1% (veículo) e do controle (ADP) incubados em PRP por 15 minutos em porcentagem de agregação por amostra avaliada.....	63
Figura 29 - Tempo de tromboplastina parcial das amostras com heparina (5 µg/mL), salina (NaCl 0,9%), quitosana natural 200 µg/mL e quitosana sulfatada nas concentrações de 200, 500 e 1000 µg/mL.....	66
Figura 30 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a superfície (A1) e seção transversal (A2) do filme de quitosana natural (QN). A superfície (B1) e seção transversal (B2) do filme de quitosana natural reticulada com 0,03 de glutaraldeído (QN 0,03). A superfície (C1) e seção transversal (C2) do filme de quitosana natural reticulada com 0,08 de glutaraldeído (QN 0,08)	69
Figura 31 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a (D1) superfície e (D2) seção transversal do filme de quitosana sulfatada (QS). A superfície (E1) e seção transversal (E2) do filme de quitosana sulfatada reticulada com glutaraldeído 0,03% (QS 0,03). A superfície (F1) e seção transversal (F2) do filme de quitosana sulfatada reticulada com glutaraldeído 0,08% (QS 0,08)	70
Figura 32 - Os possíveis produtos da reação de sulfatação da quitosana.....	72
Figura 33 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da quitosana natural e da quitosana sulfatada com ácido clorossulfônico.....	73
Figura 34 - FTIR para filmes desenvolvidos com quitosana natural ou quitosana sulfatada com ou sem reticulação por glutaraldeído.....	75
Figura 35 - Reticulação da quitosana sulfatada com o glutaraldeído.....	76
Figura 36 - Termogramas da quitosana natural e da quitosana sulfatada TG.....	77
Figura 37 - Termogramas da quitosana natural e quitosana sulfatada DTG.....	77
Figura 38 - TG (A) e DTG (B) para filmes desenvolvidos com quitosana sulfatada e natural com ou sem reticulação por glutaraldeído.....	80
Figura 39 - Viabilidade de células L929 em extratos de filmes de quitosana natural (QN), quitosana natural reticulada com 0,03% (v/v) de glutaraldeído (QN0,03), quitosana natural reticulada com 0,08% (v/v) de glutaraldeído (QN0,08), quitosana sulfatada (QS), quitosana sulfatada reticulada com 0,03% (v/v) de	

	glutaraldeído (QS0,03) e quitosana sulfatada com 0,08% (v/v) de glutaraldeído (QS0,08). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± E.P.M). *, p < 0,05; 1 way ANOVA e teste de Turkey.....	84
Figura 40 -	Aço inox 316 L com eletropolimento (esquerda) e aço inox 316 L sem eletropolimento (direita).....	86
Figura 41 -	MEV das superfícies de aço sem recobrimento (A) e com quitosana sulfatada (B).....	86
Figura 42 -	MEV da liga de titânio sem recobrimento (A) e com quitosana sulfatada (B).....	87
Figura 43 -	MEV das amostras submetidas a adesão plaquetária. Em A1, rica cobertura de plaquetas totalmente ativadas com formação de agregados sobre a superfície de aço inoxidável (500x). A2, plaquetas totalmente ativadas e com significativa formação de prolongamentos (5000x). A3, plaquetas agregadas e totalmente ativadas. B1, rica cobertura de plaquetas totalmente ativadas com formação de agregados sobre a superfície de aço inoxidável eletropolido (2000x). B2, plaquetas totalmente ativadas (5000x) e B3 agregado de plaquetas totalmente ativadas. C1, plaquetas agregadas sobre a superfície aço inoxidável com recobrimento de quitosana natural (500x). C2, agregados de plaquetas ativadas (5000x). C3 agregado de plaquetas totalmente ativadas.....	88
Figura 44 -	MEV das amostras submetidas a adesão plaquetária. Em D1, presença de plaquetas sobre a superfície de aço inoxidável com recobrimento de quitosana natural reticulada com 0,03 % de glutaraldeído (500x). D2 plaquetas ativadas (5000x). D3 plaqueta parcialmente ativada. E1 sem plaquetas sobre a superfície de aço inoxidável com recobrimento de quitosana sulfatada (500x). E2 sem plaquetas sobre a superfície (5000x). F1 Nota-se a presença de plaquetas sobre a superfície de aço inoxidável com recobrimento de quitosana sulfatada reticulada com 0,03 % de glutaraldeído (500x). F2 presença de plaquetas agregadas (5000x). F3 agregado de plaquetas.....	89
Figura 45 -	MEV das amostras submetidas a adesão plaquetária. Em G1, plaquetas sobre a superfície de titânio (500x). G2 plaquetas ativadas (5000x). G3 agregado de	

	plaquetas. H1 plaquetas sobre a superfície titânio tratada (500x). H2 plaquetas ativadas (5000x). H3 plaqueta parcialmente ativada. H4 agregado de plaquetas totalmente ativadas. I1 plaquetas sobre a superfície titânio com recobrimento de quitosana natural (500x). I2 plaquetas ativadas (5000x). I3 plaqueta parcialmente ativadas. I4 agregado de plaquetas totalmente ativadas.....	90
Figura 46 -	MEV das amostras submetidas a adesão plaquetária. Em J1, plaquetas sobre a superfície de titânio com recobrimento de quitosana natural reticulada com 0,03 % glutaraldeído (500x). J2 plaquetas ativadas (5000x). J3 plaquetas parcialmente ativadas. K1 superfície titânio com recobrimento de quitosana sulfatada (500x). K2 sem plaquetas sobre a superfície (5000x). L1 poucas plaquetas sobre a superfície de titânio com recobrimento de quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (500x). L2 plaquetas (5000x). L3 plaqueta não ativada.....	91
Figura 47 -	Sobre a superfície de aço inoxidável recoberto com QN reticulada com 0,03% de glutaraldeído (D3) nota-se a presença de uma plaqueta ativada e sobre a superfície de aço recoberto com QS reticulado com 0,03% de glutaraldeído nota-se a presença de plaquetas agregadas, mas sem ativação e formação de dendritos sobre a superfície (F3).....	92
Figura 48 -	Em destaque agregado de plaquetas totalmente ativadas sobre a superfície de liga de titânio (H4) e plaquetas parcialmente ativadas sobre superfície de liga de titânio recoberta com quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído (J3).....	92
Figura 49 -	Em destaque agregado de plaquetas totalmente ativadas sobre superfície de aço inoxidável recoberta com quitosana natural (C3). Plaqueta parcialmente ativada sobre superfície de liga de titânio recoberta com quitosana natural (I3). Em destaque agregado de plaquetas ativadas sobre superfície da liga de titânio recoberta com quitosana natural (I4).....	93
Figura 50 -	Imagens na microscopia eletrônica de varredura. (A) Nota-se a presença de uma plaqueta isolada sobre a superfície. (B) Nota-se a presença de plaquetas ativadas. Barra representa a distância de 2 µm.....	95
Figura 51 -	Área de cobertura pelas plaquetas nas amostras de aço inoxidável (Aço), aço inoxidável polido (Aço polido), aço inoxidável com quitosana natural (Aço QN), aço inoxidável com quitosana natural reticulada com 0,03% de	

glutaraldeído (Aço QN0,03), aço inoxidável com quitosana sulfatada (Aço QS), aço inoxidável com quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (Aço QS0,03), titânio (Ti), titânio tratado (TI tratado), titânio com quitosana natural (Ti QN), titânio com quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído (Ti QN0,03), titânio com quitosana sulfatada (Ti QS), titânio com quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (Ti QS0,03). Os valores foram expressos como porcentagem de cobertura de área (média \pm E.P.M). *, $p < 0,05$; 1 way ANOVA e teste de Turkey.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aço	Liga de aço inoxidável 316L
Aço polido	Liga de aço inoxidável 316L após processo de eletropolimento
Aço QN	Liga de aço inoxidável 316L com recobrimento de quitosana natural
Aço QN 0,03	Liga de aço inoxidável 316L com recobrimento de quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído
DCV	Doenças cardiovasculares
DMF.	Dimetilformamida
EDAC	Hidrocloreto de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDA	Polidopamina
PEGb	Poli(etilenoglicol) bis(carboximetil) éter
MES	Ácido 2-etanossulfônico
QN	Quitosana Natural
QN0,03	Quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído
QN0,08	Quitosana natural reticulada com 0,08% de glutaraldeído
QS	Quitosana sulfatada
QS0,03	Quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído
QS0,08	Quitosana sulfatada reticulada com 0,08% de glutaraldeído
Ti	Liga de Ti ₁₀ Mo ₈ Nb ₆ Zr com nanotubos de TiO ₂
Ti QN	Liga de Ti ₁₀ Mo ₈ Nb ₆ Zr recoberto com quitosana natural
Ti QN 0,03	Liga de Ti ₁₀ Mo ₈ Nb ₆ Zr recoberto com quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído
Ti QS	Liga de Ti ₁₀ Mo ₈ Nb ₆ Zr recoberto reticulada com quitosana sulfatada
Ti QS 0,03	Liga de Ti ₁₀ Mo ₈ Nb ₆ Zr recoberto com quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído
TP	Tempo de Atividade da Protrombina
TiO ₂	Dióxido de Titânio
tPA	Ativador de Plasminogênio Tecidual
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	Stent Coronário.....	19
3.1.1	<i>Doença arterial coronariana e angioplastia.....</i>	19
3.1.2	<i>Principais materiais utilizados em stents (Aço inoxidável e Titânio).....</i>	20
3.1.2.1	<i>Aço inoxidável.....</i>	20
3.1.2.2	<i>Titânio.....</i>	21
3.1.3	<i>Classificação dos stents.....</i>	23
3.1.4	<i>Principais problemas dos stents.....</i>	26
3.2	Interações entre o corpo e a superfície dos Biomateriais.....	27
3.2.1	<i>Fenômenos de superfície podem levar a adesão plaquetária aumentando ou diminuindo a biocompatibilidade.....</i>	27
3.2.2	<i>Fenômenos biológicos.....</i>	28
3.2.3	<i>Hemocompatibilidade.....</i>	29
3.2.3.1	<i>Hemostasia.....</i>	29
3.2.3.2	<i>Agregação plaquetária.....</i>	31
3.2.3.3	<i>Cascata da Coagulação.....</i>	34
3.2.3.4	<i>Fatores de superfície que afetam implantes em contato com sangue.....</i>	36
3.3	Recobrimento da superfície do Stent.....	37
3.3.1	<i>Heparina.....</i>	37
3.3.2	<i>Quitosana natural e quitosana sulfatada.....</i>	38
3.3.3	<i>Polidopamina.....</i>	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	Materiais.....	44
4.2	Aspectos éticos.....	44
4.3	Reação de sulfatação para modificação da quitosana natural.....	44
4.3.1	<i>Metodologia de sulfatação.....</i>	44
4.3.2	<i>Caracterização da quitosana natural e quitosana sulfatada.....</i>	46
4.3.2.1	<i>Efeito sobre agregação de plaqueta humana.....</i>	46
4.3.2.2	<i>Atividade anticoagulante in vitro TP e TTPA.....</i>	48

4.3.2.3	<i>Desenvolvimento de filmes com a quitosana natural e sulfatada.....</i>	49
4.3.2.4	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....</i>	51
4.3.2.5	<i>Termogravimetria (TG).....</i>	51
4.3.2.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	51
4.3.2.7	<i>Citotoxicidade.....</i>	51
4.4	Funcionalização das superfícies de aço inoxidável e nanotubos de TiO₂.....	53
4.4.1	<i>Metodologia de funcionalização das superfícies de aço inoxidável e nanotubos de TiO₂.....</i>	53
4.4.2	<i>Análise de adesão plaquetária nas superfícies funcionalizadas com quitosana natural e quitosana sulfatada.....</i>	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1	Caracterização da quitosana natural e sulfatada e dos filmes desenvolvidos.....	61
5.1.1	<i>Efeito sobre a agregação de plaquetas.....</i>	61
5.1.2	<i>Tempo de tromboplastina parcial ativadas (TTPA) e tempo de protrombina (TP) da quitosana sulfatada produzida.....</i>	64
5.1.3	<i>MEV.....</i>	68
5.1.4	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....</i>	70
5.1.5	<i>Termogravimetria (TG).....</i>	76
5.1.6	<i>Citotoxicidade.....</i>	82
5.2	Recobrimento de aço inoxidável e nanotubos de TiO₂.....	84
5.2.1	<i>Eletropolimento do aço inoxidável.....</i>	84
5.2.2	<i>Adesão plaquetária em aço inoxidável e nanotubos de TiO₂.....</i>	86
5.3	Indicação para trabalhos futuros.....	97
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
7	REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

O baixo nível de atividade física atrelado a dietas não saudáveis e ricas em gorduras, sal e açúcares aumentam o risco de doenças cardiovasculares que causaram cerca de 17,9 milhões de mortes em 2019, representando 32% de todas as mortes globais (Cardiovascular diseases, 2021). Na doença arterial coronária há uma obstrução da passagem sanguínea pelo acúmulo de gordura na parede da artéria, reduzindo a irrigação sanguínea no músculo do coração e causando danos ao paciente. Nesses casos, dispositivos percutâneos como *stents* são utilizados a fim de restaurar o fluxo sanguíneo na artéria coronária (KUBO *et al.*, 2008).

Os *stents* são tubos com o formato de malha e o esqueleto de metal como o aço inoxidável (AISI 316-L), nitinol (Ni), ligas de cromo-cobalto (Cr-Co) e titânio (Ti). Esses dispositivos metálicos, quando implantados no corpo, podem interagir com os tecidos circundantes, causando irritação física, trombose, corrosão, inflamação crônica e endotelização disfuncional (ZHAO; METCALF; BUNNETT, 2014). Após a inserção do dispositivo no corpo, os fluidos corporais podem atacar o material e os produtos da corrosão de alguns metais podem induzir citotoxicidade e hipersensibilidade (DEE; RHODE; WACHTER, 2001).

De acordo com a *Idata Research* o melhor dispositivo disponível no mercado é o *stent* cardiovascular da *Synergy da Boston Scientific*, contendo um recobrimento polimérico bioabsorvível e a droga imunossupressora Everolimo. Entretanto, mesmo com o uso dos *stents* farmacológicos e da adoção de regimes antiplaquetários mais potentes, os registros demonstram que a falha continua sendo em torno de 15 a 20% nos estudos desenvolvidos, tornando o uso de *stent* cardiovascular um dos grandes desafios para medicina moderna (MAHADEVAN; COSGROVE; STRANGE, 2021).

A fim de melhorar a hemocompatibilidade, diversos materiais metálicos foram propostos para serem usados como base para o esqueleto do *stent* cardiovascular. Por exemplo, o titânio, que é um material utilizado em virtude da sua biocompatibilidade, resistência mecânica e à corrosão. A formação de uma camada passiva de dióxido de titânio, quando implantado no corpo, confere a melhora das propriedades mecânicas dessa malha. Essa camada de óxido estável, que se forma rapidamente quando o metal é exposto ao ar e a água, é nanométrica e protege o implante de futura oxidação, tornando o material biologicamente inerte e menos reativo quando comparado ao titânio sem a camada de óxido (RAMOS-TONELLO *et al.*, 2017).

Outra forma de melhorar a hemocompatibilidade do implante superando os problemas de formação de trombos e corrosão são as modificações químicas ou físicas nas superfícies metálicas. Uma estratégia que tem sido utilizada é a adição de um revestimento polimérico sobre essas superfícies onde polímeros biodegradáveis são utilizados devido suas características de biodegradação e biocompatibilidade. Dentro da família dos polímeros, existe uma classe de moléculas chamadas de polissacarídeos sulfatados, os quais, são macromoléculas bioativas contendo grupos sulfatos no lugar de grupos hidroxilas e apresentam atividades de interesse para aplicação como revestimento, por exemplo, anti-inflamatória e anticoagulante (MITTAL *et al.*, 2018).

Dentre os polímeros naturais, a quitosana possui diversas aplicações, pois apresenta uma cadeia linear, composta por unidades de D-glucosamina e N-acetilglicosamina ligadas via β (1–4) ligação glicosídica e por ser biocompatível, biodegradável e não tóxica, a quitosana é usada como biomaterial na engenharia de tecidos. Além disso, a disponibilidade de grupos amino e hidroxilas tornam o polímero suscetível a modificações químicas como a reação de sulfatação, responsável pela inserção de grupos carregados negativamente no polímero. Essa modificação objetiva mimetizar a estrutura da heparina, um potente anticoagulante. O *stent* cardiovascular do *Bx Velocity* da empresa *Cordis* apresentam heparina (MEHRAN *et al.*, 2003). Uma das vantagens da quitosana sobre a heparina é a diminuição de reações adversas como sangramentos prolongados (SOLARI; VARACALLO, 2022).

Em estudos realizados anteriormente por colaboradores do mesmo grupo de pesquisa, coordenado pelo Prof. Rodrigo Vieira, foi desenvolvida a metodologia de sulfatação da quitosana com ácido clorossulfônico (MORAES *et al.*, 2019), além da metodologia de recobrimento do aço inoxidável com quitosana sulfatada (CAMPELO *et al.*, 2017). No presente trabalho, foram combinadas as metodologias anteriormente citadas visando realizar o revestimento tanto das ligas de aço inoxidável 316 L quanto das ligas de Ti10Mo8Nb6Zr (nanotubos de TiO₂) com a quitosana sulfatada, que é um polímero rico em cargas negativas mimetizando a estrutura da heparina e gerando repulsão eletrostática de proteínas plasmáticas do sangue carregadas negativamente evitando assim a formação de trombos. Desse modo, este trabalho obteve avanços em relação aos trabalhos de Moraes *et al.* (2019) e Campelo *et al.*, (2017), sendo a principal inovação a produção de um revestimento polimérico de quitosana sulfatada (QS) a partir de ácido clorossulfônico sobre ligas de aço inoxidável 316L e titânio Ti10Mo8Nb6Zr modificada com crescimento de nanotubos de TiO₂. A principal finalidade do desenvolvimento desse material é a sua utilização como revestimento para *stent* cardiovascular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como principal objetivo a avaliação da hemocompatibilidade de revestimentos poliméricos de quitosana sulfatada (QS) sobre liga de aço inoxidável 316L e liga de titânio Ti10Mo8Nb6Zr modificada com crescimento de nanotubos de TiO₂. Desse modo, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- a) Sintetizar a quitosana sulfatada e avaliar a sua hemocompatibilidade através de ensaios de coagulação sanguínea e agregação plaquetária humana;
- b) Desenvolver filmes com quitosana sulfatada ou natural, com ou sem o reticulante glutaraldeído, e caracterizá-los por meio de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Termogravimetria (TG);
- c) Avaliar a citotoxicidade dos filmes de quitosana sulfatada e natural em células de fibroblasto L929;
- d) Revestir as superfícies do aço inoxidável e dos nanotubos de dióxido de titânio com quitosana natural e sulfatada;
- e) Realizar o teste de adesão plaquetária sobre as superfícies do aço inoxidável e dos nanotubos de dióxido de titânio recobertos com quitosana natural e sulfatada e avaliar o grau de adesão plaquetária humana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Stent* Coronário

Os *stents* são pequenos tubos expansíveis, em forma de malha, que são inseridos em artérias estreitas ou bloqueadas pelo acúmulo de gordura para restaurar o fluxo de sangue. O aumento da prevalência de doenças cardiovasculares e os avanços tecnológicos no desenvolvimento de novos materiais são os principais motores do mercado global de *stents* coronarianos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) tiram a vida de 17,9 milhões de pessoas a cada ano, correspondendo a 31% de todas as mortes globais. No Brasil, segundo a síntese de indicadores sociais (2020) realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021), 28% das mortes no país foram causadas por doenças cardiovasculares. Representação de *stent* coronariano na Figura 1.

Figura 1 - Representação da estrutura metálica de *stent* coronariano antes e após expansão com o balão cateter na cirurgia de angioplastia.



Fonte: SOLACI (2022).

3.1.1 *Doença arterial coronariana e angioplastia*

A doença arterial coronariana é uma redução da disponibilidade de oxigênio e nutrientes para o músculo cardíaco levando a um estado de insuficiência cardíaca em decorrência da formação da placa aterosclerótica nas artérias coronárias (KLEINEDLER *et al.*,

2012; LIVINGSTON; TAN, 2019). A formação da placa se deve ao acúmulo de gordura, colágeno, cálcio e colesterol na parede da artéria (PINHO *et al.*, 2010).

A angioplastia coronária transluminal percutânea (AaCTP) com *stent* tem como principal finalidade restituir a irrigação arterial com a inserção percutânea do suporte. Nesse procedimento, o *stent* é fixado na parede da artéria após o balão ser insuflado e é considerado uma das etapas mais importantes para a revascularização coronária percutânea.

3.1.2 Principais materiais utilizados em stents (Aço inoxidável e Titânio)

Os *stents* metálicos são geralmente fabricados com materiais como aço inoxidável 316L, ligas de Nitinol (Ni-Ti) e ligas de Cromo-Cobalto (Cr-Co) em virtude da biocompatibilidade (GARCÍA; PEÑA; MARTÍNEZ, 2012; HASEBE *et al.*, 2011), pois cada material metálico escolhido determina as características do implante. Os *stents* de aço inoxidável são resistentes à formação de trombos e biocompatíveis, mas o processo de degradação libera íons na corrente sanguínea, o que pode levar a problemas da resposta imunológica (IQBAL; GUNN; SERRUYS, 2013). Por outro lado, as ligas de Nitinol (Níquel-Titânio) apresentam resistência a corrosão e biocompatibilidade (RENGIER *et al.*, 2010).

3.1.2.1 Aço inoxidável

Muitos tipos de aço inoxidável são utilizados na fabricação de dispositivos como *stents* e implantes. Devido à presença de Cr na composição e a formação de uma camada de óxido composta por Cr₂O₃, os aços inoxidáveis possuem alta resistência a oxidação. O tipo mais utilizado nas aplicações médicas é o aço inoxidável 316L (SS 316L), o qual possui uma menor concentração de átomos de carbono. As principais características desse material são: biocompatibilidade, maleabilidade, resistência à corrosão e fadiga, além de ductibilidade (BEKMURZAYEVA *et al.*, 2018; BERTOLINI; BRUSCHI; GHIOTTI, 2019). Podem ser classificados em ferríticos, martensíticos, austeníticos e duplex (uma estrutura com a mistura de austeníticos com ferríticos). Na Tabela 1, segue a composição do aço inoxidável 316L (CHEN *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Composição do aço inoxidável 316L

Elemento	C	Cr	Ni	Mo	Mn	Si	P	S
% Massa	< 0.03	16-18.5	10-14	2-3	< 2	< 1	< 0.045	< 0.03

Fonte: CHEN *et al.*, (2016).

A qualidade do recobrimento é fortemente dependente do estado inicial da superfície, assim, antes de iniciar o recobrimento do aço inoxidável, é necessário realizar o polimento da superfície através de métodos químicos ou físicos. Dentre estes, o polimento químico é uma boa opção visto que não induz tensões superficiais e remove as camadas superficiais por dissolução química, promovendo a remoção preferencial da rugosidade, porém com uma velocidade baixa e controlada se comparado ao polimento físico.

No eletropolimento, a aplicação de uma corrente anódica aumenta a velocidade de dissolução das camadas superficiais (TEGART, 1956) devido à utilização de corrente/potencial positivo na passivação e dissolução do metal, o eletropolimento é realizado de acordo com a norma ASTM B374-06 (2011). Dependendo do tipo de aço e banho utilizados, são produzidas superfícies polidas e brilhantes, melhorando o acabamento da superfície do metal. O procedimento pode ser utilizado ainda com o objetivo de remoção de deformações na superfície metálica tornando o material mais resistente a corrosão e com superfície mais plana e limpável. Porém, mesmo após o eletropolimento é possível que o processo de degradação do material libere íons na corrente sanguínea, contribuindo para a reestenose e estimulando uma resposta imunológica.

3.1.2.2 Titânio

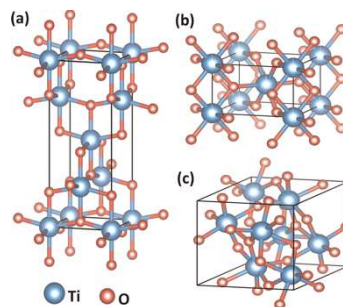
Outros materiais como titânio (Ti) e suas ligas têm sido relatados como potencial para produção dos *stents*, pois possuem excelente biocompatibilidade (BORHANI *et al.*, 2018). Mesmo com as vantagens apresentadas pelo titânio, ainda existem complicações como trombose e reestenose que são causadas por essas superfícies. Para melhorar a biocompatibilidade do material foram propostas técnicas de modificação em escala nano como anodização, tratamento a laser e hidrotérmico (MANIVASAGAM *et al.*, 2021).

Titânio possui estabilidade química e excelentes propriedades mecânicas em virtude da formação de uma camada passiva de dióxido de titânio (TiO₂) quando inseridos no corpo (ELIAS; LIMA; VALIEV, 2008). A elevada resistência à corrosão e o baixo nível de condutividade elétrica, em meio fisiológico, são obtidos em virtude do filme de óxido amorfo (TiO₂) que se forma sobre o substrato de titânio, comportando-se como uma fase estável

termodinamicamente (SPRIANO *et al.*, 2005). A camada de óxido protege o implante contra corrosão conferindo assim uma maior biocompatibilidade ao material (MANIVASAGAM; POPAT, 2020).

O dióxido de titânio (TiO_2) está presente no titânio e em suas ligas, podendo ser encontrado em três alotropias do TiO_2 que podem ser observadas na Figura 2 rutilo, bruquita e anatase, sendo a fase rutilo a mais efetiva para aplicação como material compatível com sangue, pois é a fase mais estável e hidrofóbica. As estruturas nanotubulares organizadas de TiO_2 podem crescer na superfície de Ti por anodização, que é um processo eletroquímico no qual há a formação de um filme de óxido sobre a superfície a partir da aplicação de um campo elétrico, o processo ocorre em uma célula eletroquímica, em que o anodo de Ti e o cátodo de platina, quando uma corrente é aplicada há a formação de uma camada de óxido na superfície do anodo.

Figura 2 - Estruturas cristalinas de TiO_2 (a) anatase (tetragonal), (b) rutilo (tetragonal), e (c) bruquita (cristalina ortorrômbica).



Fonte: SIDDIQUI (2019).

Zhang e colaboradores (2020) avaliaram a coagulação do sangue nas três fases concluindo que apenas um pequeno número de plaquetas com morfologia dendrítica aderiram à fase rutilo indicando que a superfície apresentou grande hemocompatibilidade. Esse resultado foi atribuído pelo autor a baixa tensão interfacial entre a superfície dos nanotubos e ao sangue que resulta em uma baixa desnaturação de proteínas adsorvidas evitando a adesão e ativação de plaquetas (ZHANG *et al.*, 2020).

Yang e colaboradores (2018) estudaram nanotubos de TiO_2 recobertos com polidopamina. Foi observado que o revestimento prorrogou o período de liberação da droga anticoagulante Bivalirudin (BVLD) (YANG *et al.*, 2018). A inserção de 5 camadas poliméricas aumentou de 40 para 300 dias o período de liberação geral da droga e a formação de trombose foi reduzida pela inibição da adesão e desnaturação do fibrinogênio, plaquetas e outros componentes do sangue. O revestimento resultou em uma melhora da hemocompatibilidade do material. Mirjalili; Zamaniah; Hadavi (2019) sintetizaram nanotubos de titânio e realizaram a

modificação da superfície por polimerização *in situ* da polidopamina (PDA) com íons prata reduzidos na superfície da PDA. Os resultados da liberação de prata revelaram que a PDA funcionou como uma camada adesiva, quelando nanopartículas de prata sobre os nanotubos de titânio (TNTs) e diminuindo a taxa de liberação de íons de prata, implicando a possível atividade antibacteriana a longo prazo de TNTs revestidos de PDA. As amostras de TNTs mostraram 33% de atividade antibacteriana, representando a metade das amostras de TNTs-PDA carregadas com prata (MIRJALILI; ZAMANIAN; HADAVI, 2019).

Pan e colaboradores (2021) prepararam um revestimento complexo de quitosana- Zn^{2+} em nanotubos de TiO_2 modificados com polidopamina visando a melhoria das condições para o crescimento de osteoblastos. Inicialmente, os nanotubos foram preparados na superfície de titânio por anodização e a superfície foi funcionalizada pela dopamina. Em seguida, um complexo de quitosana e íons de zinco foram imobilizados na superfície. O revestimento promoveu a adesão e proliferação dos osteoblastos, sendo capaz de melhorar a osteogênese e a osteointegração da superfície de titânio (PAN *et al.*, 2021). Pereira Júnior (2019) avaliou a viabilidade celular da liga $Ti_{10}Mo_8Nb_6Zr$ pelo método Alamar Blue, usando células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) sobre as superfícies. Os resultados apresentaram uma viabilidade celular próximo a 90% no sétimo dia, indicando a não citotoxicidade da liga (PEREIRA JÚNIOR, 2019).

A adição dos nanotubos de TiO_2 sobre a superfície da liga de titânio, confere as vantagens da nanoestrutura ao material, gerando uma maior estabilidade contra corrosão e intumescimento. Além disso, os nanotubos de TiO_2 se apresentam como um material inerte e seguro para o corpo humano (JAFARI *et al.*, 2020). Pelas vantagens apresentadas foi escolhida a liga $Ti_{10}Mo_8Nb_6Zr$ modificada com o crescimento de nanotubos de TiO_2 para receber o revestimento de quitosana natural (QN) e quitosana sulfatada (QS) no presente trabalho.

3.1.3 Classificação dos stents

Os *stents* são dispositivos permanentes que duram uma vida inteira, caso não ocorram problemas como trombose e podem ter diversas formas e de acordo com o tipo de material que os compõem a estrutura, podem ser classificados em: convencionais, farmacológicos e biodegradáveis (BORHANI *et al.*, 2018) conforme a Tabela 2:

Tabela 2 - Tipos de *stent* cardiovasculares

Tipo	Características
<i>Stent</i> Metálico	Malha de metais como aço inoxidável, níquel-titânio ou cobalto-cromo. Sem revestimentos, podem levar a ocorrência de reestenose.
<i>Stent</i> Farmacológico	Malha de metal revestida com medicamentos imunossuppressores e anti-inflamatório com liberação localizada no vaso sanguíneo, evitando assim a formação de coágulos.
<i>Stent</i> Polimérico	Malha de polímeros como poliácido láctico com estrutura flexível degradando-se em ácido láctico, que é absorvido pelo organismo.

Fonte: elaborado pela autora.

Os principais tipos de *stents* são: metálicos, revestidos, farmacológicos (ou com eluição de fármaco), bioabsorvíveis e radioativos. Os *stents* metálicos são compostos por metais como aço inoxidável, liga de cobalto-cromo e ligas de níquel-titânio. O aço inoxidável é o material mais usado em *stent*, pois possui uma boa biocompatibilidade, bem como consistência elástica e resistência. Entretanto, existem desvantagens como menor resistência à corrosão, maior risco de lesão nas paredes dos vasos sanguíneos comparativamente aos *stents* de Nitinol e liberação de íons metálicos. Já os *stents* de ligas de cobalto-cromo são mais resistentes que os de aço, por apresentarem uma malha mais fina existe um menor o risco de trombose, embora apresentem boa biocompatibilidade, também aumentam o risco de reestenose. Outra liga amplamente utilizada é de níquel-titânio ou nitinol, este material é muito comum em *stents* carotídeos e bastante utilizado em *stents* autoexpansíveis com memória de forma com elevada elasticidade, o aumento da resistência à corrosão se dá com o tratamento de superfície com óxido de titânio.

Os *stents* com estrutura metálica podem receber revestimento passivo ou ativo. Enquanto os passivos são materiais como ouro, polímeros, carbono ou cerâmica, os ativos são fármacos, como trombomodulina e heparina. Os *stents* farmacológicos foram responsáveis por reduzir o risco de reestenose muito comum em *stents* metálicos e são constituídos geralmente pela estrutura metálica, material polimérico e o fármaco, sendo esse sistema de libertação que assegura a libertação controlada de medicamentos como a rapamicina (sirolimus) e o paclitaxel que possuem ação antiproliferativos e/ou anti-inflamatórios inibindo a proliferação da neointimal (MedicalExpo, 2019). Entretanto, o uso de *stents* farmacológicos estão associados à formação de coágulos tardios e formação de trombos, dessa forma, uma terapia antiplaquetária com aspirina e clopidogrel são indicadas para pacientes com maior risco de reestenose, como portadores de placas de ateroma longas e em artérias finas e diabéticos (DIPPE, 2023). Os *stents* poliméricos (PLLA) são bioabsorvíveis, mas são menos resistentes que os metálicos e

aumentam o risco de estenose e de inflamação. Seguem alguns exemplos de *stents* cardiovasculares com revestimento:

A empresa norte-americana *Alta Biomaterials* produz o *Cobra PzF*, que de acordo com a empresa, é o primeiro *stent* não farmacológico com nanorevestimento de Polizene-F que apresenta resistência à formação de trombos e atividade anti-inflamatória. A estrutura do material é de liga de cromo – cobalto (L605) e revestimento com o polímero Polizene-F (PzF) que apresenta atividade antitrombótica que protege contra a formação de coágulos sanguíneos, baixa adesão plaquetária e propriedades anti-inflamatórias, além de interações favoráveis com proteínas permitindo uma melhora do tratamento com a atração de células endoteliais.

A empresa francesa *Hexacath* comercializa o *stent Titan Optimax* cujo esqueleto é flexível e constituído por uma liga de cromo-cobalto L605 que consiste em cromo, cobalto, tungstênio e níquel revestidos por óxido de nitreto de titânio (TiNO) compostos por múltiplas camadas de titânio, nitrito de titânio e por óxido de nitreto de titânio. O fabricante afirma que o óxido de nitreto de titânio é um composto químico com propriedades únicas que conferem as seguintes vantagens ao dispositivo: reduz a deposição de plaquetas e fibrina, minimiza a inflamação e formação de trombos, além de promover a cura endotelial.

A empresa chinesa *Sinomed* produz o *stent* farmacológico *HT Supreme* cujo esqueleto é composto por uma liga de cobalto cromo (L605) e um revestimento de um polímero bioabsorvível PLGA ou poli (ácido láctico-co-glicólico) acrescido do fármaco imunossupressor Rapamicina na concentração de $1,2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ com 90% de liberação estimada nos primeiros 28 dias. De acordo com o fabricante, o *stent* é submetido a uma corrente elétrica dentro de uma solução monomérica para que haja a formação do revestimento que por sua vez forma ligações fortes com o PLGA. Essa técnica cria uma integridade de revestimento robusta, que é resistente a descamação e rachaduras.

A empresa alemã *Cardionovum* produz o *stent Xlimus* com o esqueleto produzido a partir da liga de cromo cobalto (L605) possui revestimento de poliácido láctico contendo o imunossupressor rapamicina, dentro de 30 dias 70% da droga antiproliferativa é distribuída ao longo do tecido ao redor garantindo a inibição do crescimento e migração de células musculares lisas.

A empresa norte-americana *Gore* produz *Viabahn* um *stent* com malha de Nitinol revestido com politetrafluoretileno (PTFE) incorporado com Heparina que apresentou uma redução da reestenose quando comparado aos *stents* metálicos (LAMMER *et al.*, 2013). A *Biosensors* elaborou o *BioFreedom*, um *stent* de CoCr revestido com polímero e Biolimus A9,

que é uma substância da família da rapamicina. A rápida transferência de 28 dias de BA9™ para a artéria coronária e a rápida reendotelização do *stent*, fazem do *BioFreedom™ Ultra* a escolha mais relevante de *stent* para pacientes com alto risco de sangramento (HBR) que não toleram terapia antiplaquetária dupla longa (DAPT) (VAINA; ONG; SERRUYS, 2008).

3.1.4 Principais problemas dos stents

Após a inserção do *stent*, a parede celular pode responder com uma resposta inflamatória que resulta tanto na proliferação vascular de células musculares lisas quanto na formação neointima hipertrófica na artéria. De fato, essa série de eventos pode levar à reestenose intra-*stent*, que é a formação excessiva de tecido (hiperplasia neointimal ou neoaterosclerose) como resposta ao trauma mecânico na parede do vaso que recebeu o dispositivo (KORNOWSKI *et al.*, 1998; YUTANI *et al.*, 1999).

A primeira resposta à lesão endotelial causada pela inserção do *stent* é a ativação e agregação plaquetária seguida pela formação de trombos, resultando na liberação de agentes vasoativos e mitógenos como tromboxano A₂, fatores de crescimento derivados de plaquetas e trombina. Esta última é gerada juntamente com a ativação plaquetária e liberação de serotonina, que é um fator de crescimento, assim em uma ação sinérgica a proliferação das células musculares lisas é induzida pela trombina e serotonina (LUZ *et al.*, 2016).

Nas primeiras 24 horas após o processo de intervenção coronária percutânea, os neutrófilos e monócitos se infiltram e aderem na parede vascular, ainda nessa fase do processo inflamatório, células inflamatórias contribuem para a liberação de citocinas, como a interleucina-1 (IL-1) e outras substâncias parácrinas (moléculas sinalizadoras que atuam nas células próximas), levando a migração e proliferação das células musculares lisas. Leucócitos e células gigantes se infiltram ao redor das hastes do *stent*, contribuindo também para o crescimento das células musculares lisas (LUZ *et al.*, 2016). As células gigantes, quando ativadas, liberam fatores de crescimento e agentes quimiotáticos, os quais, em conjunto com a redução de fatores protetores como prostaciclina (um potente vasodilatador e inibidor da ação plaquetária) e óxido nítrico (produzidos pelo endotélio) aceleram ainda mais a migração e proliferação de células musculares lisas, transformando em células secretoras e contribuindo para o crescimento da lesão (COSTA; SIMON, 2005; FINN *et al.*, 2007; LUZ *et al.*, 2016).

3.2 Interações entre o corpo e a superfície dos Biomateriais

3.2.1 Fenômenos de superfície podem levar a adesão plaquetária aumentando ou diminuindo a biocompatibilidade

Todos os materiais estão sujeitos a fenômenos de superfície quando expostos ao ambiente circundante, esses fenômenos podem ser classificados como físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Quando um biomaterial é implantado, o primeiro fenômeno que ocorre é adsorção de água e proteínas que vão iniciar uma cascata de eventos biológicos, resultando na resposta biológica ao corpo estranho (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002). Além disso, dependendo da conformação, a adsorção das proteínas vai iniciar outros eventos de bioadesão como adesão celular, de plaquetas e de bactérias.

As propriedades das proteínas que determinam a interação com a superfície são relacionadas a estrutura primária, pois, a sequência de aminoácidos é crucial para o comportamento da interação entre proteína e superfície. Dessa forma, tamanho da proteína, carga geral, estabilidade da estrutura secundária e terciária são fatores que também influenciam na adsorção das proteínas, além disso, proteínas adsorvidas podem afetar as propriedades do material como suas propriedades mecânicas, tornando-o mais frágil e quebradiço, podendo induzir sua degradação.

Materiais metálicos em contato com fluidos corporais podem sofrer de corrosão, reduzindo a biocompatibilidade do dispositivo e liberando produtos de corrosão, assim esse processo de degradação pode alterar as funções das células da vizinhança do biomaterial, mesmo células distantes podem ser afetadas devido ao transporte dos produtos dentro do corpo (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002). Além disso, a literatura reporta efeitos das proteínas no comportamento de corrosão das ligas biomédicas, acelerando sua dissolução (KLOK; IGUAL MUNOZ; MISCHLER, 2020), esse fenômeno é atribuído à tendência de complexação das proteínas com os metais, resultando em uma redução da energia de ativação e aumento da taxa de dissolução. Desse modo, a adsorção da albumina carregada negativamente pode atacar as superfícies (HEDBERG *et al.*, 2013) reduzindo o pH e promovendo a corrosão do aço inoxidável 316L (XU *et al.*, 2018)

Os eletrólitos minerais que carregam cargas negativas e positivas como, por exemplo, sódio, potássio, cálcio, cloreto e fosfato (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^+ , Cl^- , e PO_4^{3-}), presentes nos fluidos corporais também podem influenciar nos fenômenos de superfície, pois influenciam

a interação da biomolécula com a superfície facilitando ou dificultando, gerando uma alteração química da composição da superfície do biomaterial e podendo levar a fratura e corrosão (HØL; GJERDET; JONUNG, 2019).

3.2.2 Fenômenos biológicos

Após a implantação de um dispositivo médico, uma sequência de eventos ocorre: lesão, interações do material com o sangue, *provisional matrix formation*, inflamação aguda, inflamação crônica, reação de corpo estranho e fibrinólise (dissolução do coágulo de fibrina). A resposta inflamatória inicial é ativada pela lesão dos tecidos de conexão vascularizados, como o sangue a seus componentes que estão envolvidos na resposta inflamatória inicial, coagulação sanguínea e trombose (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

A inflamação aguda é de relativa curta duração, podendo ocorrer de minutos até dias dependendo do tamanho da lesão e sua principal característica é a perda de fluido e proteínas do plasma além da migração de leucócitos. Já a inflamação crônica é menos uniforme histologicamente que a inflamação aguda, sendo, em geral, caracterizada pela presença de células mononucleares (por exemplo, monócitos e linfócitos) no local do implante, com a proliferação de vasos sanguíneos e tecidos conectivos. A inflamação crônica é tipicamente de curta duração e confinada no local do implante, mas quando há a persistência da inflamação após um período de três semanas geralmente isso é indício de uma infecção.

Após a resposta inflamatória aguda e crônica serem resolvidas, tecido de granulação pode ser identificado na região pela presença de macrófagos, infiltração de fibroblastos e nova vascularização no novo tecido saudável, mas dependendo do grau da lesão, é possível identificar tecido de granulação 3-5 dias após a implantação. A presença de um implante altera o processo de cicatrização ocasionando uma forma especial de inflamação não imune chamada de reação a corpo estranho que envolve adsorção de proteína, macrófagos, células gigantes de corpo estranho multinucleadas (por exemplo, macrófagos fundidos), fibroblastos e angiogênese podendo resultar em fibrinólise, cicatriz ou mesmo rejeição do biomaterial. A presença dessa inflamação com o desenvolvimento do tecido de granulação é considerada a resposta normal de cicatrização de feridas aos biomateriais implantados, desse modo, para a maioria dos biomateriais inertes, a reação tardia dos tecidos resulta em um tecido fibroso composto de colágeno e fibroblastos para que seja possível que os componentes celulares da reação de corpo estranho separem esta cápsula fibrosa do tecido de granulação.

Muitos fatores influenciam a biocompatibilidade de um implante como, por exemplo, forma, tamanho do implante, composição do material, molhabilidade, rugosidade e carga da superfície. Assim, o biomaterial não deve (a) alterar as proteínas (incluindo enzimas) do plasma para que as reações adversas não sejam ativadas; (b) causar a formação de trombos, resposta imunológica adversa ou câncer; (c) destruir ou sensibilizar os elementos celulares do sangue; (d) produzir resposta alérgica ou tóxica; (e) gastar eletrólitos e (f) ser afetado por métodos de esterilização. Por outro lado, o ambiente do corpo não deve causar degradação (mecânica ou biológica) ou corrosão do biomaterial, pois isso resultaria em perda de propriedades físicas e mecânicas (ELIAZ, 2019).

3.2.3 Hemocompatibilidade

A hemocompatibilidade ou compatibilidade com sangue é uma característica essencial para qualquer biomaterial usado em dispositivos médicos para contato com o sangue, pois a hemocompatibilidade é a habilidade do material de manter sob controle a resposta trombótica e inflamatória induzida pela superfície que entrou em contato com o sangue. Essas respostas correspondem a uma série de eventos interconectados que acontecem na superfície (MANIVASAGAM *et al.*, 2021).

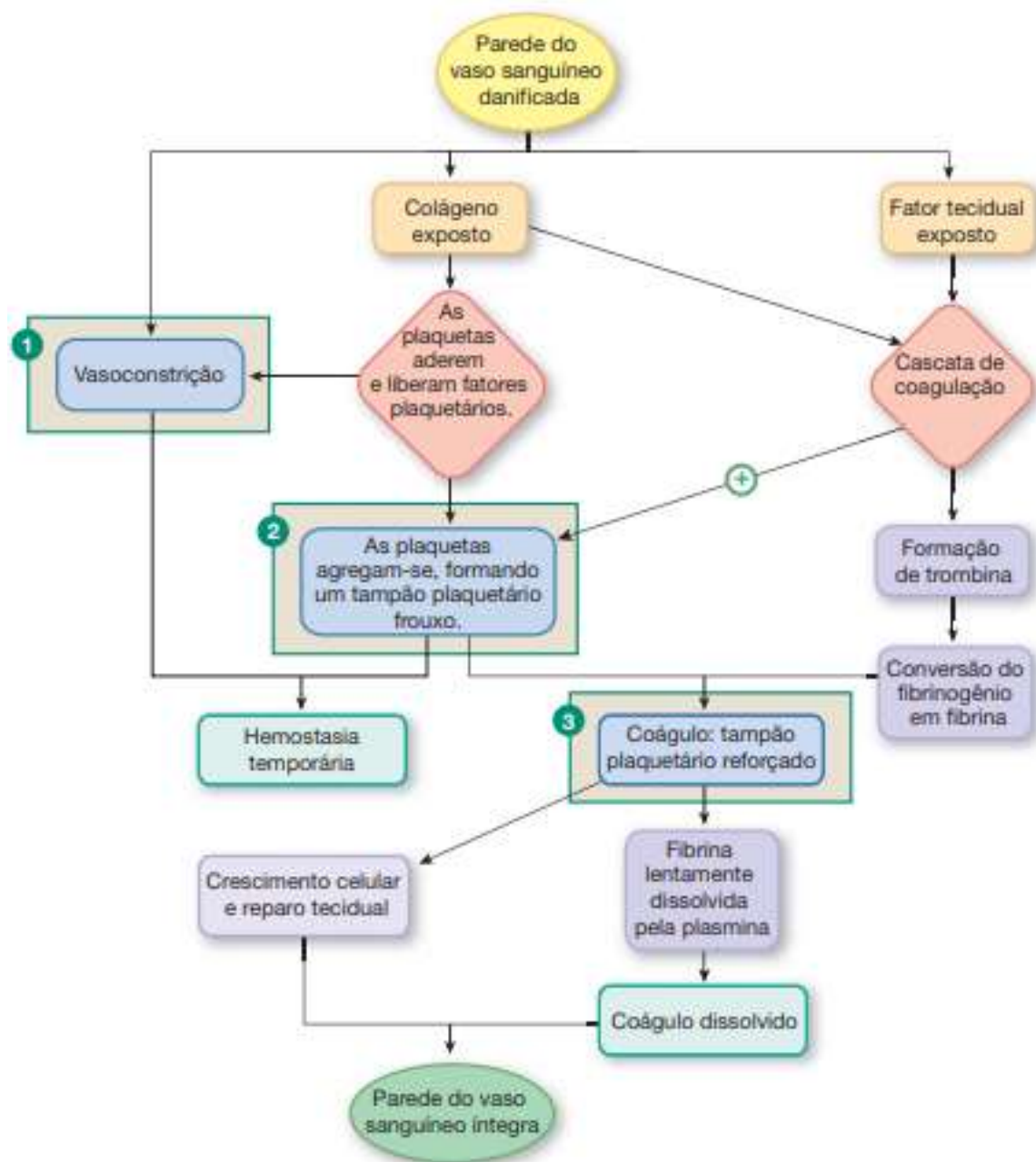
3.2.3.1 Hemostasia

Quando um vaso sanguíneo é lesado, o processo da hemostasia é iniciado e segue as três etapas: vasoconstrição, formação do tampão plaquetário e formação do coágulo. Inicialmente, tem-se a vasoconstrição para reduzir o fluxo sanguíneo e pressão no vaso evitando a perda sanguínea, mas logo em seguida, a lesão for bloqueada por um tampão plaquetário solto. Quando as plaquetas são expostas ao colágeno da área danificada, elas aderem e são ativadas liberando citocinas (proteínas que regulam a resposta imunológica), as quais, além de aumentar a vasoconstrição, ainda ativam mais plaquetas que vão se agregando para formar o tampão plaquetário solto que consiste em um aglomerado de plaquetas formado em torno do local lesionado, com a função de contenção inicial do sangramento (SILVERTHORN, 2019).

O terceiro passo é a estabilização do tampão plaquetário pela formação de uma rede de proteínas fibrina para formar o coágulo, essa etapa é iniciada pelo colágeno e por uma mistura de fosfolípidios e proteínas (fator tecidual). Além disso, a agregação e adesão

plaquetária na área danificada também são promovidas por fatores químicos presentes na cascata da coagulação, que é o nome dado a uma série de reações enzimáticas que culminam com a produção da fibrina, mas quando o vaso é finalmente reparado, a fibrina é dissolvida pela enzima plasmina e o coágulo diminui (SILVERTHORN, 2019). O processo pode ser visualizado no esquema da Figura 3 onde 1 é a etapa de vasoconstrição, 2 é o bloqueio temporário do fluxo sanguíneo pelo tampão plaquetário e 3 é a formação do coágulo para conter o sangramento.

Figura 3 – Sistema de hemostasia e reparo tecidual disparados por lesão em vaso sanguíneo.

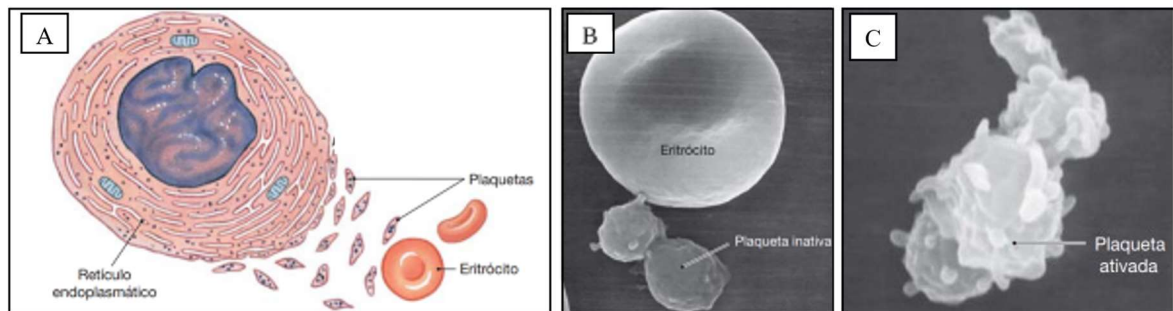


Fonte: adaptado de Silverthorn (2019).

3.2.3.2 Agregação plaquetária

As plaquetas são geradas pela fragmentação na medula óssea de megacariócitos que apresentam múltiplas cópias de DNA no núcleo e vão se fragmentando para formar as plaquetas que quando inativas, são pequenos fragmentos celulares em forma de disco menores que os eritrócitos como pode ser observado na Figura 4. Entretanto, quando estão ativadas, as plaquetas se apresentam com uma superfície externa pontiaguda além de se aderirem umas nas outras como pode ser identificado na Figura 4 (C).

Figura 4 - Ilustração representativa dos megacariócito e plaquetas. Borda do megacariócito soltando-se e formando os fragmentos celulares que são as plaquetas (A). Plaquetas inativas ao lado de eritrócito para comparação (B). Plaqueta ativada (C).



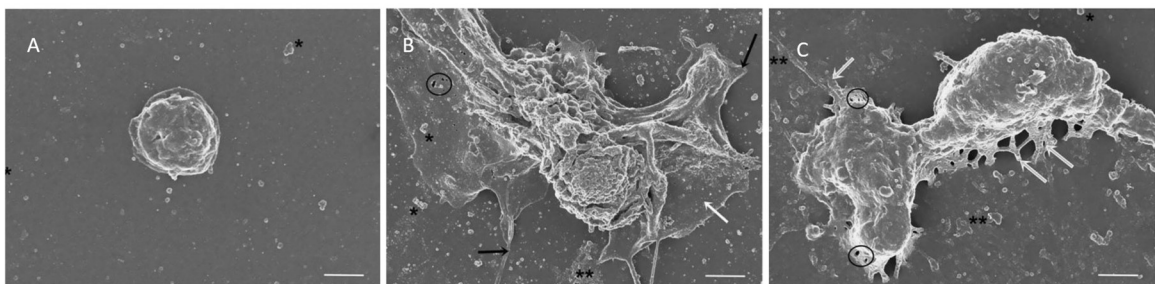
Fonte: adaptado de Silverthorn (2019).

Em lesões vasculares, há formação do tampão hemostático inicial pelas plaquetas que promovem a adesão, ativação e agregação culminando com a formação do tampão plaquetário. Assim, quando ocorrem as lesões vasculares, o colágeno é exposto ativando as plaquetas e se ligando a elas por meio de proteínas receptoras de membrana chamadas integrinas, ativando as plaquetas que liberam o conteúdo dos grânulos intracelulares serotonina (5-hidroxitriptamina), ADP e fator de ativação plaquetária (PAF) que por sua vez ativam mais plaquetas em uma alça de retroalimentação positiva iniciando a conversão dos fosfolípidos da membrana em tromboxano A₂ um vasoconstritor que contribui ainda mais para a agregação plaquetária. Dessa forma, o vaso lesionado é selado por um tampão plaquetário.

A fim de regular a atividade plaquetária podem ser utilizados agonistas ou fármacos antiplaquetários a depender do objetivo. Os agonistas são as substâncias que modulam a ativação plaquetária se ligando aos receptores e desencadeando reações bioquímicas como a secreção granular e formação de agregados plaquetários. Mas a depender da capacidade em estimular os grânulos plaquetários, os agonistas podem ser classificados como fortes e fracos, dentre eles ADP (difosfato de adenosina), trombina, colágeno, ácido araquidônico e epinefrina.

Na Figura 5 é possível observar a diferença entre uma plaqueta inativa e ativa. A morfologia da plaqueta inativa é discoidal conforme Figura 5 (A), mas quando elas entram em contato com uma superfície, as plaquetas se estendem e desenvolvem uma aparência dendrítica conforme Figura 5 (B) e (C), pois as plaquetas dendríticas sofrem conversão para formas espalhadas a medida em que o corpo central da plaqueta afunda sobre a superfície e o citoplasma preenche espaços entre os pseudópodes estendidos (GROUSE *et al.*, 1990).

Figura 5 - Imagem do MEV de plaqueta inativa (A), plaquetas ativadas (B) e (C). Escala de 1 μ m.



Fonte: adaptado de Agustine (2016).

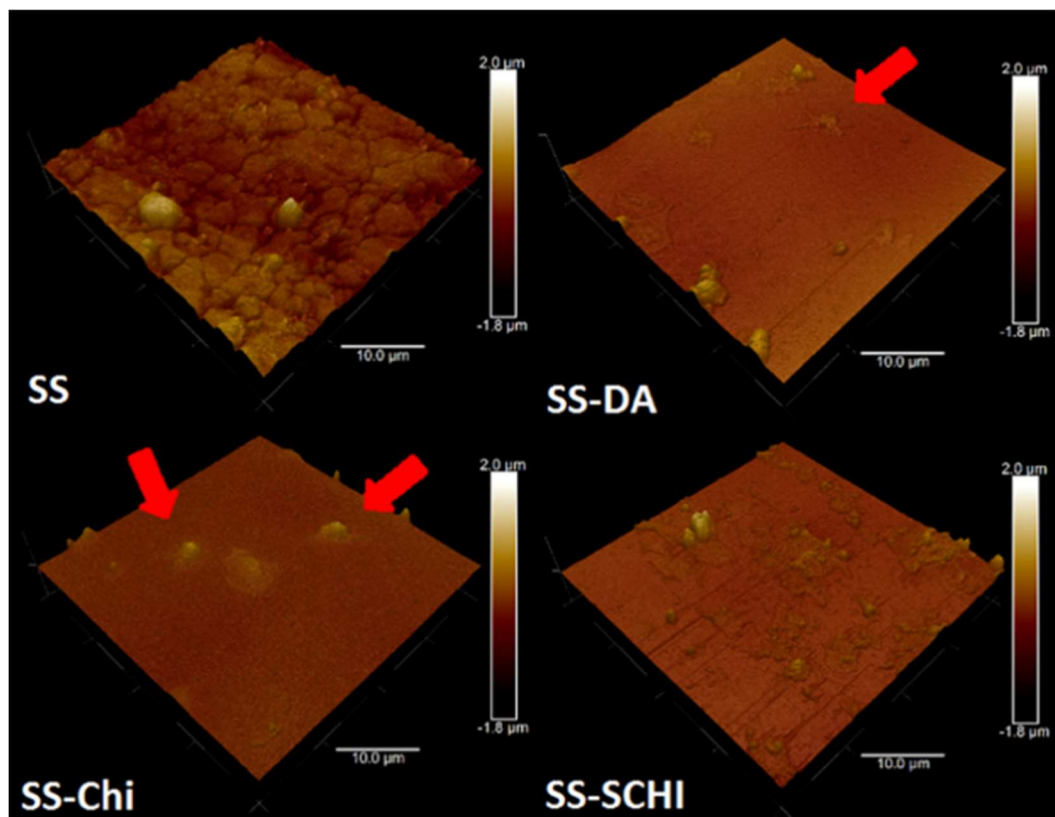
Agustine e colaboradores (2016) avaliaram as alterações observadas nas plaquetas por imagens de MEV a partir da ativação com trombina. As plaquetas com morfologia inicialmente discoide apresentaram, extensão de pseudópodes e espalhamento do citoplasma e formação de uma rede de fibrina estabilizando o coágulo. Em plaquetas ativas, foram identificadas micropartículas polimerizadas (indicadas por estrelas na Figura 5), depósitos de fibrina (indicados pela flecha cinza na Figura 5), poros de fibrina (indicados pelos círculos na Figura 5), pseudópodes (indicado pela flecha preta na Figura 5), espalhamento de parte do citoplasma da plaqueta (indicado pela seta branca na Figura 5) (AUGUSTINE *et al.*, 2016).

Por outro lado, os fármacos antiplaquetários são inibidores potentes da função plaquetária e agem por mecanismos específicos. As plaquetas ativadas liberam o ácido araquidônico, o qual é convertido pela COX 1 em prostaglandinas H₂, e em seguida, metabolizado a tromboxano A₂, promovendo a aglutinação das plaquetas. Assim, o mecanismo de ação do fármaco antiplaquetário ácido acetilsalicílico é a inativação da COX 1 inibindo assim a síntese de tromboxano. Já os fármacos clopidogrel e ticloplina são inibidores da ligação entre o ADP e seus receptores nas plaquetas, impossibilitando a ativação necessária para que as plaquetas se liguem ao fibrinogênio e umas as outra na agregação plaquetária. Devido ao uso de inibidores plaquetários eficazes, as angioplastia e os *stents* apresentam baixa taxa de

reestenose e trombose, revolucionando assim a medicina cardiovascular (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Campelo e colaboradores (2017) visualizaram a adesão plaquetária pela técnica de microscopia de força atômica (AFM) em amostras de aço inoxidável (SS), aço recoberto com dopamina (SS-DA), aço recoberto com quitosana natural (SS-Chi) e aço recoberto com quitosana sulfatada (SS-SChi). Plaquetas ativadas foram identificadas nas amostras de SS-DA e SS-Chi, pois as superfícies são ricas em grupos amino que agem como sítio de ligação para adsorção de proteínas. Por outro lado, a superfície de SS-SChi não apresentou plaquetas ativadas em virtude da baixa disponibilidade de grupos amino e devido à presença de cargas negativas presentes na quitosana sulfatada e são capazes de reduzir a adsorção de proteínas plasmáticas (CAMPELO *et al.*, 2017). As imagens do trabalho podem ser observadas na Figura 6.

Figura 6 – Imagem AFM das superfícies de aço inoxidável, aço inoxidável com dopamina, aço inoxidável com quitosana e aço inoxidável com quitosana sulfatada submetidas ao teste de adesão plaquetária.



Fonte: Campelo *et al.*, (2017).

3.2.3.3 Cascata da Coagulação

A passagem do sangue do estado líquido para o sólido é o terceiro passo da hemostasia chamada de coagulação sanguínea, cujo objetivo é evitar a perda de sangue com a formação de um coágulo gelatinoso. O processo é iniciado em duas cascatas, as quais, a depender do agente desencadeador, são classificadas como via extrínseca ou intrínseca (XU *et al.*, 2018).

O processo de coagulação transforma o tampão plaquetário em um coágulo, formado pelo fluido sanguíneo na coagulação, embora o processo seja dividido em duas vias, ambas terminam em uma única via comum. Inicialmente, quando o colágeno é exposto após um corte na pele, por exemplo, a via intrínseca (TTPA) ou via de ativação por contato é iniciada com a ativação do fator XII pelo colágeno.

Por outro lado, a via extrínseca é ativada a partir do fator tecidual (tromboplastina tecidual ou fator III), que é liberado pelo tecido danificado e acaba ativando o fator VII e desencadeando a via extrínseca. Embora existam as duas vias, ambas culminam na via comum onde a trombina produzida converte fibrinogênio em fibrina, um polímero insolúvel e parte formadora do coágulo. Assim, o processo de coagulação não é uma cascata simples, mas, na verdade os fatores das vias interagem tornando a coagulação uma rede (SILVERTHORN, 2019).

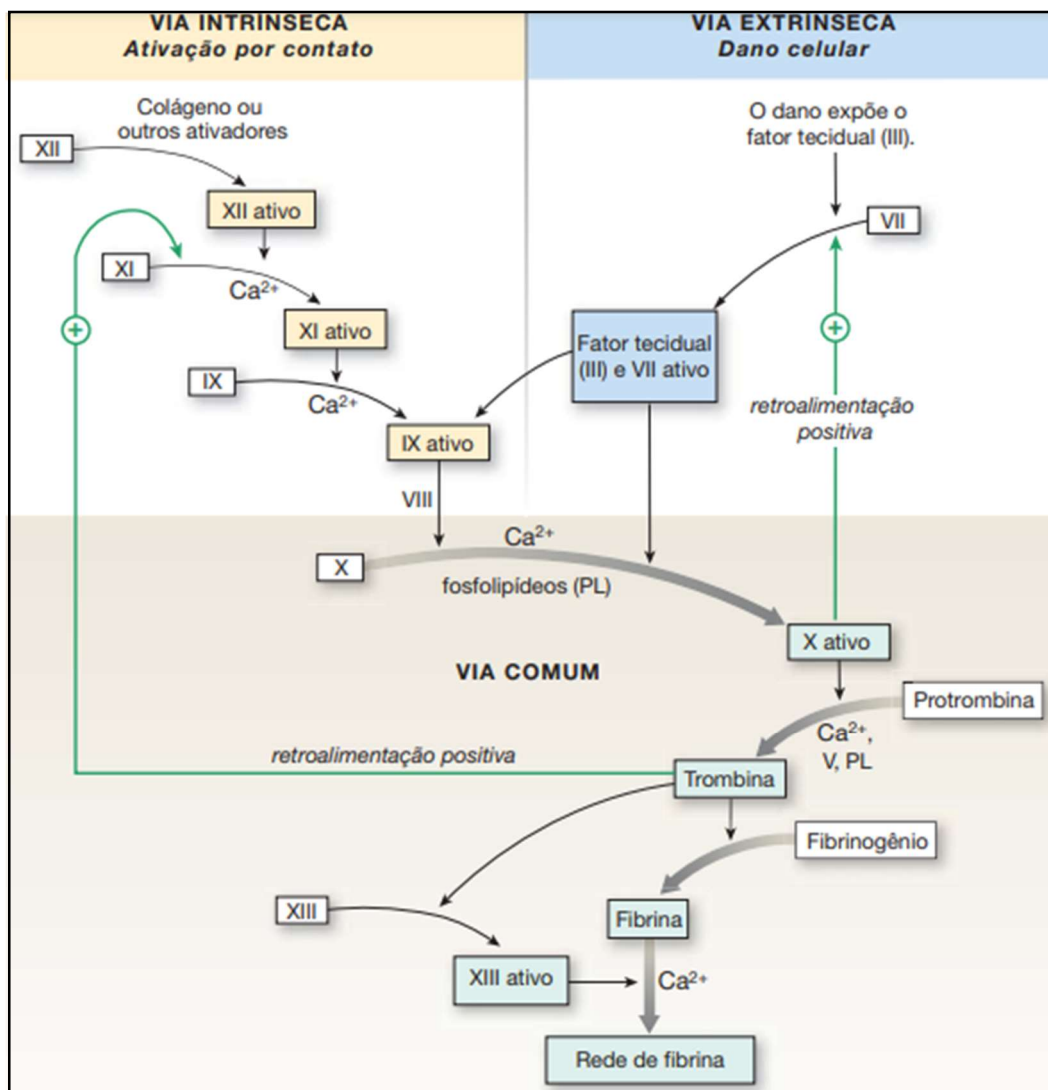
O último estágio da coagulação é a conversão de fibrinogênio em fibrina pela enzima trombina. Enquanto o tampão plaquetário é permeado pela fibrina que forma fibras capazes de reter eritrócitos na malha, a fibrina é convertida em um polímero com ligações cruzadas e o coágulo é estabilizado pelo fator XIII. Desse modo, a extensão da coagulação num vaso pode ser limitada pela inibição da adesão plaquetária ou cascata da coagulação (produção de fibrina) (SILVERTHORN, 2019).

Quando substâncias anticoagulantes são liberadas pelas células endoteliais, algumas reações da cascata da coagulação são bloqueadas. Por exemplo, a heparina e a antitrombina III são produzidas pelo corpo e juntas bloqueiam os fatores ativos IX, X, XI e XII. A primeira apresenta um efeito anticoagulante em virtude da sua estrutura rica em pentassacarídeos sulfatados que inibem o Fator Xa (WEITZ; WEITZ, 2010). Existem ainda fármacos fibrinolíticos (estreptoquinase, que é um medicamento antitrombótico) e os ativadores de plasminogênio tecidual (tPA) são usados a fim de dissolver coágulos sanguíneos.

Para prevenção da adesão plaquetária ao colágeno são utilizados agentes antiplaquetários (antagonistas dos receptores de interina nas plaquetas). Além disso, a formação do tampão plaquetário também é impedida pela inibição das enzimas COX (promove a síntese do tromboxano A2, que é um ativador plaquetário) feita pelo ácido acetil salicílico (AS). Enquanto o ácido acetilsalicílico bloqueia a agregação plaquetária impedindo a formação de coágulos, a Varfarina ou anticoagulantes cumarínicos bloqueiam a ação do cofator K, que é importante para a na produção do fator de coagulação II (trombina), IX, VII e X (SILVERTHORN, 2019).

Na Figura 7 é possível visualizar as etapas da via intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação.

Figura 7 - Cascata da coagulação com proteínas plasmáticas inativas (caixa branca) ativadas a cada etapa das vias intrínseca, extrínseca e comum.



Fonte: SILVERTHORN (2019).

Materiais baseados em quitosana sulfatada apresentam atividade anticoagulante devido à presença de grupos SO_3^- capazes de evitar a adsorção de proteínas envolvidas no início da cascata da coagulação (AMIJI, 1998). A modificação química da quitosana tanto diminui a carga positiva dos grupos de glucosamina, por substituição, quanto aumenta o nível de cargas negativas produzidas pelos grupos sulfatados. Assim, a atividade anticoagulante observada é provavelmente devido ao aumento da densidade de cargas negativas que neutralizam as cargas positivas dos resíduos de aminoácidos da trombina, impedindo a transformação do fibrinogênio e aumentando a atividade anticoagulante (OUERGHEMMI *et al.*, 2018).

A atividade anticoagulante também resulta da interação de cargas negativas dos grupamentos sulfatos com as cargas positivas das sequências peptídicas das proteínas reguladoras do processo de coagulação sanguínea como, por exemplo, a antitrombina (AT) e o cofator II de heparina (HCII). Desse modo é necessário conhecer não só o grau de sulfatação do polímero, mas também diversos fatores como: o peso molecular, o tipo de monossacarídeo, conformação da cadeia polimérica e ligação glicosídica (LIANG *et al.*, 2014). Ademais, outro fator determinante da atividade anticoagulante é a localização do grupo sulfato no polissacarídeo que pode determinar como se dará a interação com as proteínas (DORE *et al.*, 2013).

3.2.3.4 Fatores de superfície que afetam implantes em contato com sangue

O requisito mais importante para implantes em contato com o sangue é a compatibilidade sanguínea, pois células sanguíneas, proteínas e enzimas não devem ser degradadas em contato com o *stent*, assim fatores como trombogenicidade e tromboresistência são importantes (CHEN *et al.*, 2016).

A trombogenicidade depende tanto da rugosidade quanto da natureza elétrica e química da superfície. Em virtude da adesão de proteínas fibrosas de coagulação, uma superfície rugosa promove uma rápida coagulação sanguínea, por outro lado, em uma superfície polida (vidro, PMMA, aço inoxidável) a coagulação não é rápida. Já em relação à natureza elétrica das superfícies, tem-se uma melhor tromboresistência quando a superfície é carregada negativamente devido às cargas líquidas negativas presentes nas membranas das células sanguíneas e sendo essa carga superficial determinada pelos grupos funcionais presentes no polímero (CHEN; THOUAS, 2018).

3.3 Recobrimento da superfície do *Stent*

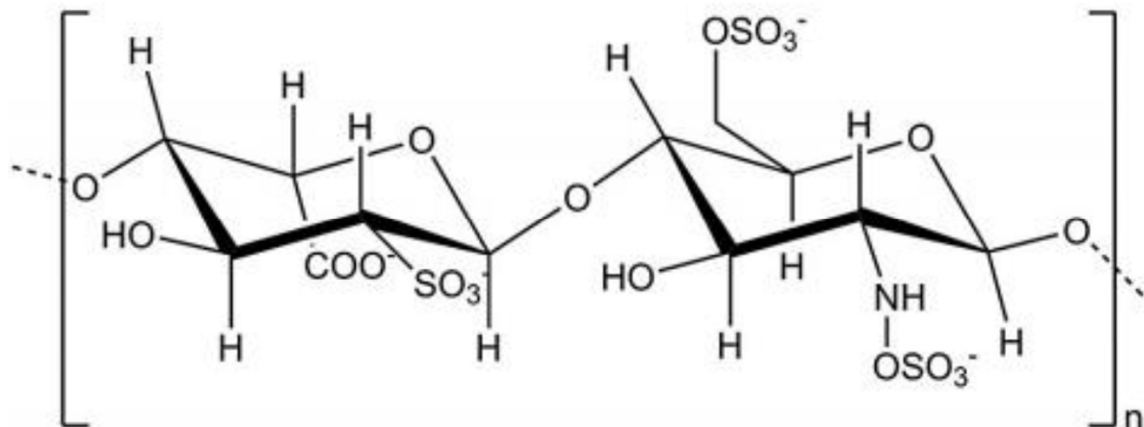
O desenvolvimento de recobrimentos bioativos com biomoléculas objetivando-se obter uma superfície ajustável com funcionalidades como hemocompatibilidade tem aumentado. Moléculas como dopamina que adsorvem em superfícies metálicas e possuem grupos terminais funcionais que podem ser utilizados como ponto de ancoragem para o recobrimento com moléculas bioativas como a quitosana tem sido cada vez mais utilizadas.

3.3.1 Heparina

A 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 (Figura 8). A presença de grupos carboxila e extensa sulfatação aniônica da heparina. Dessa forma, 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 muitos animais para suprir a demanda mundial por heparina. Mesmo que as aplicações antitrombogênicas da heparina sejam amplamente estudadas, esse fármaco não é ideal para todas as aplicações, pois a heparina é usualmente fabricada de animais e pode causar reações alérgicas em pacientes que são sensíveis a reagentes derivados de animais como o porco, dessa forma, é importante evitar o risco potencial de contaminação. Apresenta ainda alta geração de subprodutos durante processamento (TAYLOR *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a busca por novos materiais que simulem uma superfície heparinizada e não apresentem as desvantagens da droga intensificou-se e moléculas sulfatadas semelhante à heparina (Figura 8) apresentando potencial anticoagulante e antitrombótico, não tóxicas e disponíveis na natureza de fácil obtenção como a quitosana sulfatada apresentaram destaque. Derivados da quitosana são de origem vegetal e possuem potencial de substituir a heparina em pacientes alérgicos.

Figura 8 - Estrutura química da heparina.



Fonte: adaptado de MORAES *et al.*, (2016).

3.3.2 Quitosana natural e quitosana sulfatada

A quitosana é um biopolímero biocompatível, não-tóxico, biodegradável, antioxidante e anticâncer 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), que é obtido da N-desacetilação da quitina que tem seus grupos acetamido de unidades GlcNAc hidrolisados resultando em unidades GlcN (GUINESI; CAVALHEIRO, 2006). Além de ser encontrada na carapaça de caranguejos, quitosana é também encontrada naturalmente em algumas paredes de células fúngicas. Na Figura 9 é possível observar a estrutura química da quitosana.

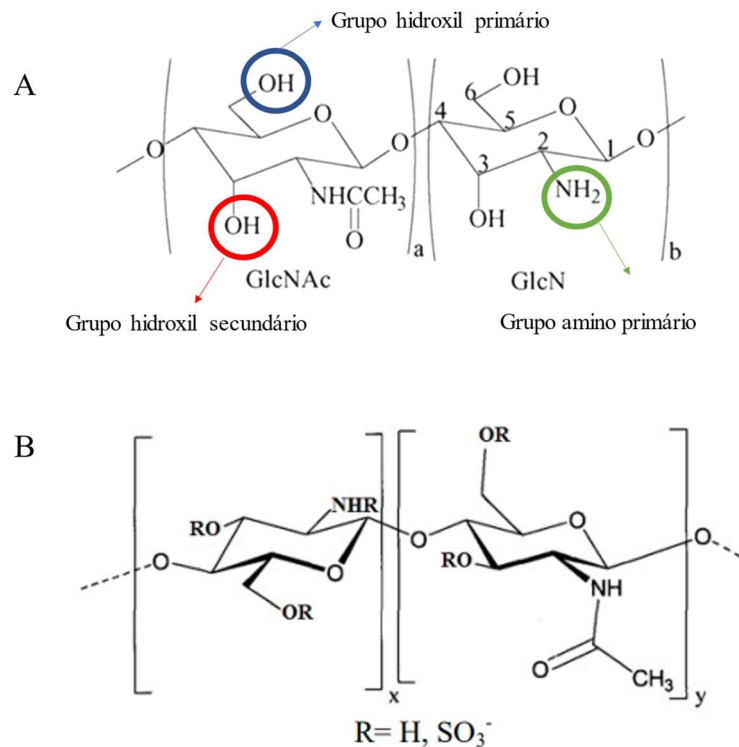
Devido à protonação de grupos amino das unidades GlcN, cargas positivas estão presentes ao longo da cadeia e o polímero torna-se solúvel em meio aquoso moderadamente ácido. Comportando-se ainda como eletrólitos catiônicos nesses meios, as propriedades antibacterianas da quitosana são atribuídas à interação de sua cadeia carregada positivamente com as cargas negativas presentes nas membranas celulares de bactérias (KONG *et al.*, 2010). A quitosana possui grupos funcionais susceptíveis a modificação química como, por exemplo a amina primária (NH), o grupo hidroxila primário e secundário (OH) em seu monômero (Figura 9), de modo que pode ser modificado quimicamente sem alterar seu grau de polimerização visando tornar o polímero semelhante à heparina (MOURYA; INAMDAR, 2008).

Foi proposta a modificação química (CROISIER; JÉRÔME, 2013) da quitosana pela sulfatação, que é uma técnica utilizada para controlar a interação do polímero com outros

componentes como componentes orgânicos e íons metálicos (VAZ *et al.*, 2018). Por sua vez, a reação de sulfatação torna o sal de quitosana estruturalmente semelhante a heparina, que é rica em grupos carregados negativamente (MOURÃO; PEREIRA, 1999), assim a quitosana sulfatada apresenta atividade anticoagulante, bem como inibição de hemoaglutinação devido à semelhança estrutural com este fármaco (CAO *et al.*, 2014).

A quitosana sulfatada apresenta ainda outras atividades biológicas como atividade antioxidante, antibacteriana, anti-HIV, antiviral, e inibição de enzimas (XING *et al.*, 2005) e deve apresentar um mecanismo anticoagulante semelhante à heparina em virtude da similaridade entre as estruturas (WEITZ; WEITZ, 2010). Entretanto, a atividade anticoagulante da quitosana e seus derivados é influenciada por muitos fatores, incluindo o grau de sulfatação e a localização do grupo sulfatado na cadeia polimérica (SKORIK *et al.*, 2017). Na Figura 9 é possível observar a estrutura química da quitosana sulfatada.

Figura 9 – Estrutura química da quitosana natural (A) e sulfatada (B).



Fonte: MORAES *et al.*, (2019).

A metodologia utilizada no presente trabalho resulta na sulfatação da quitosana nas posições 2,3 e 6 resultados na quitosana 2-N-3,6-O-quitosana sulfatada com peso molecular de 5,050 Da e grau de sulfatação de 1,37 (MORAES *et al.*, 2019), que é um material com grande potencial para ser estudado como substituto da heparina que embora seja um fármaco

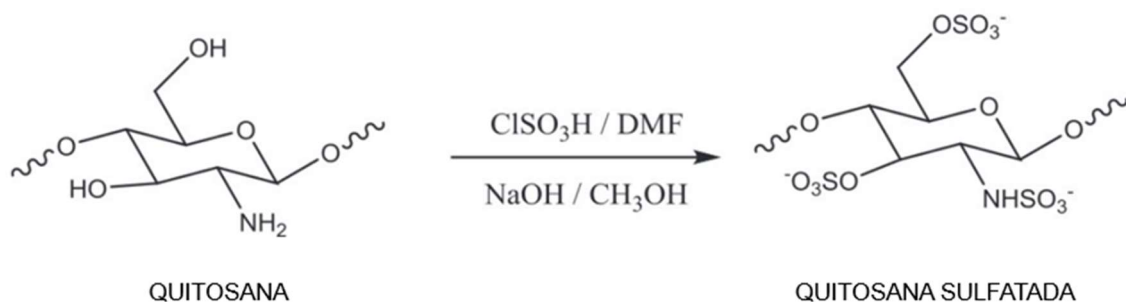
amplamente estudado, apresente seu mecanismo de ação elucidado e um alto grau de sulfatação (DREYFUSS *et al.*, 2009) poderia ser substituída por moléculas biocompatíveis e que apresentassem sua atividade anticoagulante modulada pela realização de uma reação de sulfatação.

A sulfatação da quitosana pode ser realizada por diferentes metodologias, por exemplo, com H₂SO₄ concentrado (NAGASAWA *et al.*, 1971), piridina (GAMZAZADE *et al.*, 1997), ácido clorossulfônico (HUANG *et al.*, 2003), ácido clorossulfônico com dimetilformamida (DMF) (MORAES *et al.*, 2019) e 5-Formil-2-furan sal de sódio sulfônico (EFSA) (CAMPELO *et al.*, 2017).

A sulfatação de quitosana com ácido clorossulfônico em meio com dimetilformamida (DMF) é utilizada para funcionalizar o polímero (MORAES *et al.*, 2019; PAN *et al.*, 2021; RAKHMANOVA *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009) por meio da incorporação de grupos sulfônicos na quitosana, que é dependente da temperatura e tempo de reação podendo os grupos sulfatados serem incorporados via grupos amino e hidroxil. Assim, dependendo das condições da reação, o grupo sulfatado pode ser incorporado no C-2 (grupo NH₂), C-3 (grupo OH) e C-6 (grupo CH₂OH) (RAKHMANOVA *et al.*, 2009).

A síntese de quitosana sulfatada é uma reação de um passo e o mecanismo da reação é uma substituição eletrolítica (MANIK; KABAN, 2022) onde os prótons são substituídos por grupos -SO₃H (IMRAN *et al.*, 2020) conforme reação identificada na Figura 10.

Figura 10 - Síntese da quitosana sulfatada com ácido clorossulfônico.



Fonte: adaptado de IMRAN *et al.*, (2020).

Rakhmanova e colaboradores (2009) realizaram um estudo de incorporação de grupos sulfatados na quitosana variando a temperatura de reação e tempo usando o ácido clorossulfônico. Ao aumentar a temperatura de reação de 50°C para 60°C junto com uma redução no tempo de reação de 60 min para 45 min houve uma redução do grau de sulfatação. Já quando a temperatura foi aumentada para 80°C mantendo o tempo de reação em 60 min houve um aumento de 1.14 vezes no conteúdo de S (RAKHMANOVA *et al.*, 2009).

Abu El-Soad *et al.*, (2019) produziram uma quitosana sulfatada com reticulação a partir de uma solução de quitosana diluída em ácido acético com glutaraldeído. O complexo sulfatante foi produzido com 4,5 mL de ácido clorossulfônico em 30 mL de DMF. A quitosana previamente reticulada foi adicionada ao DMF e ficou sob agitação por 12 horas na temperatura ambiente. Posteriormente, a quitosana foi filtrada e adicionada ao complexo sulfatante com agitação a 20 °C por 4,5h. Ao final da reação, a quitosana sulfatada foi precipitada com metanol em banho de gelo. A eficiência da reação foi mostrada no FTIR com o aparecimento das bandas indicando a presença dos grupos sulfatados (ABU EL-SOAD *et al.*, 2019).

Em outra metodologia proposta para modificação da quitosana, um complexo sulfatante de DMF-SO₃ foi preparado com ácido clorossulfônico em DMF (v/v foi 1:5). Em seguida, a quitosana em pó foi agitada em balão de três bocas contendo formol e ácido fórmico para obter um gel de quitosana. Posteriormente, o complexo foi adicionado ao gel e a reação foi processada com aquecimento durante 1,5 h. A mistura resultante foi precipitada 3 vezes com etanol seguindo para um resfriamento por 30 min. O precipitado foi filtrado e lavado com EtOH. Por fim, o precipitado obtido foi dissolvido em água destilada, neutralizado com solução de NaOH 2 M, dialisado e liofilizado (XU *et al.*, 2021).

3.3.3 Polidopamina

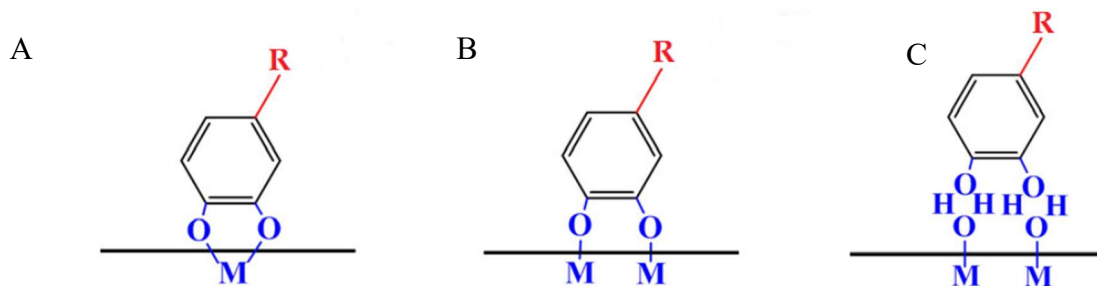
As catecolaminas (norepinefrina, epinefrina e dopamina) quimicamente são aminas ativas que apresentam em sua estrutura o anel catecol que se ligam a superfícies por meio da autopolimerização via oxidação, pois em condições alcalinas, o catecol é oxidado na forma de quinona (KORD FOROOSHANI; LEE, 2017) cuja forma oxidada permite a reação do catecol com a própria quinona (autopolimerização), tiol e grupos de aminas, por adição de Michael ou reação de base Schiff produzindo camadas covalentemente funcionais (NAM *et al.*, 2013). O catecol se liga na superfície metálica proporcionando a disponibilidade de grupos funcionais terminais que podem ser usados como ponto de ancoragem para outras biomoléculas como a quitosana (CAMPELO *et al.*, 2020).

O catecol é responsável por realizar a ligação covalente entre a interface orgânica (que podem ser biopolímeros ativos como a quitosana) e a superfície inorgânica, garantindo assim estabilidade ao recobrimento. O mecanismo de ligação covalente entre o catecol e o substrato metálico pode ocorrer com a ligação de ambas hidroxilas a um único átomo (Figura 11 A) ou cada hidroxila pode fazer uma ligação com diferentes átomos do substrato, sendo que

pode ser uma ligação covalente entre o catecol e o substrato (Figura 11B) ou o catecol e o substrato podem se manter intactos e separados durante a transferência de elétrons (Figura 11 C). Outros mecanismos incluem ligação monodentada e uma mistura de ligações monodentadas, bidentadas e adsorção (CAMPELO *et al.*, 2020).

Vários estudos de modificação de superfície utilizam a dopamina (GE *et al.*, 2009; KOHRI *et al.*, 2014; SAIDIN *et al.*, 2013; WANG; ZHITOMIRSKY, 2012) a qual pode polimerizar em vários substratos, incluindo metais nobres, materiais inorgânicos (SiO_2 e Al_2O_3), polímeros orgânicos (polietileno, poliestireno, tereftalato de polietileno e policarbonato), além de criar nanopartículas revestidas de polidopamina (KOHRI *et al.*, 2014).

Figura 11 - Mecanismos adesivos dos grupos catecois.



Fonte: CAMPELO *et al.*, (2020).

A espessura do filme de polidopamina sobre o substrato aumenta com o tempo e a temperatura de imersão, alcançando seu equilíbrio após 24h à temperatura ambiente. No presente trabalho, a polidopamina foi escolhida a fim de se desenvolver um revestimento com ligação covalente entre os substratos de aço inoxidável e titânio e as biomoléculas de quitosana e quitosana sulfatada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O esquema mostrado na Figura 12 apresenta as etapas desenvolvidas no trabalho. A primeira etapa foi destinada à obtenção e caracterização da quitosana sulfatada e ao desenvolvimento de filmes tanto de quitosana natural quanto de quitosana sulfatada reticulados ou não com glutaraldeído. Em seguida, foi realizado o recobrimento das superfícies de aço inoxidável 316 L e nanotubos de titânio com a quitosana natural e sulfatada.

Inicialmente, foi feita a caracterização da quitosana sulfatada sintetizada por análises de agregação plaquetária, ensaios de coagulação, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e tempo de protrombina (TP), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e termogravimetria (TG). Os filmes desenvolvidos a partir da quitosana natural e sulfatada (com ou sem reticulação) também foram caracterizados por FTIR, TG, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e citotoxicidade.

Na segunda etapa foi realizado o recobrimento das superfícies de aço inoxidável 316L e dos nanotubos de titânio (crescidos sobre a liga de Ti10Mo8Nb6Zr) com quitosana natural e quitosana sulfatada (com ou sem reticulação por glutaraldeído). Em seguida, foi realizado o teste de adesão plaquetária sobre as superfícies recobertas seguido de MEV.

Figura 12 - Esquema ilustrativo das etapas desenvolvidas no presente trabalho.

Síntese de quitosana sulfatada e desenvolvimento de filmes de QN e QS com ou sem reticulação por glutaraldeído

- Avaliação biológica da quitosana natural e sulfatada:
 - Avaliação da coagulação (TP e TTPA)
 - Agregação plaquetária
- Caracterização:
 - Caracterização por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)
 - Caracterização por termogravimetria (TG e DTG)
 - Avaliação de citotoxicidade e MEV dos filmes

Recobrimento das superfícies de aço inoxidável e nanotubos de TiO₂

- Teste da adesão plaquetária
- Visualização das plaquetas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Fonte: elaborado pela autora.

4.1 Materiais

Foram utilizados quitosana (CÓD 48165), albumina sérica bovina (CÓD. A2153), fibrinogênio de plasma bovino (CÓD. F8630-16), ácido clorossulfônico (HClSO_3), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC), éter bis(carboximetílico) de poli(etilenoglicol) (PEGb) e ácido 2-etanossulfônico (MÊS) da Sigma Aldrich, hidróxido de sódio (NaOH) e N.N-dimetilformamida (DMF) da Labsynth, metanol e glutaraldeído da VETEC Química Fina (Brasil), membrana de diálise da INLAB, kits para testes TTPA CLOT e TP CLOT da Bios Diagnóstica.

As amostras de aço inoxidável 316L foram gentilmente cedidas pelo Professor Walney Silva Araújo do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Ceará (UFC). Enquanto as ligas de $\text{Ti}_{10}\text{Mo}_8\text{Nb}_6\text{Zr}$ já modificadas com crescimento de nanotubos de TiO_2 (CHURAKOVA *et al.*, 2021) foram gentilmente cedidas pela equipe da Professora Ana Paula Rosifini Alves Claro da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

4.2 Aspectos éticos

O sangue humano foi coletado de doadores saudáveis em tubos 3,6 mL contendo citrato 3,2% por profissionais treinados e respeitando a resolução n° 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Para o tratamento de amostras de sangue humano, foi submetido projeto aprovado mediante certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) n° 61280822.7.0000.505 com parecer n° 5.589.080 emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os estudos de agregação e adesão plaquetária foram realizados com sangue humano coletado de doadores voluntários com prévia assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Conforme documento em anexo.

4.3 Reação de sulfatação para modificação da quitosana natural

4.3.1 Metodologia de sulfatação

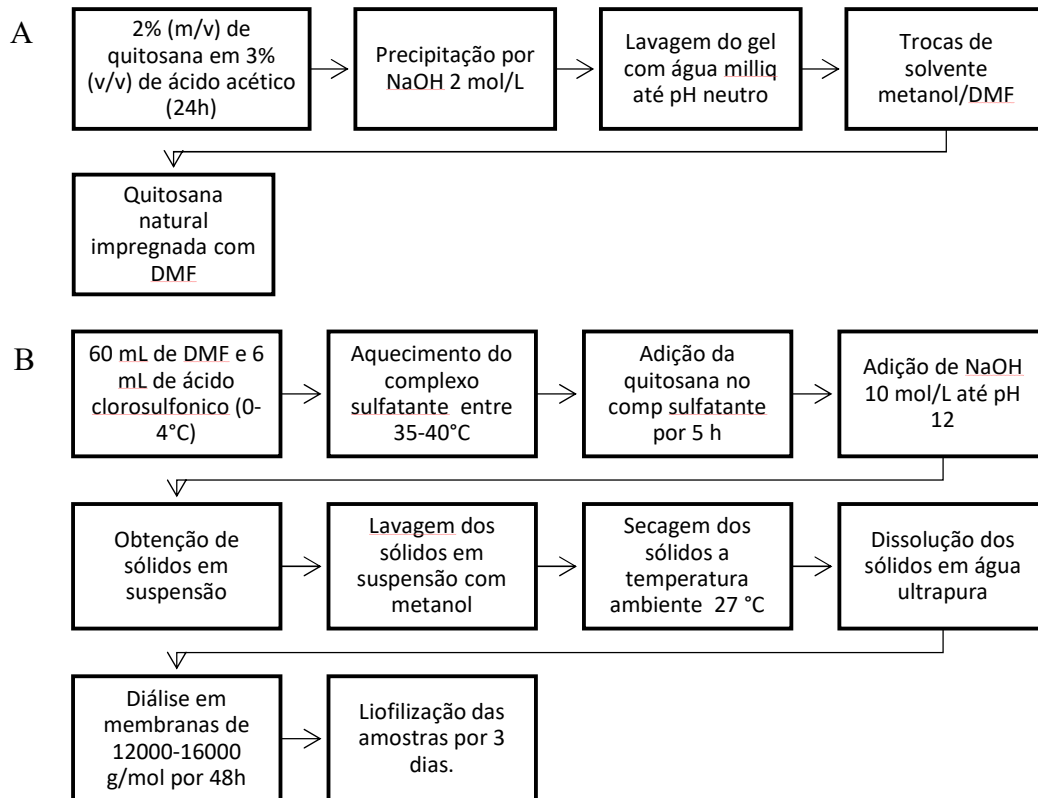
O procedimento para sulfatação da quitosana (grau de desacetilação 77%) foi realizado segundo metodologia proposta por MORAES *et al.*, 2019, assim a metodologia

utilizada no presente trabalho resulta na sulfatação da quitosana nas posições 2,3 e 6 resultados na quitosana 2-N-3,6-O-quitosana sulfatada com peso molecular de 5,050 Da e grau de sulfatação de 1,37 (MORAES *et al.*, 2019). Inicialmente, uma solução de 2% (m/v) de quitosana em 3% (v/v) de ácido acético foi preparada com água MilliQ e conduzida a agitação mecânica por 24 h. A solução foi, então, precipitada com NaOH 2 mol/L para obter um gel de quitosana. Em seguida, o gel foi lavado com água MilliQ até atingir pH neutro, separado através de filtração em papel filtro e o excesso de água foi retirado por uma leve pressão.

Em seguida, foi realizada uma troca de solventes, sendo a primeira solução de 100% (v/v) metanol, na qual a quitosana ficou em contato por 30 minutos sob agitação e depois foi filtrada. Seguiu-se variando as soluções com o aumento das concentrações de DMF para 20, 40, 60, 80 e 100% (v/v) com intervalos de 30 minutos cada. Finalizando a última troca com uma solução de 100 % (v/v) DMF e uma última filtragem para retirar o excesso de solvente.

Para preparar o complexo sulfatante, adicionou-se 6 mL de 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. Após a mistura atingir a temperatura ambiente, seguiu-se com a agitação até que a temperatura entre 35-40 °C fosse atingida. O gel de quitosana foi adicionado ao complexo e deixou-se sob agitação por 5 h. A solução amarelo-clara obtida foi reagida com NaOH 10 mol/L até atingir pH 12. Os sólidos em suspensão obtidos foram filtrados e lavados com metanol (6x) e seco a temperatura ambiente 27 °C. O sólido seco foi disperso em 100 mL de água destilada e conduzido à diálise contra água destilada por 48 h 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 placas Petri e congelada por duas horas em ultrafreezer, sendo, em seguida, conduzido à liofilização para obter o liofilizado de quitosana sulfatada. Esquema pode ser identificado na Figura 13.

Figura 13 - Esquema da metodologia utilizada para realizar a dissolução da quitosana em dimetilformamida (A) e a reação de sulfatação da quitosana natural com ácido clorossulfônico (B).



Fonte: elaborado pela autora.

4.3.2 Caracterização da quitosana natural e quitosana sulfatada

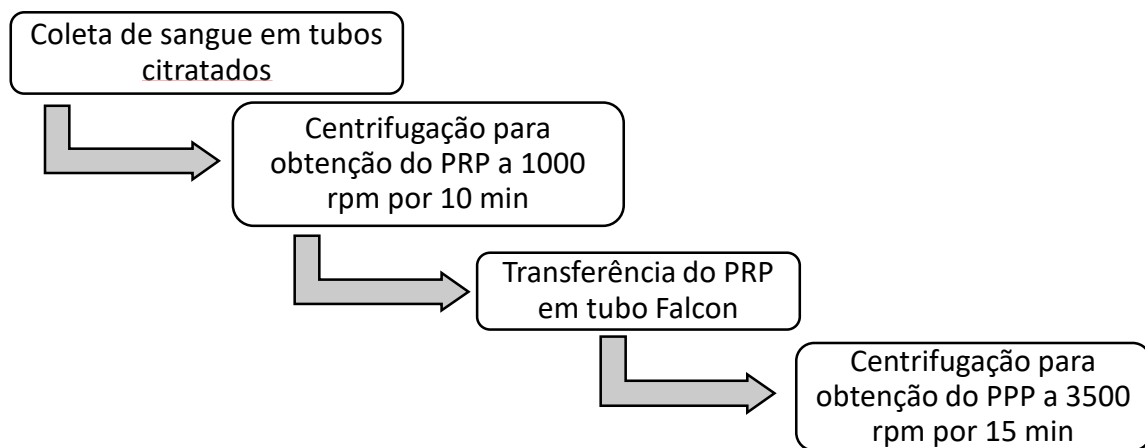
4.3.2.1 Efeito sobre agregação de plaqueta humana

Foi realizado ensaio de agregação plaquetária na quitosana natural e sulfatada com sangue coletado de doadores voluntários em tubos citratados. Para evitar uma possível ativação das plaquetas, o primeiro tubo de cada doador foi descartado. O tubo foi homogeneizado por inversão suave após coleta. As amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente 27 °C durante 10 min a 1000 rpm para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) que foi transferido para tubos de Falcon. Posteriormente foi realizada uma segunda centrifugação por 15 min a 3500 rpm para obter o plasma pobre em plaquetas (PPP) utilizado como branco no equipamento agregômetro. O PRP foi deixado em descanso por 30 minutos antes de se iniciar o teste. A porcentagem de agregação plaquetária foi obtida calculando a área abaixo da curva da agregação pelo tempo no software Aggrolink 8 (Chrono-log Corp., USA) do agregômetro. O

PRP foi pré-aquecido a 37 °C, então tratada com amostras de quitosana sulfatada, veículo ou adenosina difosfato (ADP), que é um indutor da agregação.

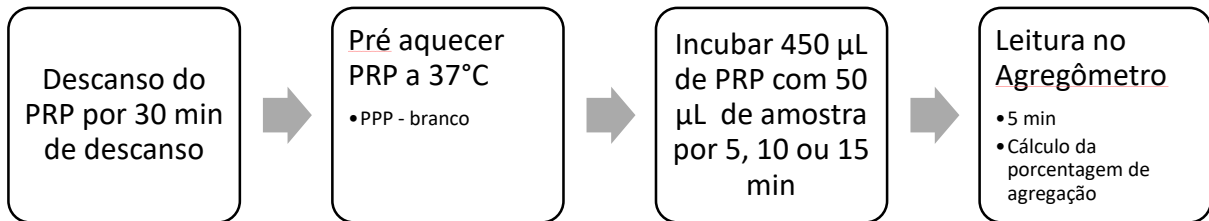
O primeiro controle utilizado foi o ADP (10 μM), foram adicionados 5 μL desse agonista em 500 μL de PRP para saber se a plaqueta estava agregando e apta para o teste. Concentração final do ADP nos 500 μL de PRP foi de 10 μM . Após comprovado que as plaquetas estavam aptas, seguiu-se também com o efeito *per si* das plaquetas (leitura apenas das plaquetas, para avaliar se não ocorreria uma agregação espontânea). Logo em seguida, 50 μL da quitosana natural, sulfatada e ácido acético 1% foram incubadas separadamente em 450 μL de PRP nos períodos de 5, 10 e 15 minutos que foram os tempos de incubação preestabelecidos. O objetivo é identificar se as drogas e os veículos individualmente são capazes de induzir a agregação plaquetária. As amostras foram lidas por 5 min no agregômetro. A concentração de QS avaliadas foram 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para comparação com resultados reportados na literatura. O esquema da metodologia pode ser identificado nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Esquema da metodologia utilizada no ensaio de agregação plaquetária para obtenção de PRP e PPP.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 15 - Esquema da metodologia utilizada no ensaio de agregação plaquetária para obtenção da porcentagem de agregação plaquetária induzida pelas amostras de QS e QN avaliadas nos tempos de 5, 10 e 15 minutos de incubação.



Fonte: elaborado pela autora.

4.3.2.2 Atividade anticoagulante *in vitro* TP e TTPA

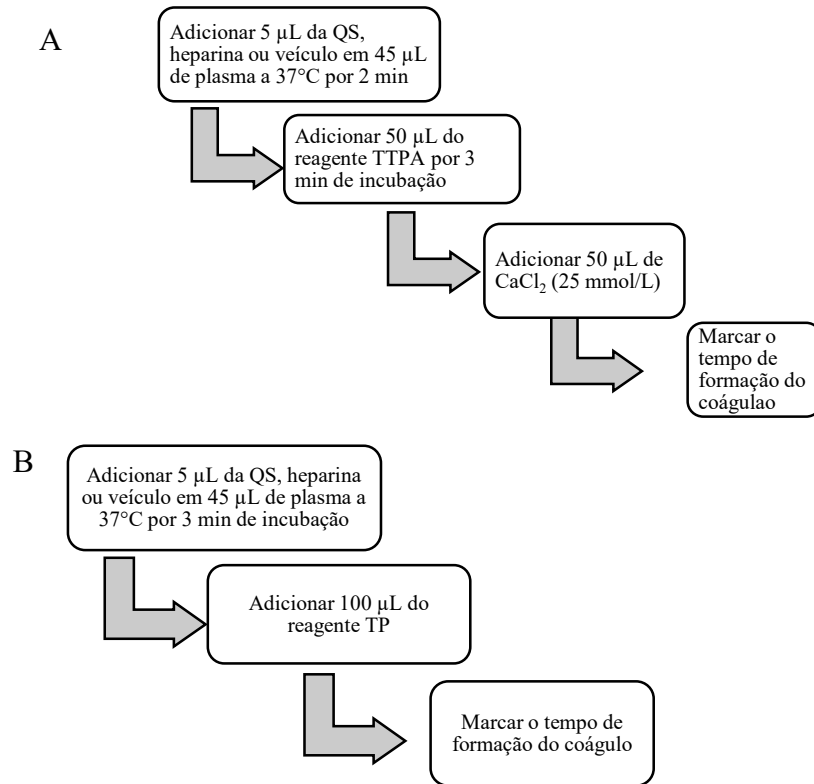
A fim de avaliar a atividade anticoagulante do material (antes e após a modificação) foram realizados os testes de tempo de tromboplastina parcialmente ativado (TTPA) e tempo de protrombina (TP) da quitosana natural e sulfatada. O sangue foi coletado em tubos citratados e centrifugado por 3000 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma humano rico em plaquetas (PRP). Neste ensaio, utilizou-se heparina como controle positivo, por ser um fármaco anticoagulante amplamente utilizado.

Tempo de tromboplastina parcialmente ativado (TTPA) foi analisado com o kit CLOT (BIOS diagnóstica). Para o TTPA, foram adicionados 5 µL da quitosana sulfatada 200, 500 e 1000 µg/mL, heparina (0,5 µg/mL) ou solução salina a 45 µL de plasma humano incubados a 37 °C durante 2 minutos, sob agitação magnética. Então foi adicionado à mistura e incubados por mais 3 minutos 50 µL do reagente TTPA, que é um fosfolipídio substituído plaquetário. O tempo de coagulação em segundos foi avaliado após o início da reação pela adição de 50 µL de CaCl₂ (25 mmol/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 (T₁) e ausência (T₂) do PS.

Tempo de protrombina (TP) foi analisado com kit CLOT (BIOS diagnóstica), usando plasma humano e heparina foi o controle positivo. Para TP, foram adicionados 5 µL da quitosana sulfatada 200, 500 e 1000 µg/mL, heparina (0,5 UI/mL) ou solução salina a 45 µL de plasma rico em plaquetas (PRP) humano incubados a 37 °C durante 3 minutos, sob agitação magnética. Após a adição de 100 µL de tromboplastina (reagente TP CLOT), o tempo de coagulação foi avaliado em segundos. O esquema das metodologias pode ser identificado na

Figura 16.

Figura 16 - Metodologia utilizada nos ensaios de coagulação TTPA (A) e TP (B).



Fonte: elaborado pela autora.

4.3.2.3 Desenvolvimento de filmes com a quitosana natural e sulfatada

Foram desenvolvidos seis tipos de filmes com a quitosana natural e com a sulfatada para avaliar o uso do reticulante glutaraldeído que foi adicionado ainda na solução formadora do filme antes desta solução ser vertida em placa Petri e seca em estufa. O primeiro filme de quitosana natural foi preparado a partir de uma solução de quitosana 2% (m/v) em solução de ácido acético 3% (v/v) 24 h de agitação. Então 25 mL de solução foram vertidos em placa de Petri e deixados na estufa a 45 °C com circulação de ar até que fosse obtido peso constante.

O filme de quitosana natural reticulada foi preparado a partir de uma solução de quitosana natural 2% (m/v) em solução de 3% (v/v) de ácido acético. Antes da solução ser vertida em placa de Petri e seca em estufa, foi adicionado o reticulante glutaraldeído nas concentrações da Tabela 03. Então, 25 mL da solução final, após homogeneização, foi vertida e seca em estufa a 45 °C com circulação de ar. Os filmes foram lavados com etanol e água milliQ antes do teste de citotoxicidade.

Os filmes de quitosana sulfatada reticulada foram preparadas a partir de uma solução de 2% (m/v) da quitosana sulfatada em água milliQ sem ácido acético. Antes da solução

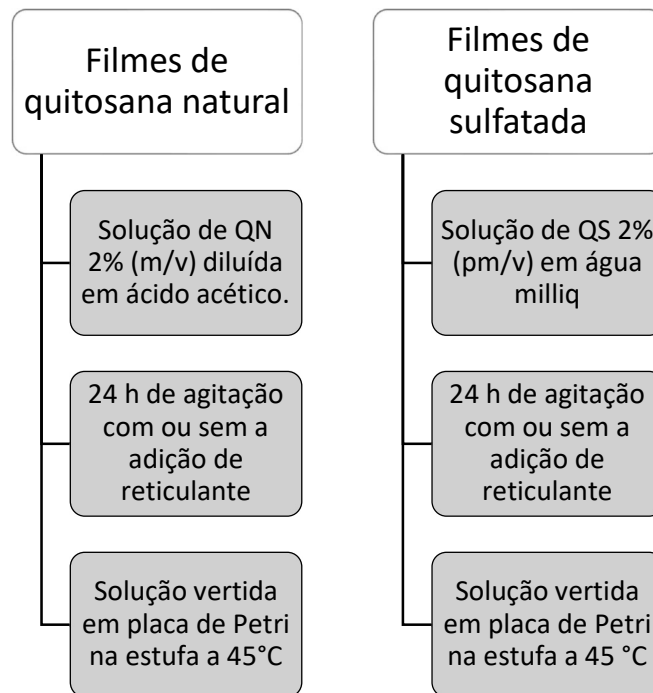
ser vertida em placa Petri e seca em estufa, foi adicionado o reticulante glutaraldeído (25% v/v) em 2 diferentes proporções (Tabela 03). Após a completa homogeneização, as amostras foram vertidas em placa e secas em estufa a 45 °C com circulação de ar. Os filmes foram lavados com etanol e água milliQ antes do teste de citotoxicidade. O esquema da metodologia pode ser identificado na Figura 17, assim como as proporções de glutaraldeído utilizado podem ser identificadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Amostras de quitosana natural, sulfatada e as concentrações de reticulante testadas.

Amostra	% (v/v) Glutaraldeído
Quitosana Natural (QN)	0
Quitosana Natural Reticulada (QNR0,03)	0,03
Quitosana Natural Reticulada (QSR0,08)	0,08
Quitosana Sulfatada (QS)	0
Quitosana Sulfatada Reticulada (QSR0,03)	0,03
Quitosana Sulfatada Reticulada (QSR0,08)	0,08

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 17 - Esquema da metodologia utilizada no desenvolvimento dos filmes de quitosana natural (QN) ou quitosana sulfatada (QS), com ou sem o reticulante glutaraldeído.



Fonte: elaborado pela autora.

4.3.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Para avaliar os grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana antes e após a modificação com ácido clorossulfônico, foi utilizada a técnica de FTIR. As análises foram realizadas 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 materiais avaliados que foram o pó da quitosana natural, quitosana sulfatada obtida após reação e liofilização e os filmes desenvolvidos com as duas quitosanas (com ou sem reticulação). A faixa de comprimento de onda analisada foi de 4000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Foram efetuadas 32 varreduras em cada amostra.

4.3.2.5 Termogravimetria (TG)

Foram submetidas a análise termogravimétrica (TG) tanto a estrutura da quitosana antes e após a modificação com ácido clorossulfônico quanto os filmes desenvolvidos com as duas quitosanas (com ou sem reticulação). A análise foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Adsorção e Captura de 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.

4.3.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das superfícies dos filmes desenvolvidos foi observada através de imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). 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, no qual foram obtidos os mapas das amostras. Esta caracterização foi realizada na Central Analítica da UFC.

4.3.2.7 Citotoxicidade

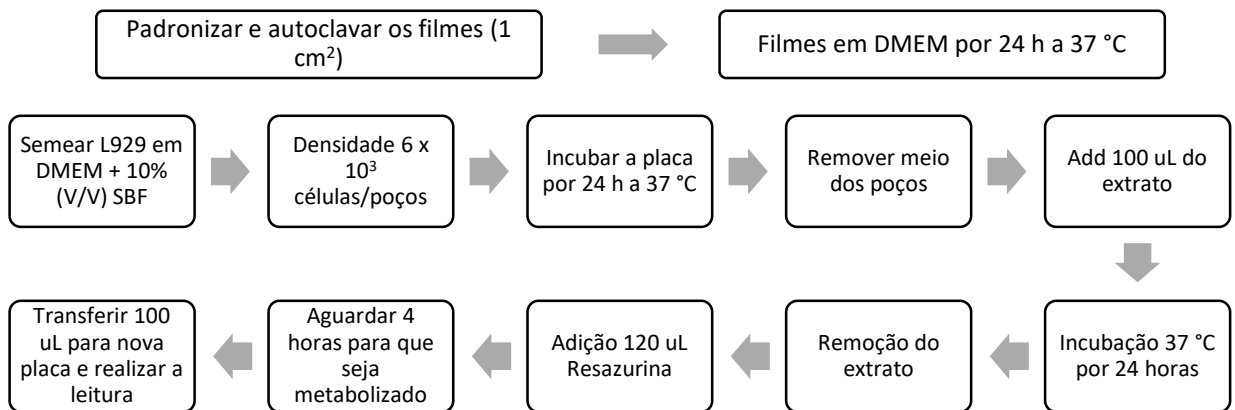
O ensaio analisa as células metabolicamente ativas em uma cultura celular foi realizado seguindo as indicações da norma *International Organization for Standardization* ISO

10993. O método indireto foi utilizado para avaliar a citotoxicidade dos extratos dos filmes desenvolvidos no item 4.2.2.3. Inicialmente, os extratos utilizados para o ensaio indireto foram obtidos adicionando 1 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) aos filmes autoclavados (121°C por 20 min) e padronizados (1 cm²) por 24 horas a 37 °C. Finalizada a incubação, foi acrescido 10% (m/v) de soro fetal bovino ao extrato recolhido. A linhagem de fibroblastos de camundongos (L929) foram semeadas em meio DMEM suplementado de 10% (v/v) de soro fetal bovino (SBF) na placa de 6 poços com densidade de 6 x 10³ células/poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h (5% de CO₂ e 95% de umidade). Após o crescimento das células, o meio de cultura presente nos poços foi removido e 100 ml do extrato suplementado foi acrescido. A placa seguiu para a incubação a 37 °C por 24 h. Após esse período, o extrato foi removido e então foi adicionado 120 µL da solução de Resazurina (concentração final de 25 mg/mL em DMEM), na qual foi metabolizado por 4 horas sob condições padrão de cultura (a resazurina possui coloração azul, mas de acordo com a metabolização das células viáveis, ela é transformada em resorufina que apresenta tonalidade rosa fluorescente). Logo em seguida, 100 µL da solução metabolizada pelas células foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e medido em leitor de microplacas (SpectraMax i3x, Molecular Device, Sunnyvale, EUA), em modo fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 560 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 590 \text{ nm}$). O grupo controle negativo foi feito expondo as células somente ao meio de cultura DMEM suplementado e o controle positivo foi feito expondo as células a uma solução de DMSO 40% diluído no meio DMEM tornando o ambiente tóxico para as células. O esquema da metodologia utilizada pode ser identificado na Figura 18. A porcentagem de células metabolicamente ativas foi calculada usando a Equação 01. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3) visando obter boa representatividade dos resultados. A atividade metabólica das células do grupo controle foi ajustada para 100% para o cálculo dos valores médios e desvio padrão.

$$\text{Células metabolicamente ativas (\%)} = \left(\frac{F_{\text{amostra}}}{F_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Sendo: F_{amostra} fluorescência correspondente ao poço onde as células foram cultivadas a partir do extrato da amostra e F_{controle} poço onde as células foram cultivadas em meio DMEM.

Figura 18 - Esquema da metodologia utilizada para realização do teste de citotoxicidade.



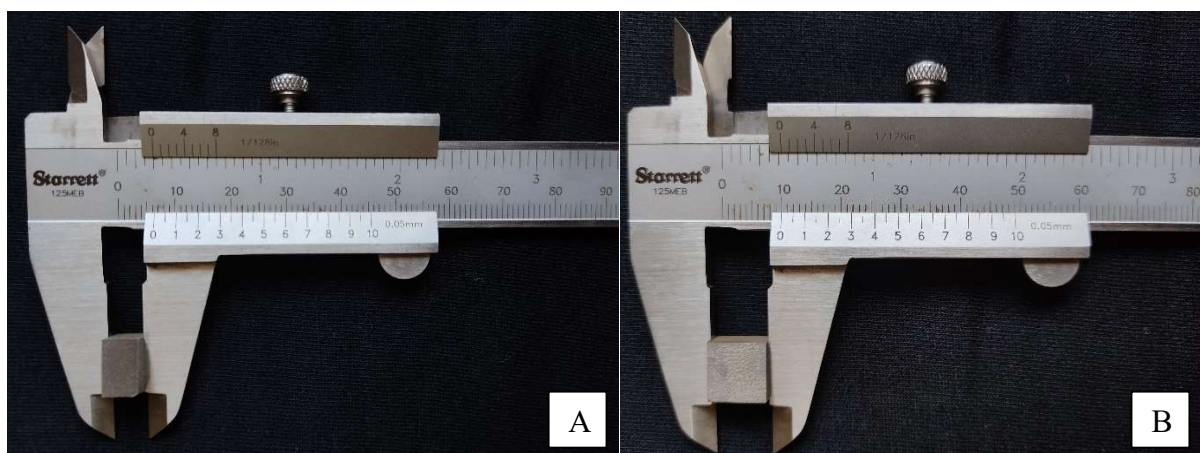
Fonte: elaborado pela autora.

4.4 Funcionalização das superfícies de aço inoxidável e nanotubos de TiO₂

4.4.1 Metodologia de funcionalização das superfícies de aço inoxidável e nanotubos de TiO₂

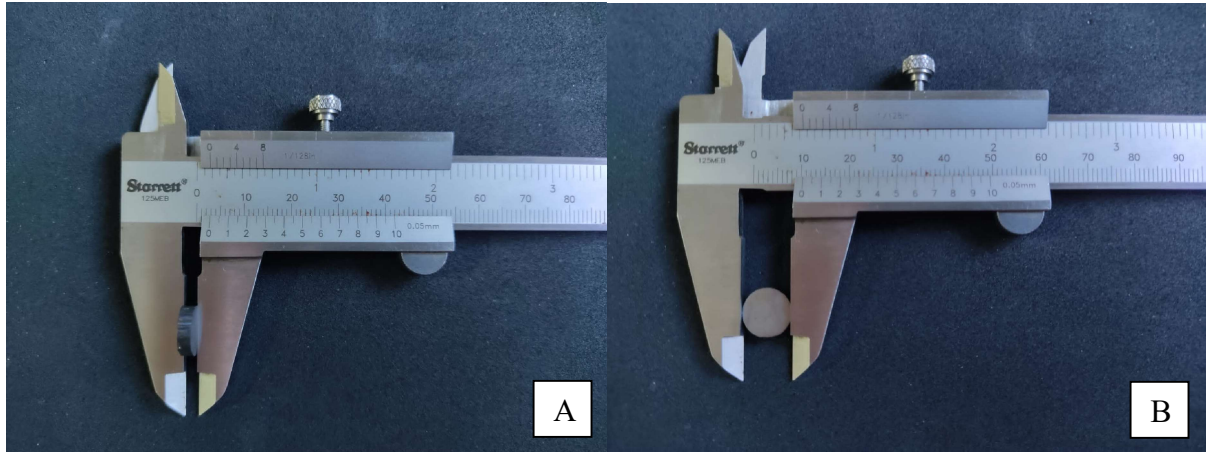
Foram funcionalizadas tanto as superfícies do aço inoxidável 316L e quanto as superfícies de liga Ti10Mo8Nb6Zr modificada com crescimento de nanotubos de TiO₂. O aço inoxidável foi cortado em quadrados de 10 mm x 10 mm como pode ser observado na Figura 19. Já a liga de Ti10Mo8Nb6Zr foi fornecida em formato circular como pode ser observado na Figura 20.

Figura 19 - Corte do aço inoxidável 316L. Imagem transversal (A) e imagem superior da peça (B).



Fonte: elaborado pela autora.

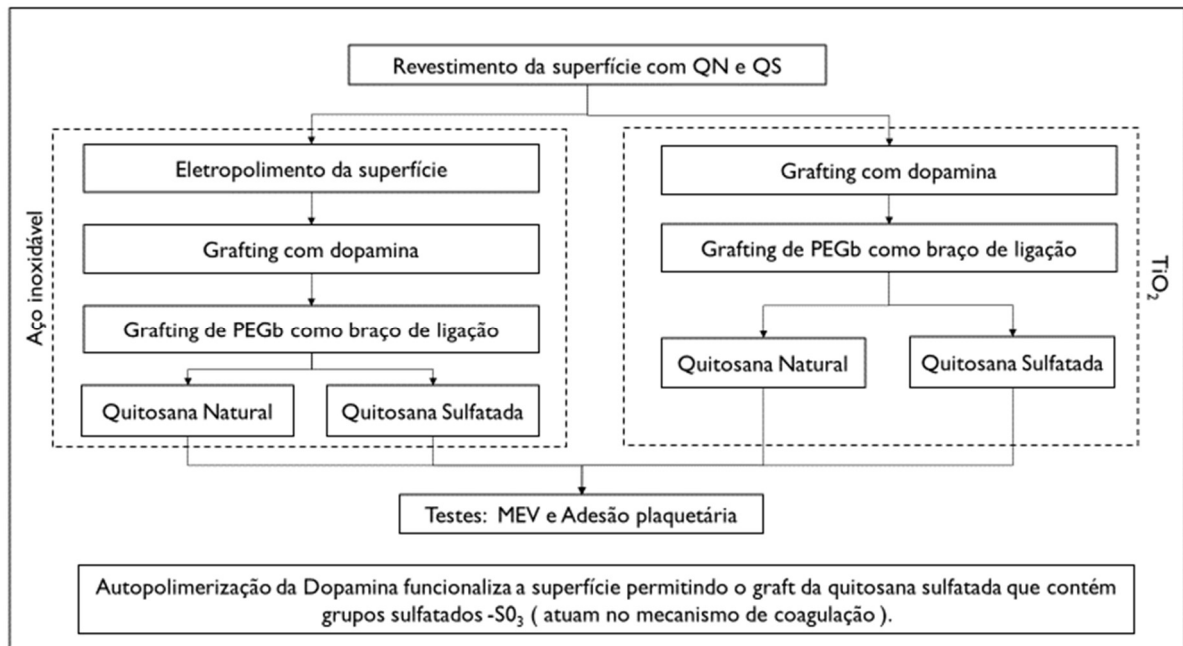
Figura 20 - Peças de Ti10Mo8Nb6Zr que receberam o crescimento de nanotubos de titânio pela técnica de extrusão em canal angular com ângulo de $\phi=120^\circ$ na temperatura de $T=250^\circ\text{C}$ com $n=4$. Imagem transversal (A) e imagem superior (B).



Fonte: elaborado pelo autor.

A metodologia para recobrimento foi realizada de acordo com CAMPELO *et al.*, (2017). Sobre o substrato metálico foi utilizada a dopamina por sua capacidade de autopolimerizar e o polietileno glicol foi utilizado como braço de ligação para reagir os grupos amino da dopamina com os grupos da quitosana. Dentre as duas amostras, apenas o aço inoxidável passou por uma etapa inicial de eletropolimento antes de receber o recobrimento, mas as demais etapas foram as mesmas para os dois materiais. O esquema da metodologia utilizada no recobrimento dos dois materiais pode ser identificado na Figura 21.

Figura 21 - Fluxograma de processo de revestimento de ligas de aço inoxidável e TiO_2 com quitosana natural e quitosana sulfatada.



Fonte: elaborado pela autora.

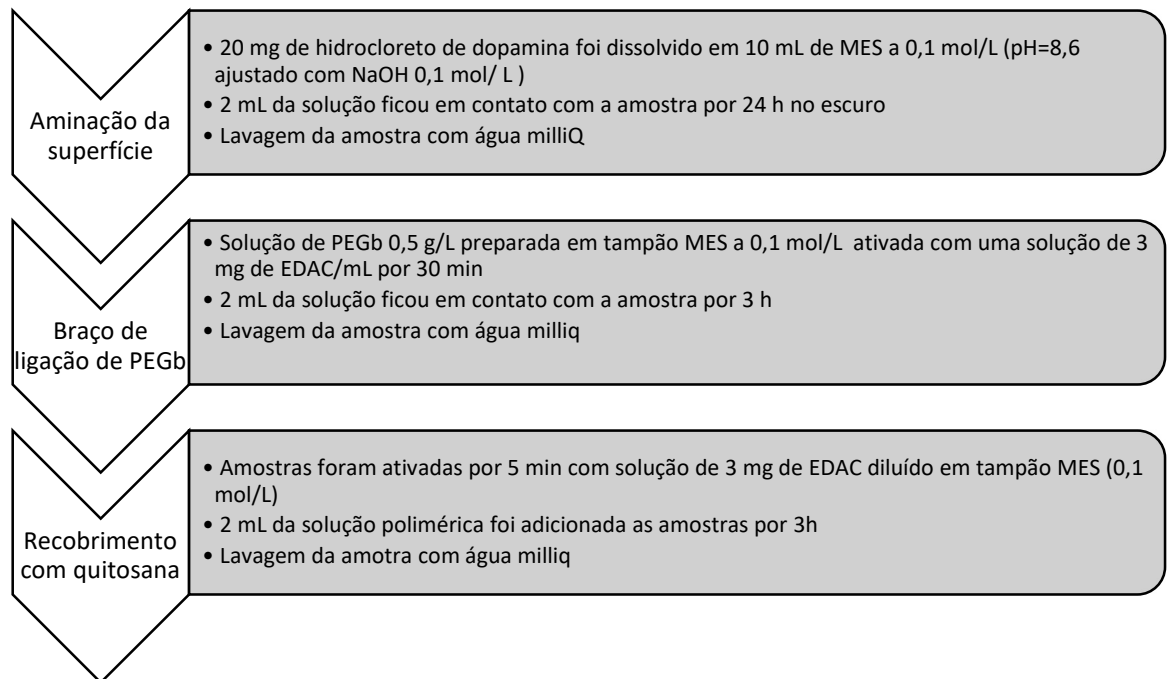
Para as amostras de aço inoxidável, antes do uso, o substrato foi lavado com acetona, água ultrapura e metanol em banho ultrassônico por 10 minutos em cada. Antes e após cada banho, as amostras foram secas com ar comprimido livre de partículas. Eletropolimento foi realizado nos materiais metálicos com o objetivo de obter uma superfície metálica mais lisa, removendo imperfeições, compostos não metálicos e gerando uma rica camada de óxidos e hidróxidos (ELIAZ, 2019; HAÏDOPOULOS *et al.*, 2006; SAIDIN *et al.*, 2013).

O eletropolimento foi realizado em sistema de célula eletrolítica com alimentador externo com controle da densidade de carga, de forma que a voltagem permanecesse constante em 2 V durante todo o processo de eletropolimento. O eletropolimento foi realizado de acordo com a metodologia adaptada com glicerol, ácido fosfórico e água (50:30:10% v/v) a 60 °C. A amostra a ser eletropolida foi utilizada como anodo enquanto uma peça de aço semelhante foi utilizada como catodo. A distância entre os dois eletrodos é de 60 mm. O diferencial de tensão é aplicado ao sistema durante seis minutos. Em seguida, foi realizado um banho ácido contendo água, ácido nítrico e ácido clorídrico (88:10:2% v/v) a 50°C. O ácido fluorídrico foi substituído pelo ácido clorídrico, pois são da mesma família química. Após o banho ácido, as amostras foram secas e armazenadas em vácuo por menos de 24 horas antes de serem utilizadas (CAMPELO *et al.*, 2017).

A aaminação da superfície metálica foi realizada usando polidopamina como ponto de ancoragem para futuros *graftings*, desse modo, 20 mg de cloridrato de dopamina ($C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$) foi dissolvido em 10 mL de tampão de ácido 2-morfolinoetanossulfônico (MES) a 0,1 mol/L. O pH foi ajustado para 8,6 com NaOH 0,1 mol/L fornecendo um meio alcalino para polimerização espontânea (LIAO *et al.*, 2011). Assim, 2 mL da solução ajustada foi colocada sobre o substrato eletropolido e deixado para reagir por 24 h a 27 °C no escuro (SAIDIN *et al.*, 2013). As amostras foram lavadas diversas vezes com água MilliQ e depois secas suavemente com papel filtro.

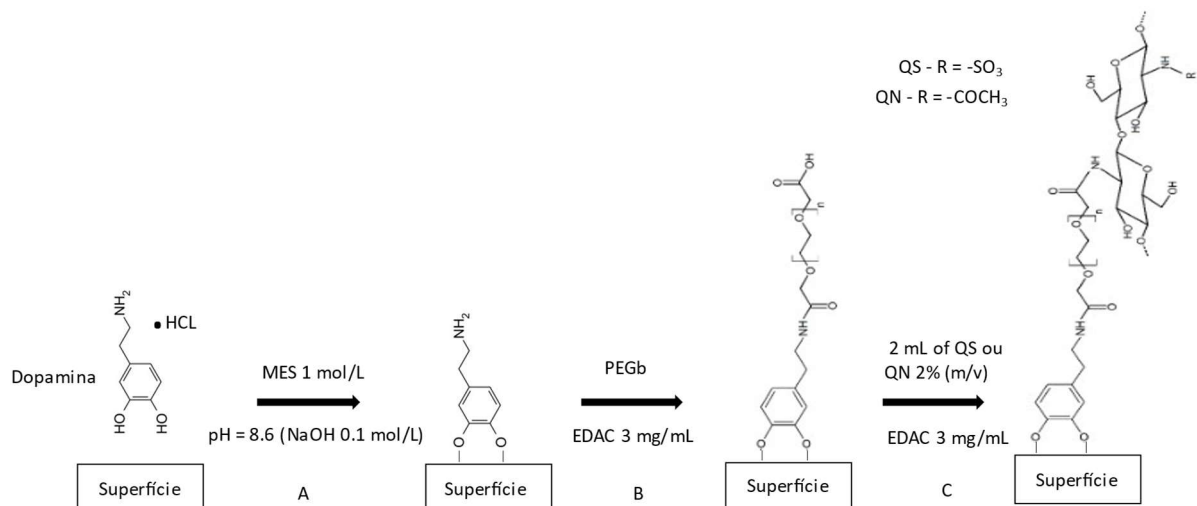
Uma solução de PEGb 0,5 g/L foi preparada em tampão MES (0,1 mol/L) e ativada com uma solução de 3 mg/mL de N-(3-Dimetilaminopropil)-N-Etilcarbodiimida (EDAC). Após 30 min, 2 mL desta solução foram colocados sobre amostras revestidas com dopamina, reagindo durante 3 h, depois foram lavados várias vezes com água MilliQ e secos. Para realizar o recobrimento das superfícies com a quitosana natural e com a quitosana sulfatada, as amostras foram ativadas por 5 minutos com 3 mg de EDAC diluídas em 0,1 mL de tampão MES a 0,1 mol/L, e 2 mL da solução polimérica (quitosana natural e quitosana sulfatada) desejada foram adicionados às amostras modificadas de PEGb e reagiram durante 3 h. Após 3 horas, as amostras recobertas foram lavadas com água ultrapura e secas. O esquema da metodologia pode ser identificado na Figura 22 e Figura 23.

Figura 22 - Representação esquemática da metodologia utilizada no processo de recobrimentos das superfícies das ligas de aço inoxidável e titânio.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 23 - Representação do recobrimento das superfícies de aço inoxidável ou nanotubos de TiO₂ com a QN e QS. A primeira etapa é a funcionalização da superfície com a dopamina (A), seguido de ativação com PEGb (B) e finalizando com o enxerto de QN ou QS (C).



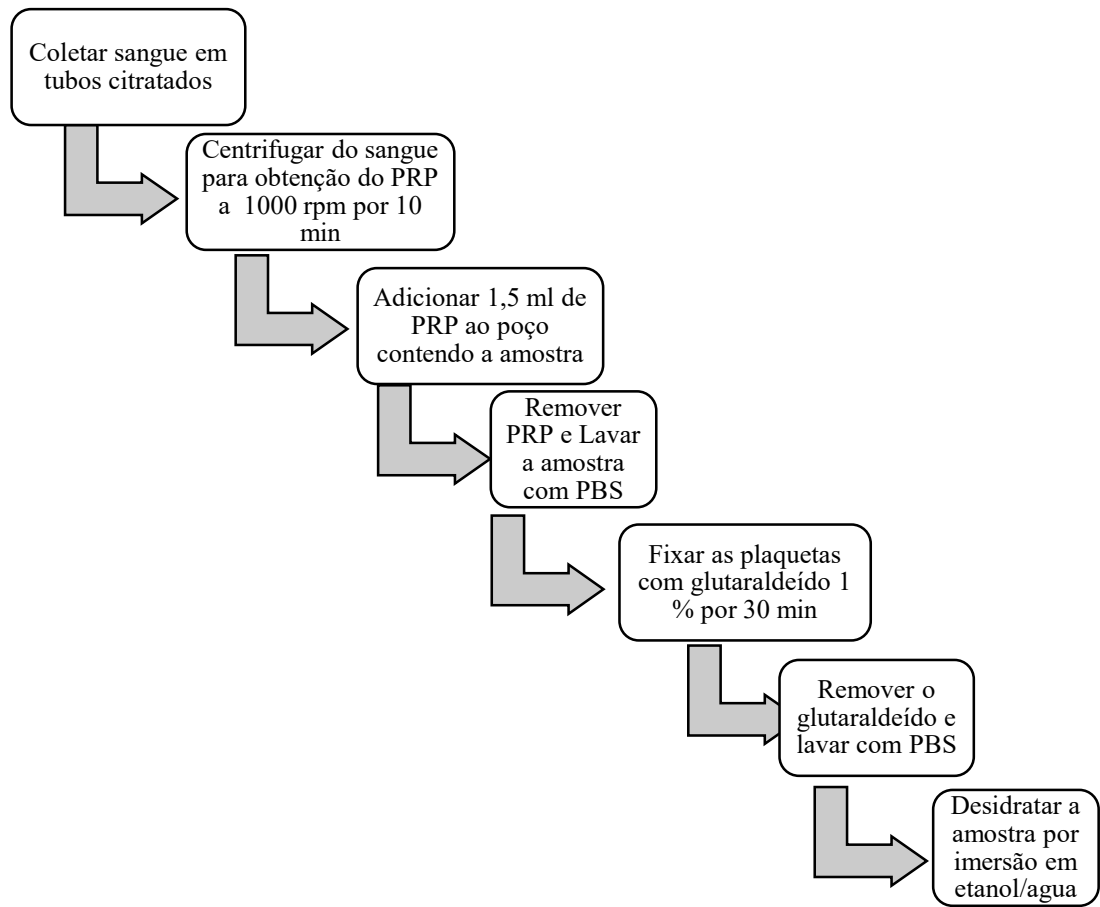
Fonte: adaptado de Campelo *et al.*, (2017).

4.4.2 Análise de adesão plaquetária nas superfícies funcionalizadas com quitosana natural e quitosana sulfatada

O sangue foi centrifugado a 1000 RPM por 10 min para a obtenção do PRP (plasma rico em plaquetas) que foi adicionado a um único tubo Falcon e utilizado em menos de 2 h. Adicionou-se 1,5 mL de PRP em cada superfície funcionalizada e incubou-se a 37 °C por 1 hora. Após a incubação em PRP, a superfície foi lavada com tampão PBS pH 7,4 para retirar as plaquetas não aderidas. As células aderidas foram fixadas com glutaraldeído 1% diluído em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente 27 °C. Em seguida a amostra foi lavada com tampão PBS por 10 minutos e passou pelas etapas de secagem por imersão de 10 minutos em soluções na qual a concentração de etanol foi aumentando (20%, 50%, 90% e 100%) (MONTGOMERIE; POPAT, 2021; ROCHA NETO *et al.*, 2022). O esquema da metodologia pode ser identificado na Figura 24.

A ativação das plaquetas na superfície foi visualizada usando Microscopia eletrônica de Varredura (MEV). O MEV foi conduzido no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). O ensaio de adesão plaquetária foi realizado em menos de uma semana após o revestimento das superfícies metálicas e as imagens de MEV foram realizadas no dia seguinte após a realização do ensaio de adesão plaquetária. A superfície foi recoberta com 10 nm ouro e aderida aos *stubs* com uma fita de carbono. Foram obtidas imagens de locais diferentes e com aumentos de 2000X e 20000X com 10 kV. A porcentagem de cobertura da amostra pelas plaquetas foi calculada no software ImageJ. Esquema da metodologia utilizada no ensaio de adesão plaquetária pode ser identificada na Figura 24.

Figura 24 - Metodologia utilizada no ensaio de adesão plaquetária.



Fonte: elaborado pela autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

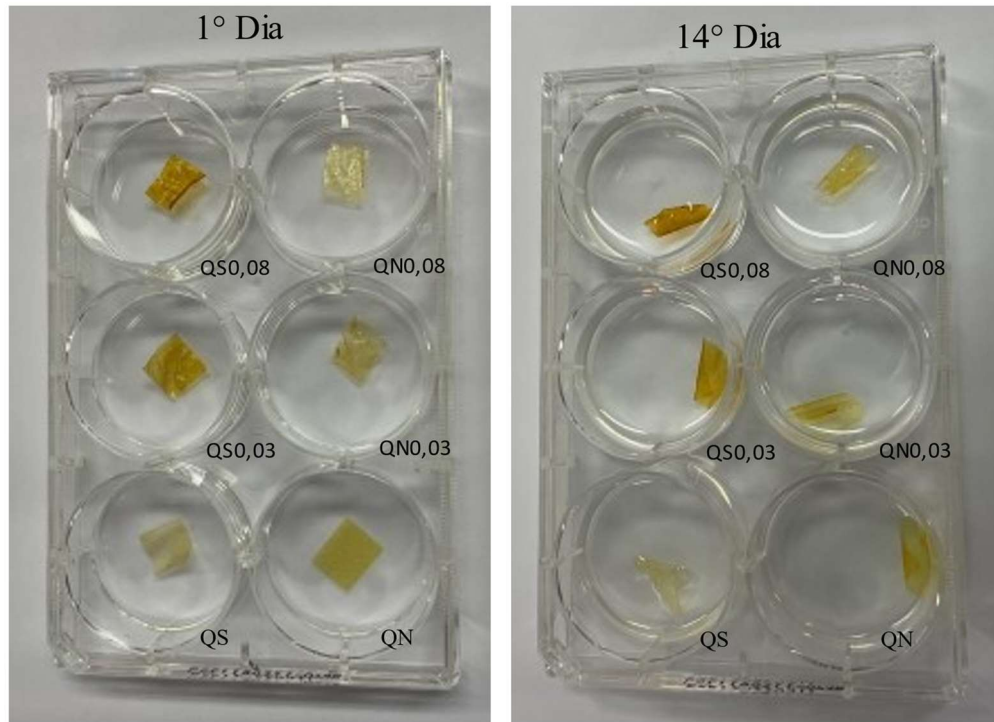
Os resultados dos ensaios realizados são apresentados na seguinte sequência: são inicialmente relatados e discutidos os resultados das análises de agregação plaquetária e testes de coagulação realizados nas amostras de quitosana natural e quitosana sulfatada (Figura 25) que foi obtida pela metodologia de sulfatação com ácido clorossulfônico resultando na sulfatação da quitosana nas posições 2, 3 e 6 levando a síntese da 2-N-3,6-O-quitosana sulfatada com peso molecular de 5,050 Da e grau de sulfatação de 1,37 (MORAES *et al.*, 2019). Em seguida, são apresentados os resultados das análises de MEV, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e termogravimetria (TG) realizados tanto nas amostras de quitosana natural e sulfatada quanto nos filmes desenvolvidos que também passaram por um ensaio de citotoxicidade. Na Figura 26 é possível visualizar os filmes desenvolvidos em contato com água por 14 dias. Por fim, são apresentados os resultados de adesão plaquetária realizados nas superfícies metálicas revestidas.

Figura 25 - Aspecto da quitosana sulfatada obtida após liofilização.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 26 - Aspecto dos filmes em contato com água. Quitosana sulfatada (QS), quitosana sulfatada com 0,03% de glutaraldeído (QS0,03), quitosana sulfatada com 0,08% de glutaraldeído (QS0,08), quitosana natural (QN), quitosana natural com 0,03% de glutaraldeído (QN0,03), quitosana natural com 0,08% de glutaraldeído (QN0,08).



Fonte: elaborado pela autora.

5.1 Caracterização da quitosana natural e sulfatada e dos filmes desenvolvidos

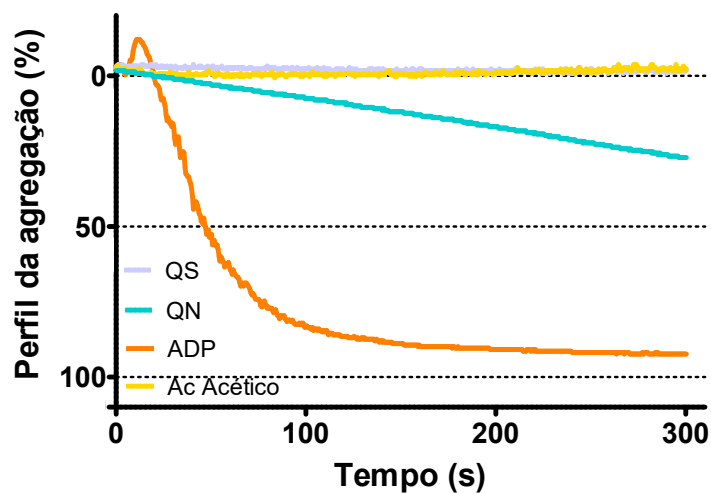
5.1.1 Efeito sobre a agregação de plaquetas

O experimento de agregação plaquetária foi realizado para elucidar a hemocompatibilidade da quitosana sulfatada, pois a adesão e ativação das plaquetas facilitam a trombose e coagulação. Um material com baixa adesão e ativação das plaquetas significa boa compatibilidade sanguínea, enquanto alto grau de adesão e ativação de plaquetas usualmente não é seguro para materiais em contato com sangue (LI *et al.*, 2018; SALIMI *et al.*, 2016).

Agregação plaquetária é o primeiro passo no mecanismo de coagulação sanguínea e ocorre a partir da liberação de adenosina difosfato (ADP), formação de tromboxano A_2 , colágeno, fator de Von Willebrand, glicoproteínas, epinefrina e ativação plaquetária (DE CLERCK; DAVID; JANSSEN, 1994). Esses caminhos são induzidos por agonistas endógenos como colágeno, ácido araquidônico e adenosina difosfato (ADP) (YU *et al.*, 2006).

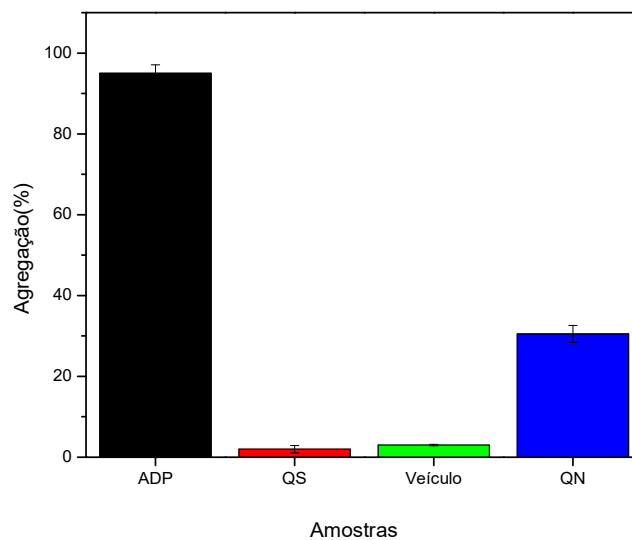
No presente trabalho, o ADP foi o agonista escolhido para induzir a agregação plaquetária, sendo um controle na análise que elucidou a ação das amostras de quitosana sulfatada e quitosana natural sobre o processo de agregação das plaquetas. O resultado das amostras avaliadas pode ser observado nas Figuras 27 e 28.

Figura 27 - Efeito da quitosana sulfatada (QS), da quitosana natural (QN), ácido acético 1% (veículo) e do controle positivo ou agonista (ADP) incubados em PRP por 15 minutos em perfil de agregação fornecido pelo equipamento agregômetro no qual é possível identificar a curva do perfil da agregação em porcentagem pelo tempo em segundos.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 28 - Efeito da quitosana sulfatada (QS), da quitosana natural (QN), ácido acético 1% (veículo) e do controle (ADP) incubados em PRP por 15 minutos em porcentagem de agregação por amostra avaliada.



Fonte: elaborado pela autora.

Sendo um agonista responsável pela indução da agregação, o ADP foi capaz de causar em torno de $95\% \pm 2,1$ de agregação plaquetária como pode ser identificado na Figura 28. Por outro lado, a quitosana sulfatada (QS) dissolvida em água e incubada por 15 min com o plasma não foi capaz de induzir a agregação plaquetária que ficou em torno de $2,0\% \pm 0,9$. Já a quitosana natural (QN) dissolvida em ácido acético 1% (v/v) incubado também por 15 minutos foi capaz de causar a agregação do PRP em torno de $30,5\% \pm 2,12$ mesmo o ácido acético (veículo no qual a quitosana natural foi dissolvida) tendo agregado apenas $3,5\% \pm 0,2$. Também foram avaliadas as concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$ da quitosana sulfatada (QS) e a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ da quitosana natural (QN) com incubações de 5, 10 e 15 minutos e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

A quitosana sulfatada (QS) causou uma agregação mínima nas concentrações e tempos de incubação avaliados. Entretanto, a quitosana natural (QN) causou agregação na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ com o tempo mínimo de 5 minutos ($13,5\% \pm 0,7$). Assim, foi evidenciado por meio das Figuras 27, 28 e da Tabela 4 que a quitosana sulfatada (QS) nas concentrações e tempos avaliados causou agregação plaquetária mínima no PRP, sendo possível, portanto, considerar a quitosana sulfatada como inerte para agregação plaquetária.

Tabela 4 - Efeito da quitosana sulfatada (QS) ou quitosana natural (QN) sobre a agregação de plaquetas humanas.

Amostra Incubação	Quitosana sulfatada (QS)		Quitosana natural (QN)
	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
5 min	$2,0\% \pm 0,2$	$3,5\% \pm 0,7$	$13,5\% \pm 0,7$
10 min	$1,0\% \pm 0,8$	$2,0\% \pm 0,0$	$18,0\% \pm 5,6$
15 min	$2,0\% \pm 0,9$	$1,5\% \pm 0,7$	$30,5\% \pm 2,1$

Fonte: elaborado pelo autor.

O mecanismo de ação de produtos sulfatados, contra agregação das plaquetas, foi atribuído na literatura a interação do polímero com os sítios de ligação, presentes na superfície da plaqueta, responsáveis pela ligação plaquetária com o fator de Willebrand. Desse modo, há um bloqueio logo na primeira etapa do processo de agregação plaquetária, que é a ligação do fator de Willebrand com os receptores GPIb das plaquetas. Outro possível mecanismo de ação de polímeros sulfatados é a ligação direta com o fator de Willebrand, inibindo a interação desse fator com as plaquetas por impedimento histórico. Pode haver uma interação específica entre

grupos sulfatados distribuídos ao longo do polímero com domínios de proteínas específicos contendo resíduos catiônicos no fator de Willerbrand (BARBUCCI *et al.*, 1998).

Agregação plaquetária induzida pela quitosana natural é atribuída na literatura as cargas positivas distribuídas na cadeia do polímero. Para solubilizar a quitosana foi usado o ácido acético 1% para protonação dos grupos amino que se repelem e, desse modo, a cadeia polimérica se dissolve, promovendo a agregação das plaquetas. De fato, a quitosana é pesquisada como um material hemostático, pois suas cargas positivas superficiais podem promover a agregação das plaquetas (LAN *et al.*, 2020).

Resultados semelhantes de atividade antiplaquetária, foram reportados na literatura para polissacarídeos sulfatados por Chagas e colaboradores (2020) que avaliaram o efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha *Gelidiella acerosa* sobre a agregação plaquetária e reportaram que nas mesmas concentrações avaliadas neste trabalho (100 e 200 µg/mL) o polímero não causou agregação plaquetária e foi capaz de inibir em 45% a ação de 30 µL de uma solução na concentração de 3 µM do agonista ADP (CHAGAS *et al.*, 2020).

Em estudo realizado por Shagdarova e colaboradores (2016), diferentes derivados de quitosana foram produzidos com cloreto de glicidil trimetil amônio. Os autores obtiveram derivados com diferentes graus de substituição I (98%), II (40%) e III (9%). No estudo desses autores, o PRP foi incubado por 1 min a 37 °C com os derivados nas concentrações de 0,0029 mg/mL a 0,580 mg/mL posteriormente 0,033 mL de ADP 0,2 mmol/L foi adicionado. A agregação foi estimada por 5 min e a incubação do PRP com 0,0029 mg/ml do derivado I não induziu a agregação plaquetária (3,3 ±0,6%) assim como a quitosana sulfatada nas condições avaliadas no presente trabalho (SHAGDAROVA *et al.*, 2016).

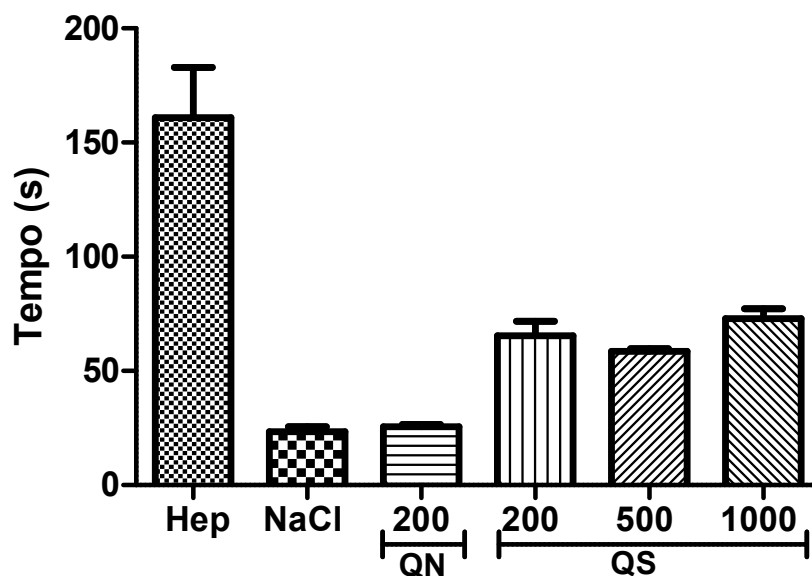
5.1.2 Tempo de tromboplastina parcial ativadas (TTPA) e tempo de protrombina (TP) da quitosana sulfatada produzida

A fim de avaliar se a quitosana sulfatada possui atividade mimética à heparina em prevenir a formação de coágulos e trombos, foram realizados os testes de TP e TTPA, os quais, são os principais ensaios realizados para monitoramento da atividade anticoagulante. A cascata da coagulação é classificada em via intrínseca, extrínseca e comum e são avaliadas pelos testes de tempo de tromboplastina parcial ativadas (TTPA) e tempo de protrombina (TP). Em geral, o tempo para os testes de TP e TTPA são entre as faixas de 10 s – 14 s e 22 s – 40 s respectivamente. Um prolongamento desses tempos pode ser causado por deficiências nos fatores de coagulação

ou por inibidores da conversão de fibrinogênio em fibrina como, por exemplo, o anticoagulante heparina (ZIA; O'BRIEN, 2015). Desse modo, polímeros ricos em grupos sulfatados como a quitosana modificada no presente trabalho que mimetizam a estrutura da heparina também podem apresentar atividade anticoagulante.

Foram avaliadas as seguintes concentrações de quitosana sulfatada 200 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$, resultando nos tempos de 65 $\text{s} \pm 7$ s, 58 $\text{s} \pm 2$ s, 72 $\text{s} \pm 5$ s respectivamente. Foram identificadas alterações no TTPA em relação ao tempo do controle (28 $\text{s} \pm 3$ s) quando o plasma foi tratado com as amostras de quitosana sulfatada. Entretanto, mesmo aumentando a concentração de quitosana sulfatada, não foi identificado o prolongamento do TTPA. Desse modo, a concentração de 1000 mg/mL já foi capaz de prolongar o tempo de coagulação em 72 $\text{s} \pm 5$ s. Os tempos obtidos nas análises podem ser visualizados na Figura 29.

Figura 29 - Tempo de tromboplastina parcial das amostras com heparina (5 $\mu\text{g/mL}$), salina (NaCl 0,9%), quitosana natural 200 $\mu\text{g/mL}$ e quitosana sulfatada nas concentrações de 200, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: elaborado pelo autor.

O aumento do tempo de coagulação sugere que a presença dos grupos sulfatados retarda a formação de trombos. Os mecanismos de ação propostos dos grupos sulfatados são predominantemente sobre atividades antitrombinas mediadas pelo HC-II (cofator II da heparina que inibe a trombina), ação direta antitrombina (complexo trombina-fibrinogênio) e pequenos envoltimentos AT-III. Também são propostas pequenas atividades anti-fator Xa e fibrinolíticas (SHANMUGAM; MODY, 1999). Entretanto, a atividade anticoagulante não depende

exclusivamente do aumento do grau de sulfatação da quitosana, mas da posição onde o grupo sulfato está sendo substituído na estrutura do polímero (YANG *et al.*, 2005). A metodologia utilizada no presente trabalho resulta na sulfatação da quitosana nas posições 2,3 e 6 resultados na quitosana 2-N-3,6-O-quitosana sulfatada com peso molecular de 5,050 Da e grau de sulfatação de 1,37 (MORAES *et al.*, 2019).

Embora a heparina apresente o maior prolongamento de tempo quando comparado aos demais na Figura 29 esse fármaco pode causar problemas de sangramentos prolongados (FAN; FAVALORO, 2022). Além disso, o elevado custo relativo à sua produção, torna a quitosana sulfatada uma opção de anticoagulante competitivo. A concentração de heparina utilizada no presente trabalho está de acordo com a metodologia utilizada por Moraes *et al.*, (2019), portanto foi 2,5 vezes maior se comparada a estudos reportados na literatura, por isso tem-se uma grande diferença entre os resultados da quitosana sulfatada e heparina (CHAGAS *et al.*, 2020).

Não foram identificadas alterações no tempo de protrombina (TP) no presente trabalho, resultado semelhante foi reportado anteriormente na literatura (HEISE *et al.*, 2018; MORAES *et al.*, 2019) e atribuídos ao fato dos materiais sulfatados não afetarem a via extrínseca da coagulação (CASTRO *et al.*, 2014). A ação dos polímeros sulfatados é associada na literatura a via intrínseca da coagulação, dessa forma são obtidas alterações no TTPA assim como reportado na Figura 29 (ADRIEN *et al.*, 2019).

Assim como no presente trabalho, autores reportaram na literatura a atividade anticoagulante da quitosana sulfatada, como, por exemplo, Moraes (2016) ao reportar que a quitosana sulfatada com ácido clorossulfônico na concentração de 200 µg/mL, a foi capaz de prolongar o TTPA em aproximadamente 75 s (MORAES *et al.*, 2019). A metodologia proposta pela autora foi utilizada no presente trabalho para obtenção da quitosana sulfatada, desse modo, o produto obtido pela reação de sulfatação é semelhante ao desenvolvido pela autora, entretanto a inovação proposta é a aplicação desse polímero na funcionalização de superfícies metálicas.

Chagas e colaboradores (2020) avaliaram o efeito do polissacarídeo sulfatado com peso molecular de 284.8 kDa e grau de sulfatação de 0,63 extraído da alga vermelha *Gelidiella acerosa* sobre o tempo de coagulação sanguínea (TTPA) e reportaram que nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL o polímero apresentou o tempo de coagulação sanguínea em torno de 37,2 s e 70,3 s respectivamente. Os valores reportados são semelhantes ao tempo encontrado no presente trabalho. O controle utilizado pelo autor foi a heparina 156 UI nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL que resultaram em um prolongamento de coagulação de aproximadamente

80 s e 141 s respectivamente. A concentração de 2 µg/mL de heparina apresentou um prolongamento maior que 300 s (CHAGAS *et al.*, 2020). Como a concentração de heparina utilizada no presente trabalho foi 2,5 vezes a concentração máxima utilizada no estudo reportado anteriormente, tem-se uma grande diferença entre os resultados da quitosana sulfatada e heparina na Figura 29.

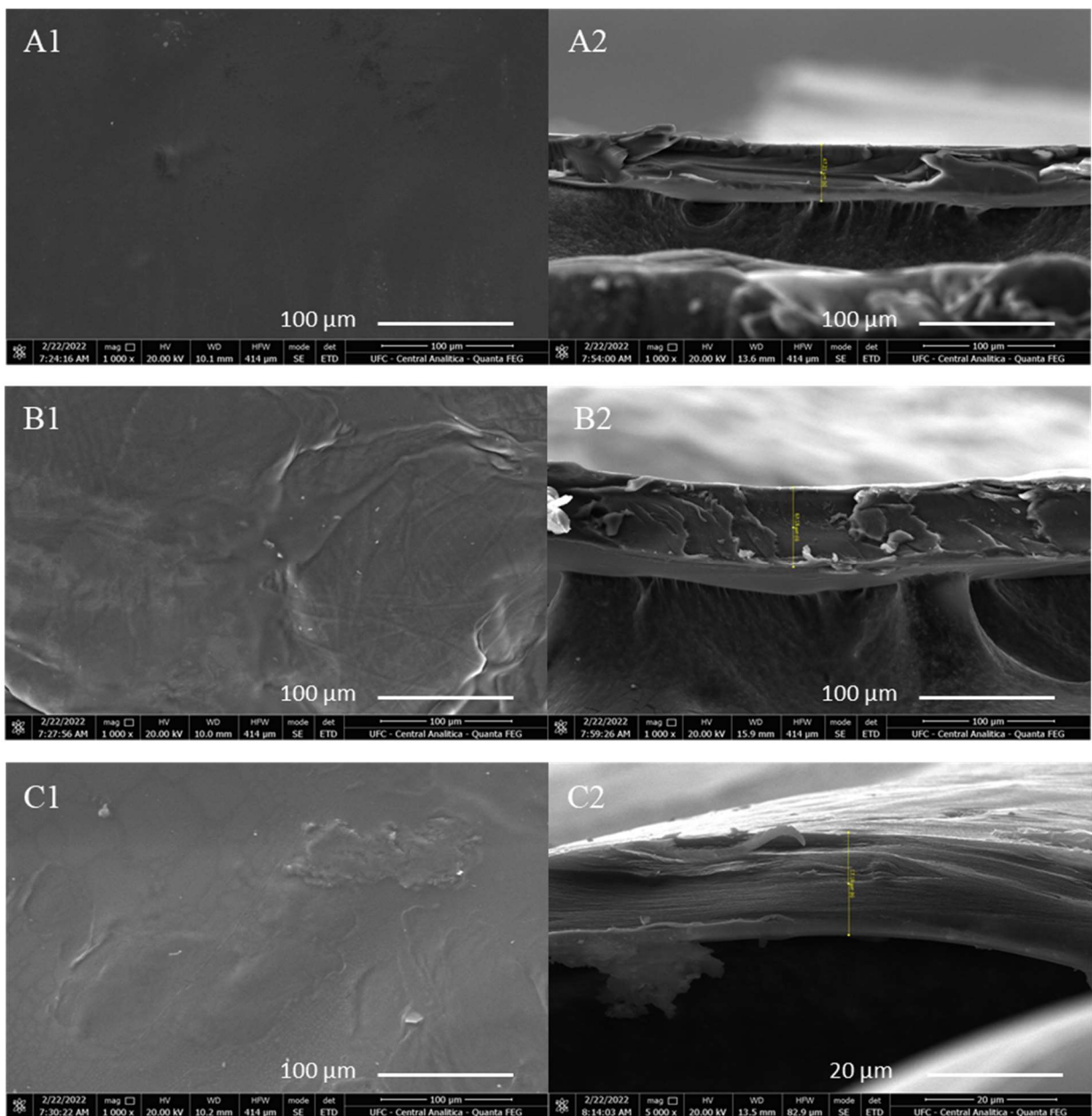
Heise e colaboradores (2018) produziram nanopartículas de prata recobertas com quitosana de baixo peso molecular sulfoetilada por meio de uma reação de substituição nucleofílica com 2-bromoetanossulfonato. O derivado foi substituído principalmente na posição O6 e os autores identificaram que o tempo de coagulação do plasma no teste de TTPA passou de 25 s no controle para 65 s e 132 s após a adição de 25 µL e 50 µL do material, respectivamente, na concentração de 0,1 mg/mL. Os autores atribuíram essa atividade anticoagulante do material ao mecanismo de interação dessas nanopartículas diretamente com o fator Xa. A ação de inativação do fator Xa se dá provavelmente porque as amostras possuem grupos sulfatados que podem interagir diretamente com o fator Xa por meio de pontes de dissulfeto (HEISE *et al.*, 2018).

Imran e colaboradores (2020) avaliaram a atividade anticoagulante da quitosana sulfatada utilizando como controle o acenocumarol, que é um anticoagulante utilizado na prevenção de trombose, sendo antagonista da vitamina K. Os autores avaliaram a atividade anticoagulante *in vivo* em ratos Wistar e concluíram que a quitosana sulfatada apresentou atividade anticoagulante mais potente de $(102,30 \pm 6,31)$ s quando comparada com o controle $(98,66 \pm 6,31)$ s. Mesmo que o resultado reportado pelos autores seja oriundo de um trabalho *in vivo*, é possível identificar assim como, no presente trabalho, que a sulfatação da quitosana aumentou a atividade anticoagulante do material (IMRAN *et al.*, 2020).

5.1.3 MEV

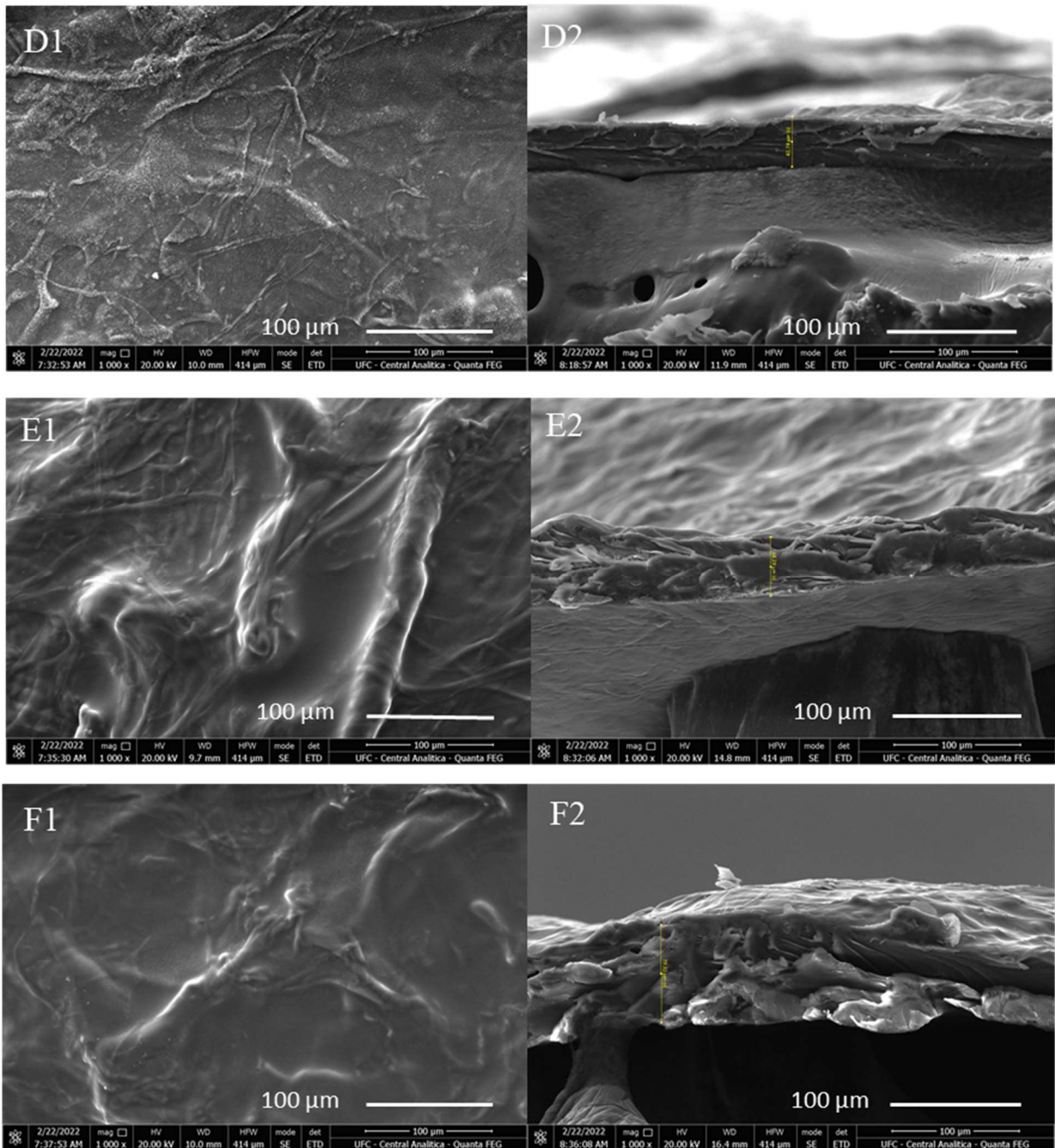
O MEV dos filmes desenvolvidos com quitosana natural e quitosana sulfatada com ou sem reticulação por glutaraldeído estão dispostos nas Figuras de 30 e 31.

Figura 30 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a superfície (A1) e seção transversal (A2) do filme de quitosana natural (QN). A superfície (B1) e seção transversal (B2) do filme de quitosana natural reticulada com 0,03 de glutaraldeído (QN 0,03). A superfície (C1) e seção transversal (C2) do filme de quitosana natural reticulada com 0,08 de glutaraldeído (QN 0,08).



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 31 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a (D1) superfície e (D2) seção transversal do filme de quitosana sulfatada (QS). A superfície (E1) e seção transversal (E2) do filme de quitosana sulfatada reticulada com glutaraldeído 0,03% (QS 0,03). A superfície (F1) e seção transversal (F2) do filme de quitosana sulfatada reticulada com glutaraldeído 0,08% (QS 0,08).



Fonte: elaborado pela autora.

A amostra de quitosana natural sem reticulação (A1) apresentou um aspecto liso, enquanto a amostra de quitosana sulfatada (D1) apresentou um aspecto um pouco mais rugoso

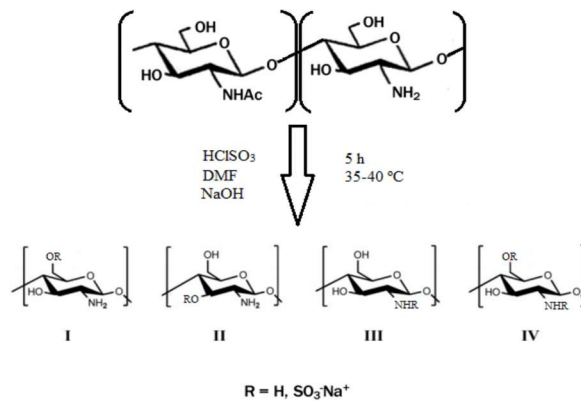
devido aos grupos sulfônicos que aumentaram a capacidade de reter água (ZHANG; SUN, 2020). Em relação à presença de glutaraldeído, o reticulante confere um aspecto rugoso ao material (POON; WILSON; HEADLEY, 2014), entretanto a reticulação pode ser usada para modificar e melhorar as propriedades de uma membrana de biopolímero (HU *et al.*, 2020).

A irregularidade e rugosidade da superfície podem causar uma maior interação com proteínas de fibrinogênio, levando a uma forte adesão de plaquetas pelos receptores de proteínas das plaquetas, induzindo assim a agregação plaquetária e liberação de substâncias pró-coagulantes. Já uma superfície menos rugosa minimiza o dano as plaquetas sanguíneas e pode inibir a ativação de fibrina e subsequentemente a trombose, apresentando, dessa forma, uma maior hemocompatibilidade quando comparado a superfícies mais irregulares (VISHWAKARMA *et al.*, 2015). No presente trabalho, embora a quitosana tenha apresentado uma maior rugosidade superficial quando comparada a superfície de quitosana natural, é esperado que a presença das cargas negativas confira uma maior hemocompatibilidade da amostra sulfatada, conforme evidenciado nos testes de coagulação sanguínea e agregação plaquetária.

5.1.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Foram observados os grupos funcionais presentes na cadeia de quitosana antes e depois da modificação química realizada. Dependendo das condições da reação, o grupo sulfatado pode ser incorporado no C-2 (grupo NH₂), C-3 (grupo OH) e C-6 (grupo CH₂OH) como pode ser observado na Figura 32. A metodologia utilizada no presente trabalho resulta na sulfatação da quitosana nas posições 2,3 e 6 resultados na quitosana 2-N-3,6-O-quitosana sulfatada com peso molecular de 5,050 Da e grau de sulfatação de 1,37 (MORAES *et al.*, 2019). Na Figura 33 é possível identificar os espectros do FTIR da quitosana natural (QN) e da quitosana sulfatada (QS) que foram utilizadas no desenvolvimento dos filmes e revestimentos.

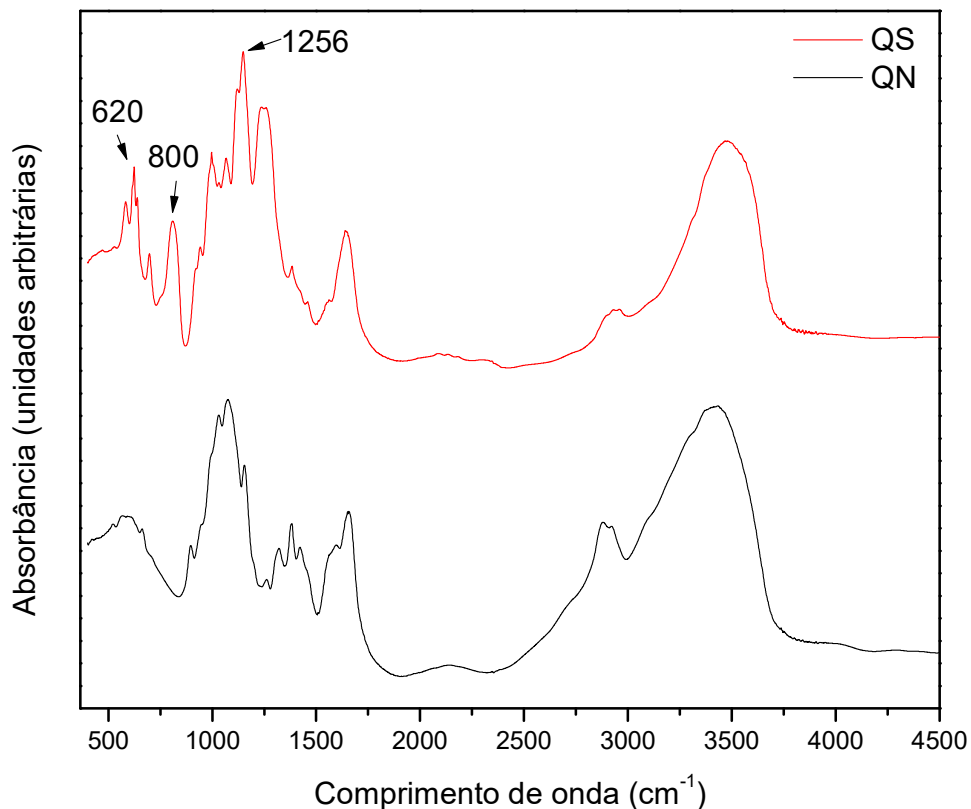
Figura 32 - Os possíveis produtos da reação de sulfatação da quitosana.



Fonte: adaptado de Moraes (2016).

O espectro característico da estrutura da quitosana natural pode ser observado na linha em preto da Figura 33, já a linha em vermelho representa o espectro da quitosana sulfatada. O sucesso da modificação da quitosana foi indicada no espectro da estrutura da quitosana sulfatada com o aparecimento de novos picos em torno de 620 cm^{-1} , 800 cm^{-1} e 1256 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos assimétricos S-O, C-O-S e S=O. Semelhante ao presente trabalho, Rakhmanova e colaboradores (2009) identificaram que o espectro FTIR da quitosana sulfatada que apresentou as seguintes bandas: uma banda em 1090 cm^{-1} indicando a presença do grupo sulfônico (R-SO₃H), uma banda a 1240 cm^{-1} indicando o estiramento assimétrico S=O nos grupos sulfatos e uma banda em 800 cm^{-1} indicando a vibração da ligação C-O-S (RAKHMANOVA *et al.*, 2009).

Figura 33 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da quitosana natural e da quitosana sulfatada com ácido clorossulfônico.



Fonte: elaborado pela autora.

A substituição pode ocorrer tanto em grupos hidroxila primário quanto secundários e é indicada pelo sinal em torno de 800 cm^{-1} , mas em virtude do impedimento histórico a substituição é parcial em grupos hidroxila secundários. Xing e colaboradores (2004) investigaram a estrutura da quitosana natural e sulfatada por FTIR e C NMR e atribuíram as bandas vibracionais do FTIR em 1222 cm^{-1} e 806 cm^{-1} aos seguintes grupos sulfatados S=O e C-O-S. A posição da substituição foi avaliada pelo C NMR ficando evidente que os grupos C2 e C6 foram modificados, enquanto o C3 apresentou dois sinais, um para o resíduo sem sulfato e outro para o resíduo com sulfato indicando que houve uma substituição parcial no C3 (XING *et al.*, 2004), a depender do local de substituição dos grupos sulfatados a atividade anticoagulante da quitosana pode ser maior ou menor.

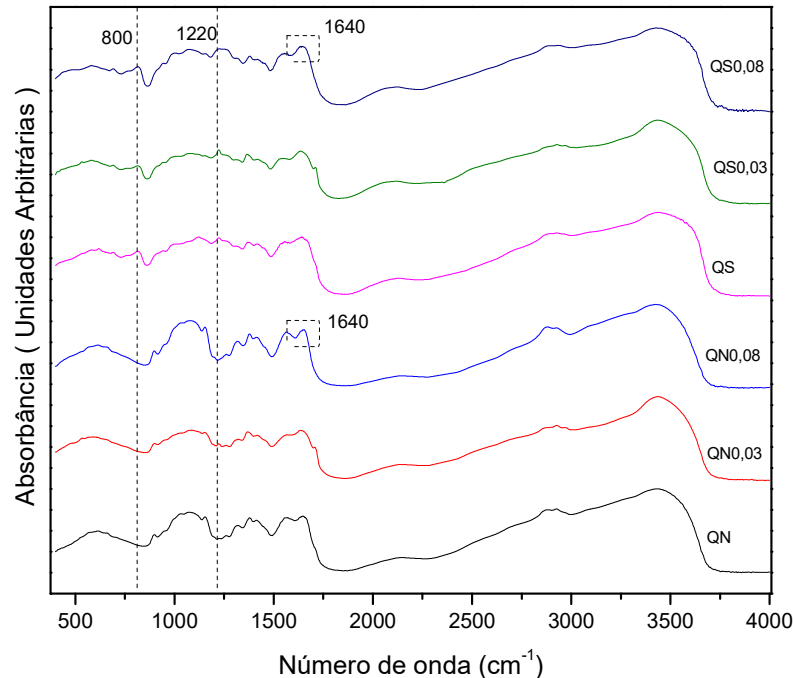
Zhou e colaboradores (2009) obtiveram o derivado 2-N, 6-O-quitosana sulfatada

por meio da reação de 2 h com o complexo sulfatante de HClSO_3 e DMF na temperatura de 45-55 °C. O aumento da temperatura de reação causou uma diminuição na massa molecular e uma leve diminuição da substituição, o que indica a ocorrência de uma reação de dessulfuração e degradação da cadeia. Provavelmente o grupo C-3 hidroxila estava parcialmente sulfatado no derivado devido às limitações históricas (ZHOU *et al.*, 2009). No presente trabalho, não houve aumento da temperatura para a faixa acima de 45 °C, portanto, espera-se que não tenha ocorrido a reação de dessulfuração e degradação da cadeia como no trabalho reportado anteriormente.

Os espectros de infravermelho dos seguintes filmes desenvolvidos também foram avaliados: quitosana natural (QN), quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído (QN0,03), quitosana natural reticulada com 0,08% de glutaraldeído (QN0,08), quitosana sulfatada (QS), quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (QS0,03) e quitosana sulfatada reticulada com 0,08% de glutaraldeído (QS0,08). Os resultados estão apresentados na Figura 34.

Na Figura 34 é possível identificar o FTIR dos filmes desenvolvidos com ou sem reticulação com glutaraldeído. Os filmes de quitosana sulfatada, quitosana sulfatada com 0,03% de glutaraldeído e quitosana sulfatada com 0,08% de glutaraldeído apresentaram aumento nas bandas 800 cm^{-1} e 1220 cm^{-1} referentes as vibrações dos estiramentos C-O-S e S=O quando comparados aos filmes desenvolvidos com quitosana natural. Desse modo, foi possível identificar que após a reação de sulfatação e formação dos filmes, as bandas referentes a inserção de grupos sulfato foram mantidas nos filmes desenvolvidos. Esse resultado corrobora com a atividade anticoagulante da quitosana sulfatada que se deve, na maioria, à presença de grupamentos sulfato no polímero como observado anteriormente no teste de TTPA.

Figura 34 - FTIR para filmes desenvolvidos com quitosana natural ou quitosana sulfatada com ou sem reticulação por glutaraldeído.

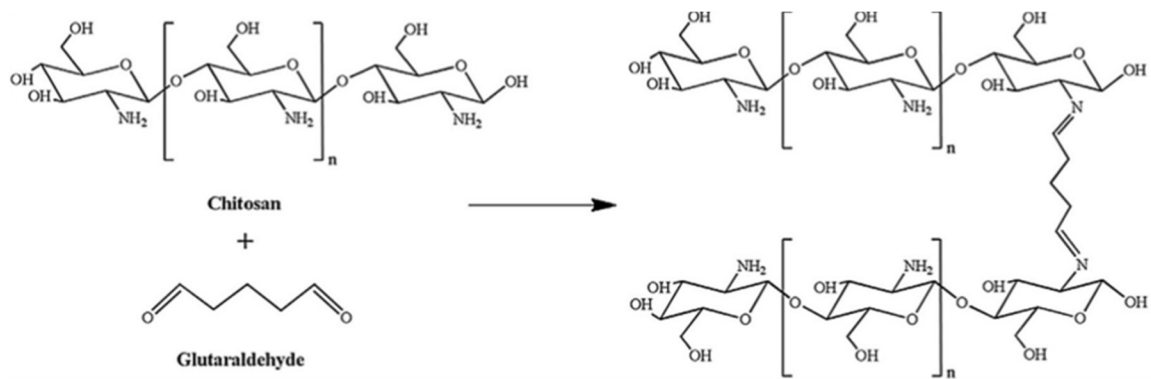


Fonte: elaborado pela autora.

A formação da ligação C=N entre os grupamentos carbonila presente no glutaraldeído e amina presente na quitosana é um possível mecanismo de reticulação da quitosana que pode ser identificado por um leve aumento na intensidade das bandas 1650 cm^{-1} para os filmes reticulados. Essa reação de reticulação que envolve a reação do glutaraldeído com grupos amino da quitosana para formar uma ligação imina é indicada pelo FTIR da Figura 34 como um leve aumento da banda imina (C=N) a 1640 cm^{-1} nas amostras de filmes reticulados com a maior concentração de glutaraldeído (GOKILA *et al.*, 2017).

A quitosana pode passar por múltiplas reações com glutaraldeído dependendo das condições de reação: condensação aldólica catalisado por amina, adição de Michael ou formação da base de Schiff (KILDEEVA *et al.*, 2009). Os grupos NH_2 presentes na quitosana agem como nucleófilos e atacam os grupos aldeídos presentes no glutaraldeído resultando na formação da ligação imina (VERMA *et al.*, 2020). Ou seja, os grupos funcionais do polímero reagem com os aldeídos formando ligações cruzadas propiciando a formação de pontes (reticulação covalente) entre as cadeias do polímero (HENNINK; VAN NOSTRUM, 2002). A reação pode ser identificada na Figura 35.

Figura 35 - Reticulação da quitosana sulfatada com o glutaraldeído.



Fonte: NEGM *et al.*, (2020).

A utilização do glutaraldeído nos filmes foi realizada objetivando-se reforçar química e fisicamente o filme para ser possível utilizá-lo como revestimento, pois se faz necessário utilizar agentes reticulante que além de aumentar a resistência à água ainda contribuem com a rigidez e coesão do filme por meio da formação de ligações cruzadas (PENG *et al.*, 2011). O processo de reticulação de filmes de quitosana com glutaraldeído melhora as macro e micro propriedades: permeabilidade, molhabilidade e resistência química. Além disso, os biopolímeros de quitosana apresentam maior hidrofobicidade quando comparadas aos não reticulados (BEPPU *et al.*, 2007).

5.1.5 Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica após a modificação química foi avaliada na análise termogravimétrica (TG e DTG) das amostras de quitosana natural e quitosana sulfatada. A análise quantifica as mudanças de massa do material conforme tempo e temperatura aplicados, desse modo, é possível determinar a estabilidade da amostra na Figura 36 e 37.

Figura 36 – Termogramas da quitosana natural e da quitosana sulfatada TG.

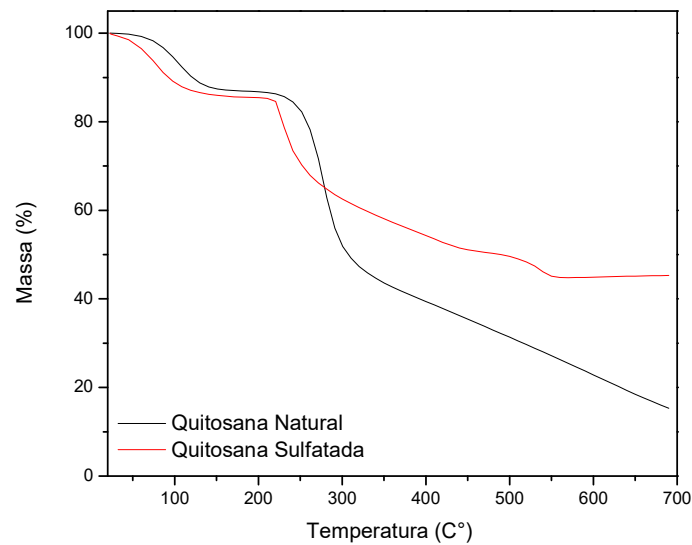
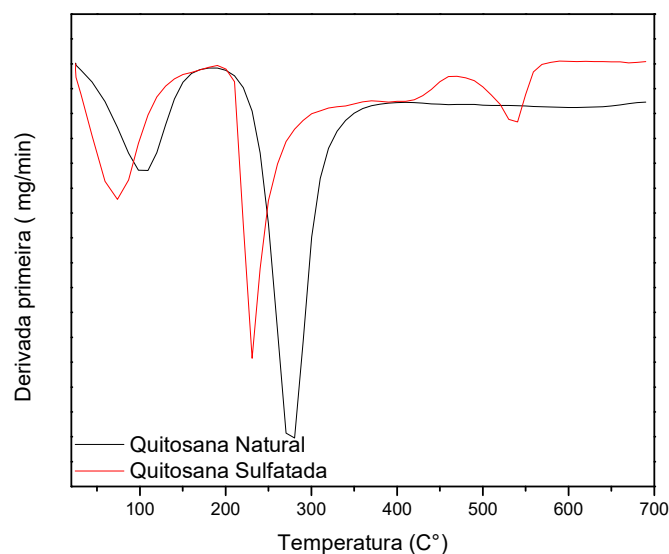


Figura 37- Termogramas da quitosana natural e quitosana sulfatada DTG.



Fonte: elaborado pela autora.

O primeiro estágio se deve a perda de água adsorvida no polímero pelos materiais (QN e QS). No segundo estágio, há a perda de massa em virtude da degradação da cadeia. A terceira fase de transição se dá em virtude das perdas de massa relacionadas a degradação das ligações cruzadas residuais dos materiais.

Para quitosana natural o primeiro estágio ficou entre 25-170 °C com T_{onset} em 109 °C, a perda de massa de 13% se deve a perda de água fracamente ligada ao material ou adsorvida (sorção de água ligadas nos grupos amino e hidroxila). Já o segundo estágio ficou entre 190-390 °C com T_{onset} em 280 °C, a perda de 49% se deram pela decomposição das unidades desacetiladas e acetiladas, despolimerização e desidratação dos anéis sacarídeos e associada a pirólise da matriz polimérica da quitosana com formação de água, dióxido de carbono, metano e amônia (MA *et al.*, 2013; TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2010).

Para a quitosana sulfatada, o primeiro estágio ficou entre 25-170 °C com T_{onset} em 73 °C, a perda de 16% se deve a desidratação da amostra. Logo em seguida, o segundo estágio, que se deve a degradação dos grupos sulfatados provenientes do ácido, ficou entre 190-310 °C com T_{onset} em 230 °C, a perda de 25%. Para essa amostra houve um terceiro estágio entre 470-580 °C com T_{onset} em 540°C, a perda de 15%, referente a degradação da cadeia principal do polímero. A diferença de três estágios para a quitosana sulfatada em relação a quitosana natural foi identificada em outros trabalhos e atribuída a adição e degradação dos grupos sulfatados (KOCABAY *et al.*, 2021; ZHANG; SUN, 2020).

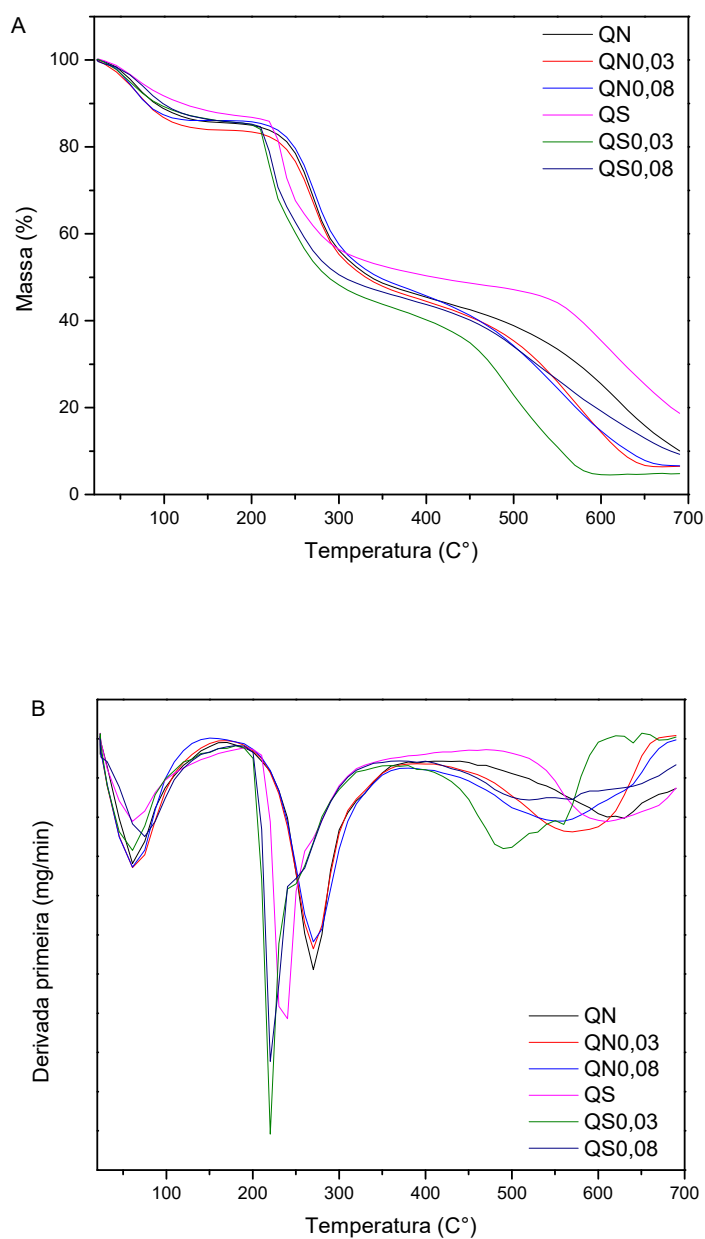
A quitosana sulfatada teve uma redução da estabilidade quando comparado com a quitosana natural. Ainda no primeiro estágio de degradação, a quitosana sulfatada perdeu uma maior porcentagem de massa quando comparado com a quitosana natural, esse resultado foi atribuído na literatura ao aumento da hidrofiliabilidade da quitosana em virtude da presença de grupos sulfatados na estrutura do polímero. Além disso, a temperatura máxima de degradação da cadeia da quitosana sulfatada foi inferior à temperatura de decomposição da quitosana natural em decorrência da redução de peso molecular da quitosana modificada rica em grupos sulfatados que ao serem inseridos na cadeia modificaram a estrutura da quitosana tornando-a termicamente instável (MORAES, 2016). A presença dos grupos sulfatados entre as cadeias pode contribuir para um aumento do volume livre entre as cadeias que permitindo a penetração de uma maior intensidade de energia leva a uma menor estabilidade térmica (CAVALHEIRO, 2009, 2009; WU *et al.*, 2008).

Zhang e colaboradores (2020) realizaram a sulfatação da quitosana com ácido sulfúrico e identificaram na TG dos materiais os seguintes estágios: para quitosana natural

foram identificados apenas dois estágios, o primeiro de 25 a 100 °C atribuído à desidratação e o segundo estágio de 250 a 500 °C atribuído à degradação da cadeia principal. Assim como no presente trabalho, para a quitosana sulfatada foram identificados três estágios de degradação, sendo o primeiro entre 25 e 100 °C atribuído a desidratação, o segundo entre 100 e 250 °C atribuído aos grupos do ácido sulfúrico utilizado na reação de sulfatação e o terceiro estágio que foi de 250 a 500 °C atribuído a degradação principal. Foi concluído pelo autor que o resultado mostrou a incorporação dos grupos sulfatados ao material.

O comportamento térmico dos filmes de quitosana natural (QN), quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído (QN0,03), quitosana natural reticulada com 0,08% de glutaraldeído (QN0,08), quitosana sulfatada (QS), quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (QS0,03) e quitosana sulfatada reticulada com 0,08% de glutaraldeído (QS0,08) estão apresentados na Figura 38 e na Tabela 05.

Figura 38 - TG (A) e DTG (B) para filmes desenvolvidos com quitosana sulfatada e natural com ou sem reticulação por glutaraldeído.



Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5- Termogravimetria dos filmes desenvolvidos.

Filme	Estágio	Faixa de temperatura (°C)	Perda de massa (%)	T _{onset} (°C)
Quitosana Natural	1	23,18 - 170,12	85,57	60,85
	2	170,12 - 420,00	44,25	270,09
	3	420,00 - 690,00	10,03	630,36
Quitosana Natural 0,03	1	21,85 - 170,24	83,87	61,13
	2	170,24 - 390,03	45,09	270,45
	3	390,03 - 689,76	6,5	570,11
Quitosana Natural 0,08	1	23,42 - 149,96	89,09	60,68
	2	149,96 - 380,10	47,27	270,21
	3	380,10 - 689,87	6,61	559,85
Quitosana Sulfatada	1	22,08 - 190,12	87,02	61,16
	2	190,12 - 470,01	48,08	240
	3	470,01 - 689,80	18,7	610,22
Quitosana Sulfatada 0,03	1	22,70 - 180,17	85,66	60,94
	2	180,17 - 370,05	42,38	220,49
	3	370,05 - 619,14	4,52	490,21
Quitosana Sulfatada 0,08	1	25,92 - 180,11	85,65	73,77
	2	180,11 - 370,11	45,45	220,53
	3	370,11 - 689,54	9,22	540,08

Fonte: Elaborada pela autora.

Os filmes apresentaram três eventos térmicos, sendo que em todos os filmes avaliados a segunda etapa, em que se inicia a degradação térmica da cadeia principal do polímero que ocorreu após a temperatura de 190 °C, desse modo, foi possível identificar que a esterilização pelo método tradicional de autoclavagem seria incapaz de impactar os filmes. Os filmes de quitosana sulfatada mantiveram a tendência de apresentarem uma menor temperatura máxima de degradação quando comparados com a quitosana natural. Houve uma pequena diminuição do valor da temperatura máxima de degradação das amostras de quitosana sulfatada reticulada com 0,03% e 0,08% v/v de glutaraldeído em comparação a quitosana sulfatada sem reticulação, indicando assim uma diminuição da estabilidade térmica das amostras de quitosana sulfatada com reticulação.

A estabilidade é influenciada pelo aumento no nível de reticulação do polímero e redução de ligações de hidrogênio entre as unidades de quitosana. A reticulação com glutaraldeído é realizada através da reação com grupos amino livres da quitosana e isso causa uma alteração nos sítios doadores e receptores da ligação de hidrogênio, gerando uma perda cooperativa da ligação de hidrogênio ao longo do esqueleto da quitosana. Desse modo, há uma desestabilização da rede de ligações de hidrogênio daquele polímero resultando em uma menor temperatura de decomposição (POON; WILSON; HEADLEY, 2014). Esse efeito foi evidenciado nas amostras de quitosana sulfatada reticuladas, na qual foi possível identificar uma temperatura máxima de degradação 220 °C inferior à temperatura máxima de degradação da quitosana sulfatada sem reticulação 240 °C. Porém, o efeito não foi tão observado para amostras de quitosana natural, provavelmente em virtude da maior disposição de grupos amino quando comparado com a quitosana sulfatada que já havia sofrido uma redução na disponibilidade daqueles grupos após a reação de sulfatação.

A amostra de quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído apresentou uma massa residual inferior à amostra de quitosana reticulada com 0,08% de glutaraldeído. Esse efeito pode ser explicado pela autopolimerização do glutaraldeído que ocorre quando a proporção do glutaraldeído é superior a estequiometria de reação com quitosana (1:3 Glu-Qui) existem três sítios de reação por monômero de glucosamina. Embora haja uma perda de dois sítios doadores da ligação de Hidrogênio devido à reticulação com um mol de glutaraldeído, haverá um aumento da ramificação da estrutura, assim as interações cumulativas de Van der Waals da polimerização do glutaraldeído podem melhorar a estabilidade térmica dos polímeros reticulados com glutaraldeído. Dessa forma, no caso da QS0,08 o nível de glutaraldeído deve ter excedido a razão estequiométrica molar dos grupos amino por monômetro de quitosana, já que a estabilidade térmica de um copolímero é influenciada pelo nível de reticulação e autopolimerização do glutaraldeído que ocorre a altas razões estequiométricas de glutaraldeído (1:1 Chi-Glu) se forem ignoradas as reações com grupos hidroxila da quitosana ou auto polimerização do glutaraldeído. A estabilidade térmica do glutaraldeído aumenta com a reticulação enquanto a autopolimerização confere uma maior estabilidade térmica ao polímero (POON; WILSON; HEADLEY, 2014).

Assim como no presente trabalho, Neto e colaboradores (2005) reportaram que em baixas concentrações de agente reticulante, a estabilidade da amostra tende a diminuir, enquanto ao aumentar a concentração de reticulante há um aumento na temperatura de decomposição da amostra (NETO *et al.*, 2005). Resultado semelhante ao reportado no presente trabalho foi

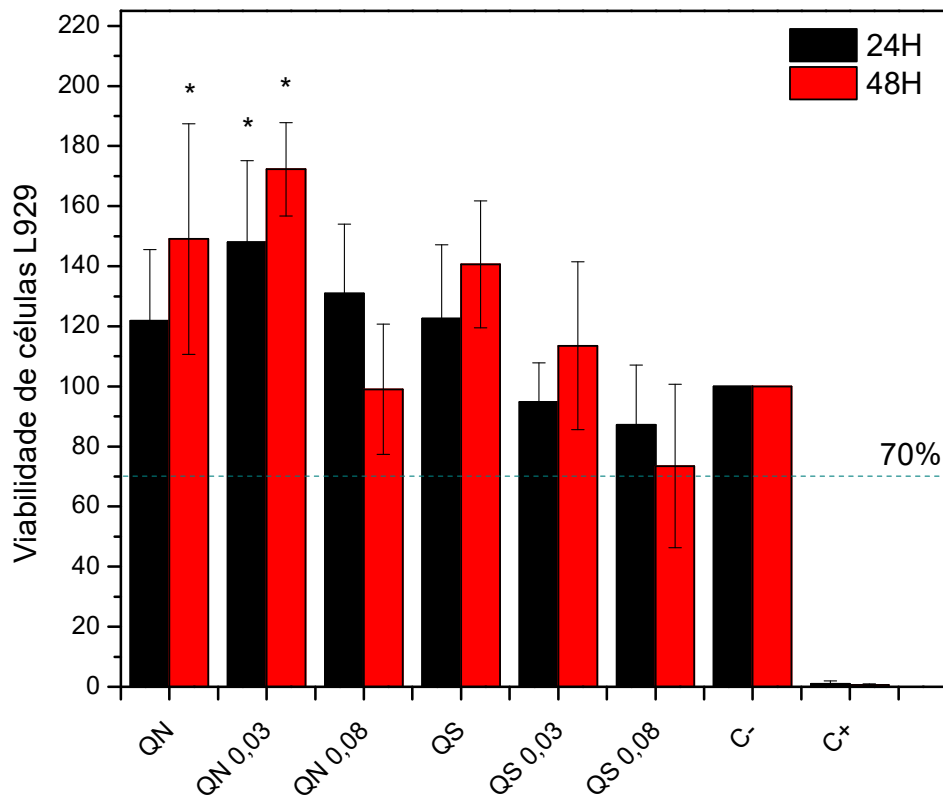
relatado no estudo de Ji e colaboradores (2018). Os autores desenvolveram uma blenda de lignocelulose e quitosana reticuladas com glutaraldeído e avaliaram uma porcentagem de massa de 0,25 e 0,50 de glutaraldeído que resultaram na termogravimetria em uma massa residual de 35,63 e 38,30 % levando os autores a identificarem que a massa residual das amostras aumentou com o aumento da quantidade de glutaraldeído. Foi concluído pelos autores que a proporção de glutaraldeído (0,50) levou a uma maior estabilidade a altas temperaturas (JI *et al.*, 2018).

A reticulação com glutaraldeído foi confirmada na TG assim como havia sido confirmada no teste de FTIR e ficou evidenciado uma menor estabilidade da estrutura reticulada frente ao aumento de temperatura quando comparado a quitosana sulfatada. Entretanto, a melhoria das características do filme como, por exemplo, uma maior resistência a água justifica o uso do reticulante.

5.1.6 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade é importante para não afetar os componentes e funções celulares vitais, como o metabolismo celular. Para essa avaliação, foi escolhido o uso da linhagem de fibroblastos de rato L929, pois essa linhagem é recomendada para ensaios de citotoxicidade em biopolímeros pela *International Organization for Standardization* ISO 10993 que apresenta uma avaliação da biocompatibilidade de materiais para a aplicação médica, desse modo, são priorizados estudos baseados em cultivo celular *in vitro* e quando a viabilidade celular do material for maior que 70% este pode ser considerado não citotóxico. Na Figura 39 pode-se observar os resultados obtidos.

Figura 39 - Viabilidade de células L929 em extratos de filmes de quitosana natural (QN), quitosana natural reticulada com 0,03% (v/v) de glutaraldeído (QN0,03), quitosana natural reticulada com 0,08% (v/v) de glutaraldeído (QN0,08), quitosana sulfatada (QS), quitosana sulfatada reticulada com 0,03% (v/v) de glutaraldeído (QS0,03) e quitosana sulfatada com 0,08% (v/v) de glutaraldeído (QS0,08). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média \pm E.P.M). *, $p < 0,05$; 1 way ANOVA e teste de Turkey.



Fonte: elaborado pela autora.

Como pode ser observado na Figura 39, os extratos dos filmes desenvolvidos podem ser considerados não citotóxicos e compatíveis com as células de fibroblastos de rato L929. Nas duas amostras com maior concentração de glutaraldeído, houve uma ligeira diminuição na viabilidade celular com o tempo de incubação, devido a possível liberação gradual de resíduos reacionais, os quais, podem ser tóxicos (especialmente o glutaraldeído). Entretanto, em baixas concentrações do glutaraldeído, a viabilidade celular de $87,33\% \pm 8,26$ do filme de quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (QS 0,03) indicou uma influência mínima do conteúdo do reticulante na citotoxicidade. De fato, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído e

o controle negativo, esse resultado sugere que o material não é prejudicial às células.

Mesmo estando dentro da margem de erro, um leve aumento na viabilidade celular (140% e 112% foram observadas nas amostras de quitosana sulfatada (QS) e quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído respectivamente em 48h. Esse resultado sugere uma tendência observada em alguns estudos na literatura que apontam que a quitosana sulfatada é segura para células e pode aumentar o crescimento celular. Em virtude da menor proporção de reticulante utilizado, o presente trabalho apresentou um crescimento celular acelerado se comparado ao estudo reportado por Pinto e colaboradores (2020) que avaliaram a viabilidade celular de fibroblastos em *scaffolds* de quitosana natural e sulfatada reticulados com 0,2% de glutaraldeído e alcançaram o crescimento celular somente após 7 dias de incubação, concluindo que o material é seguro para as células (PINTO *et al.*, 2020).

Foi desenvolvido um *stent* polimérico em uma impressora 3D por QIU e colaboradores (2020) onde a base do dispositivo foi o polímero policaprolactona (PCL), e foi feita uma modificação no material com imobilização da quitosana sulfatada (2-N,6-O-quitosana sulfatada). Foi identificado pelos autores que ambos os materiais (PCL e PCL com QS) foram compatíveis com a cultura de células de L929, indicando a não toxicidade da amostra, mas foi identificado pelos autores que amostras recobertas com a quitosana sulfatada foram capazes de aumentar a proliferação celular em aproximadamente 20%. Desse modo, assim como no presente trabalho, foi concluído que o material modificado com quitosana sulfatada era um bom candidato para o desenvolvimento de *stents* cardiovasculares (QIU *et al.*, 2020).

Visto que o uso do glutaraldeído apresentou resultados de citotoxicidade acima de 70% sendo, portanto, seguro para as células, a adição do reticulante confere uma melhoria nas macro e micro propriedades do polímero como, por exemplo, permeabilidade, molhabilidade e resistência química seria (BEPPU *et al.*, 2007).

5.2 Recobrimento de aço inoxidável e nanotubos de TiO₂

5.2.1 Eletropolimento do aço inoxidável

Amostras de aço inoxidável foram submetidas ao processo de eletropolimento antes de ser realizado o recobrimento com quitosana natural ou sulfatada. Na Figura 40 é possível comparar o aço antes e após o eletropolimento.

Figura 40 - Aço inox 316 L com eletropolimento (esquerda) e aço inox 316 L sem eletropolimento (direita).

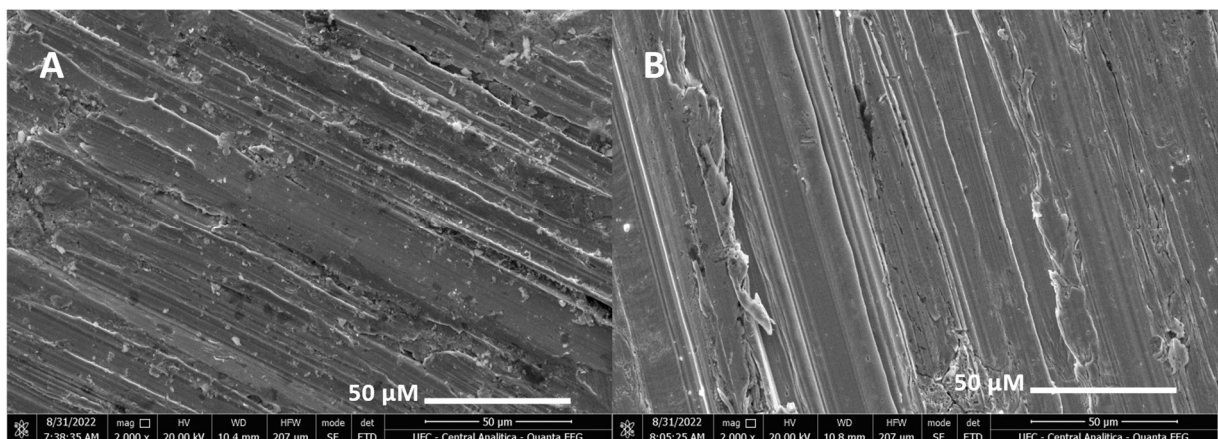


Fonte: elaborado pela autora.

Após o eletropolimento, as amostras de aço inoxidável 316L apresentaram visualmente um maior brilho na superfície assim como uma maior uniformidade superficial. A necessidade de se realizar o eletropolimento advém de a qualidade do recobrimento produzido ser fortemente dependente do estado inicial da superfície, por isso antes de iniciar o recobrimento, foi necessário polir a superfície do aço inoxidável (TEGART, 1959 E GABE 1994).

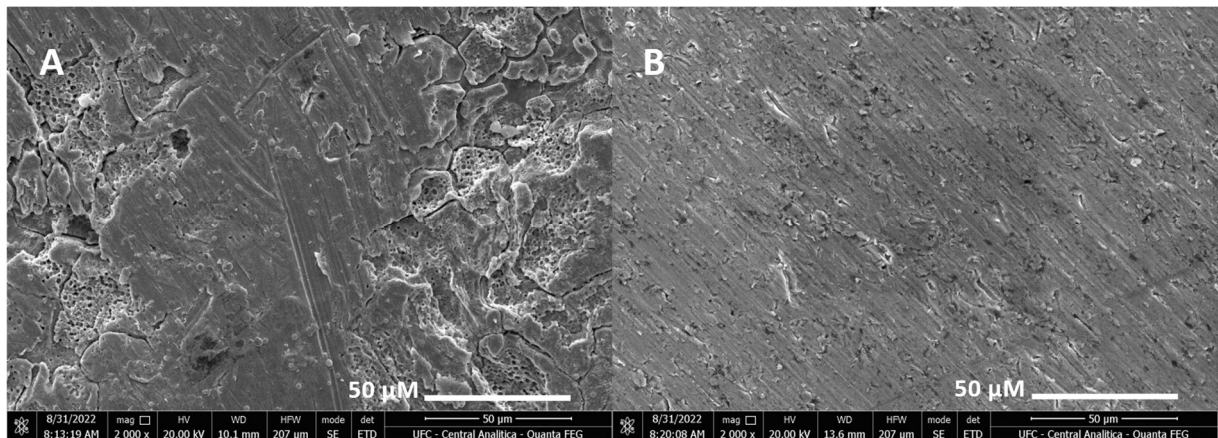
Foi realizado o MEV das superfícies de aço inoxidável e ligas de titânio sem e com recobrimento na central analítica da Universidade Federal do Ceará, as imagens podem ser observadas nas Figuras 41 e 42 e indicam uma maior homogeneidade da amostra recoberta.

Figura 41 – MEV das superfícies de aço sem recobrimento (A) e com quitosana sulfatada (B).



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 42 – MEV da liga de titânio sem recobrimento (A) e com quitosana sulfatada (B).

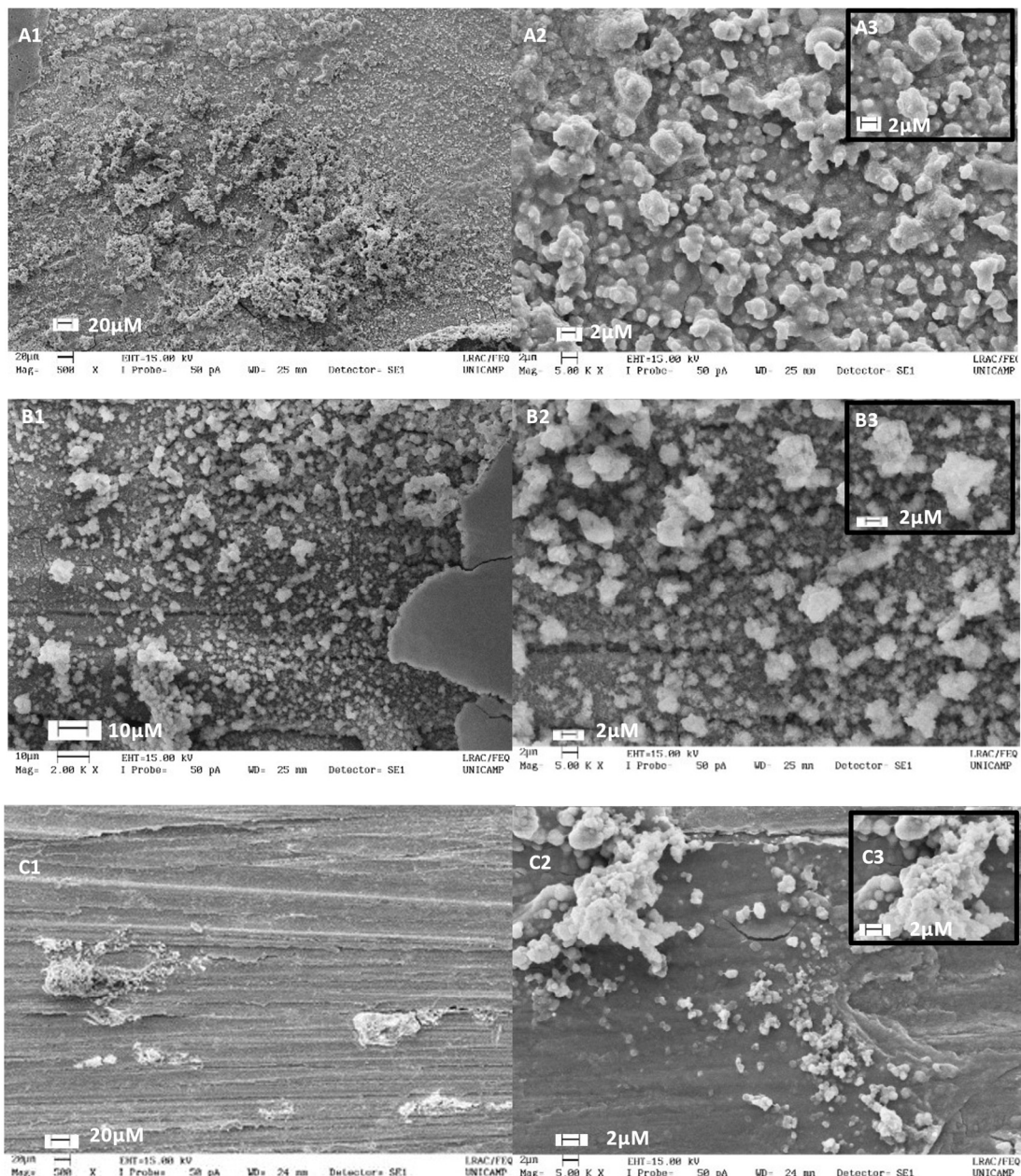


Fonte: elaborado pela autora.

5.2.2 Adesão plaquetária em aço inoxidável e nanotubos de TiO_2

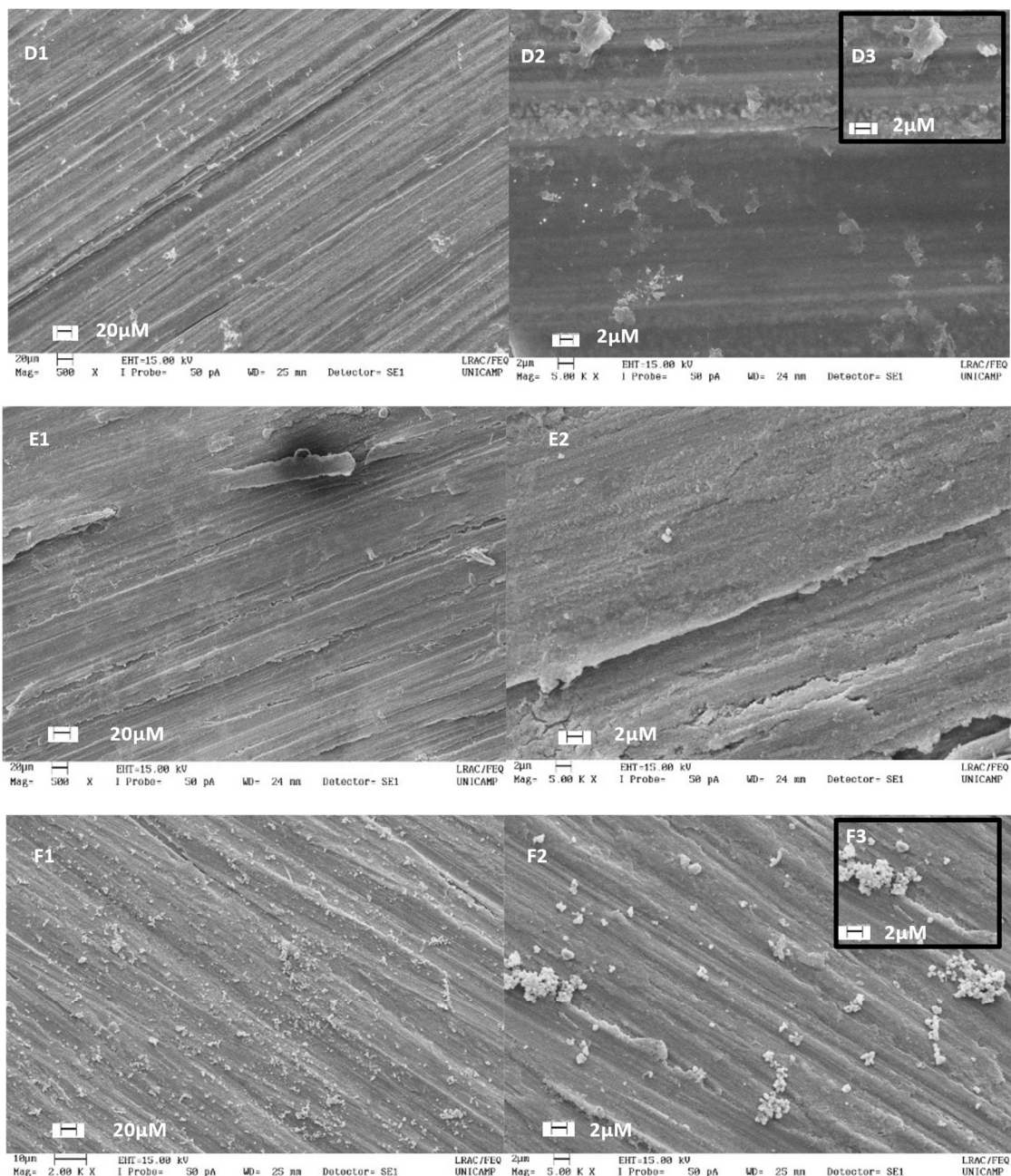
Após a etapa inicial de adsorção de proteínas a superfície, as plaquetas aderem e podem ser ativadas (JAFFER *et al.*, 2015), nesse processo sua morfologia muda e há a formação de prolongamentos que se aderem à superfície e a outras plaquetas (HUANG *et al.*, 2015). A ativação das plaquetas na superfície foi visualizada usando imagens de MEV e foram identificadas três diferentes categorias de plaquetas de acordo com sua morfologia, (a) plaquetas não ativadas que apresentaram um formato circular sem extensões de prolongamentos; (b) plaquetas parcialmente ativadas que exibiram poucos prolongamentos fixados na superfície e (c) plaquetas totalmente ativadas que exibiram uma significativa formação de prolongamentos fixados na superfície. As amostras de aço inoxidável e nanotubos que receberam recobrimento foram submetidas ao teste de adesão plaquetária e analisadas no MEV. Os resultados foram agrupados nas Figuras 43 a 46.

Figura 43 – MEV das amostras submetidas a adesão plaquetária. Em A1, rica cobertura de plaquetas totalmente ativadas com formação de agregados sobre a superfície de aço inoxidável (500x). A2, plaquetas totalmente ativadas e com significante formação de prolongamentos (5000x). A3, plaquetas agregadas e totalmente ativadas. B1, rica cobertura de plaquetas totalmente ativadas com formação de agregados sobre a superfície de aço inoxidável eletropolido (2000x). B2, plaquetas totalmente ativadas (5000x) e B3 agregado de plaquetas totalmente ativadas. C1, plaquetas agregadas sobre a superfície aço inoxidável com recobrimento de quitosana natural (500x). C2, agregados de plaquetas ativadas (5000x). C3 agregado de plaquetas totalmente ativadas.



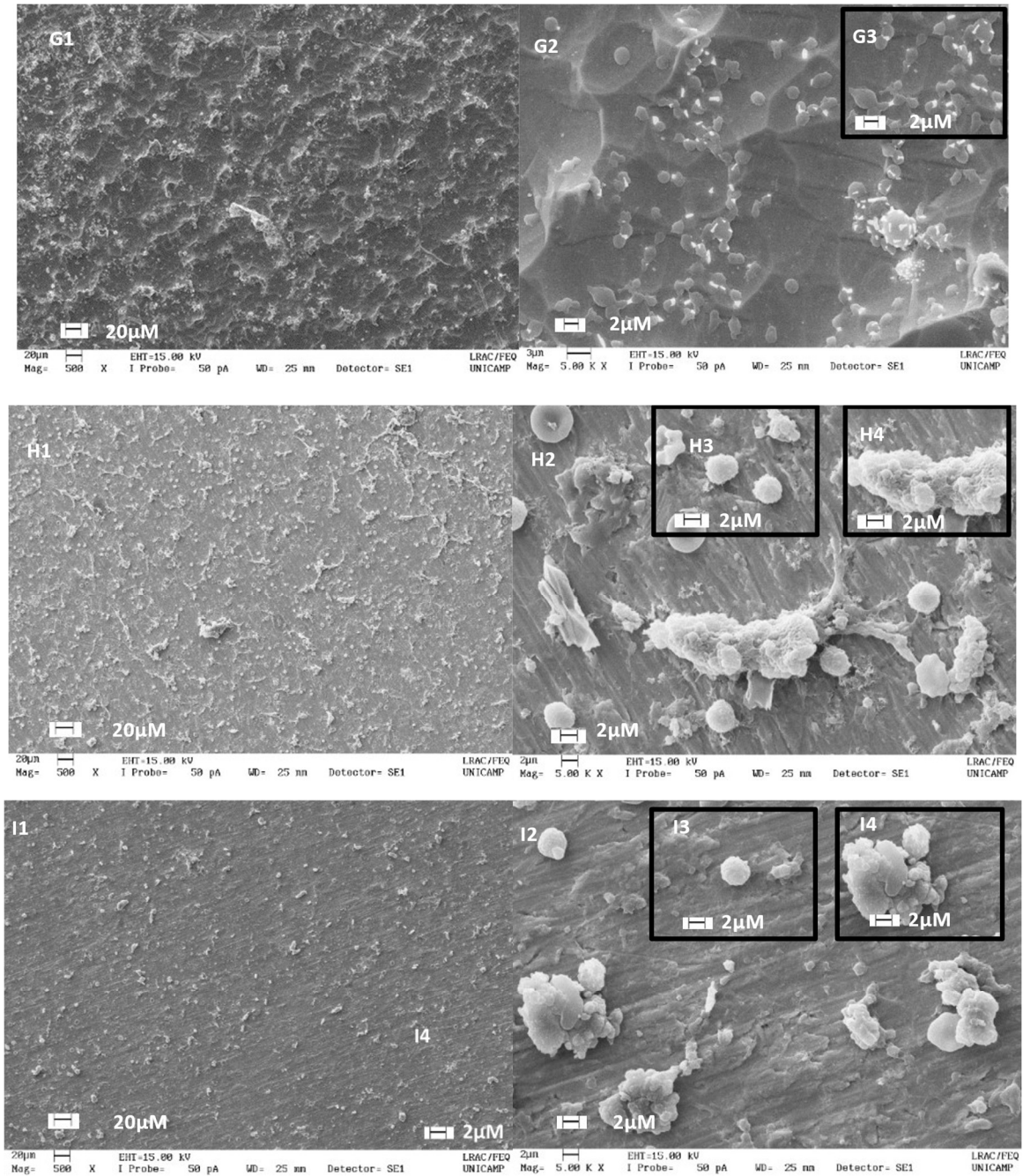
Fonte: elaborado pela autora.

Figura 44 - MEV das amostras submetidas a adesão plaquetária. Em D1, presença de plaquetas sobre a superfície de aço inoxidável com recobrimento de quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído (500x). D2 plaquetas ativadas (5000x). D3 plaqueta parcialmente ativada. E1 sem plaquetas sobre a superfície de aço inoxidável com recobrimento de quitosana sulfatada (500x). E2 sem plaquetas sobre a superfície (5000x). F1 Nota-se a presença de plaquetas sobre a superfície de aço inoxidável com recobrimento de quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (500x). F2 presença de plaquetas agregadas (5000x). F3 agregado de plaquetas.



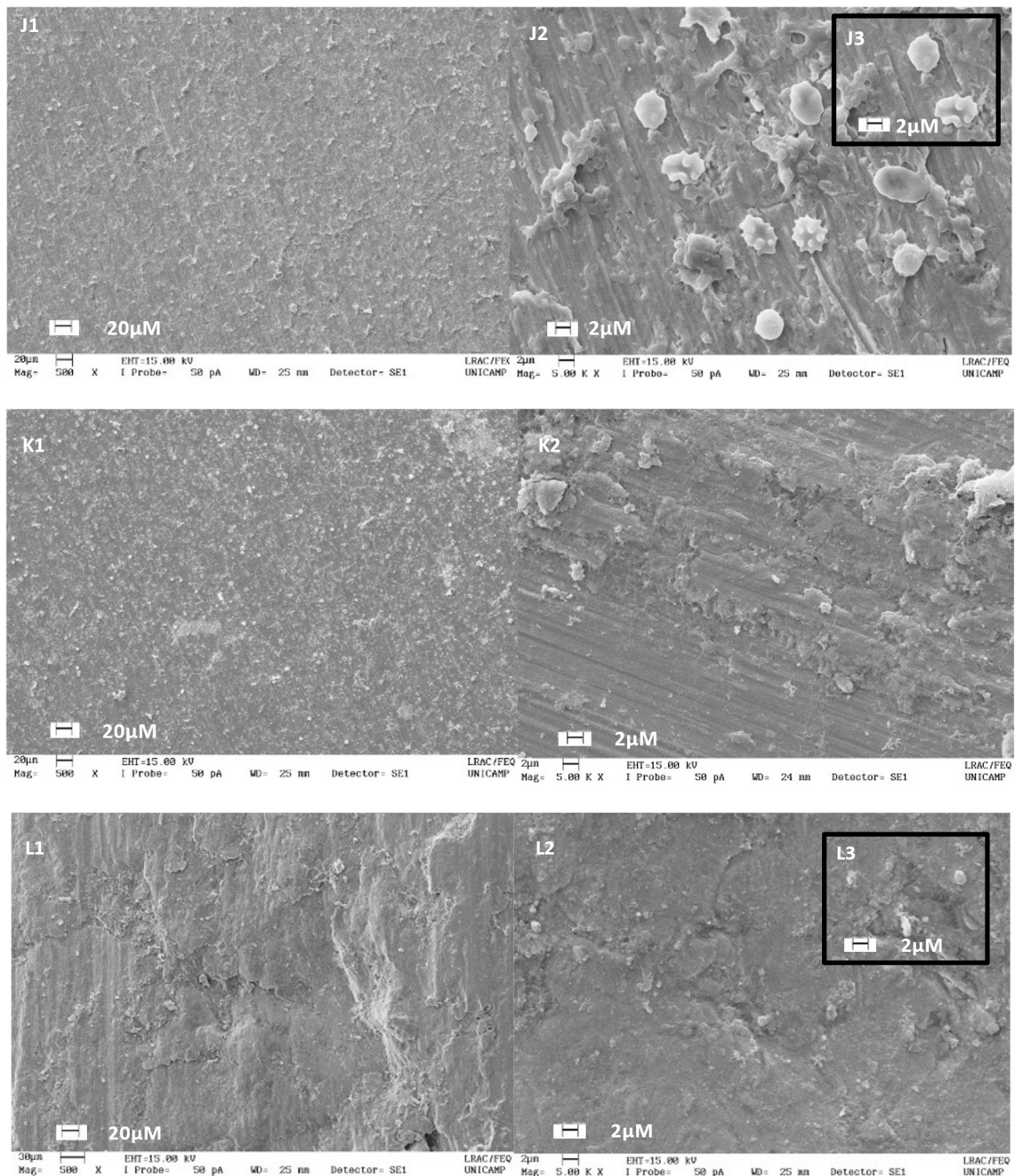
Fonte: elaborado pela autora.

Figura 45 - MEV das amostras submetidas a adesão plaquetária. Em G1, plaquetas sobre a superfície de titânio (500x). G2 plaquetas ativadas (5000x). G3 agregado de plaquetas. H1 plaquetas sobre a superfície titânio tratada (500x). H2 plaquetas ativadas (5000x). H3 plaqueta parcialmente ativada. H4 agregado de plaquetas totalmente ativadas. I1 plaquetas sobre a superfície titânio com recobrimento de quitosana natural (500x). I2 plaquetas ativadas (5000x). I3 plaquetas parcialmente ativadas. I4 agregado de plaquetas totalmente ativadas.



Fonte: elaborado pela autora.

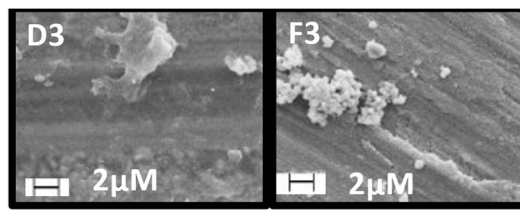
Figura 46 – MEV das amostras submetidas a adesão plaquetária. Em J1, plaquetas sobre a superfície de titânio com recobrimento de quitosana natural reticulada com 0,03 % glutaraldeído (500x). J2 plaquetas ativadas (5000x). J3 plaquetas parcialmente ativadas. K1 superfície titânio com recobrimento de quitosana sulfatada (500x). K2 sem plaquetas sobre a superfície (5000x). L1 poucas plaquetas sobre a superfície de titânio com recobrimento de quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (500x). L2 plaquetas (5000x). L3 plaqueta não ativada.



Fonte: elaborado pela autora.

Para as superfícies de aço inoxidável, visualmente foi possível identificar nas imagens do MEV plaquetas totalmente e/ou parcialmente ativadas nas amostras de aço inoxidável (A), aço inoxidável eletropolido (B), aço recoberto com QN (C) e aço recoberto com QN reticulada 0,03% de glutaraldeído (D). Entretanto, não foi visualizada nenhuma plaqueta totalmente ativada na amostra aço recoberto com QS (E). Para a amostra aço recoberto com QS reticulado com 0,03% de glutaraldeído (F) foram identificadas plaquetas agregadas, mas não foram identificados dendritos indicando que não houve ativação das plaquetas. Na figura 47 pode ser identificada plaqueta ativada (D3) e agregados sem ativação sobre as superfícies (F3).

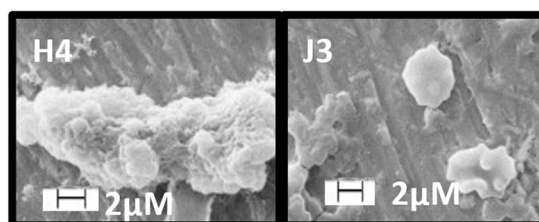
Figura 47 - Sobre a superfície de aço inoxidável recoberto com QN reticulada com 0,03% de glutaraldeído (D3) nota-se a presença de uma plaqueta ativada e sobre a superfície de aço recoberto com QS reticulado com 0,03% de glutaraldeído nota-se a presença de plaquetas agregadas, mas sem ativação e formação de dendritos sobre a superfície (F3).



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 48 - Para as superfícies da liga de Ti com nanotubos de titânio, foi possível identificar plaquetas totalmente e/ou parcialmente ativadas nas amostras liga de Ti (G), liga de Ti com tratamento (H), liga de Ti recoberto com QN (I), liga de Ti recoberto com QN reticulado com 0,03% de glutaraldeído (J). Já as duas últimas amostras de liga de Ti recoberta com quitosana sulfatada (K) e liga de Ti recoberta com quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (L) não apresentaram plaquetas totalmente ativadas. Na figura 48 podem ser identificadas plaquetas total e parcialmente ativadas sobre amostras de nanotubos de titânio.

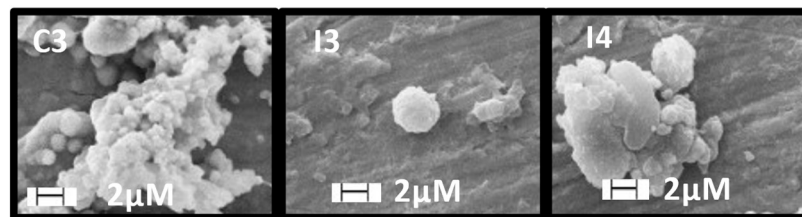
Figura 48 - Em destaque agregado de plaquetas totalmente ativadas sobre a superfície de liga de titânio (H4) e plaquetas parcialmente ativadas sobre superfície de liga de titânio recoberta com quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído (J3).



Fonte: elaborado pela autora.

Nas amostras, tanto aço inoxidável (C) quanto liga de titânio recobertas com quitosana natural (I) foram identificadas plaquetas parcialmente e totalmente ativadas como pode ser identificado na Figura 46, pois essa superfície é rica em grupos amino que agem como sítio de ligação para adsorção das proteínas (CAMPELO *et al.*, 2017; HOVEN *et al.*, 2007). Um grande número de agregados e plaquetas ativadas indicam uma maior propensão a formação de trombos (BARTLET *et al.*, 2017), portanto o material recoberto com quitosana natural que apresentaram plaquetas total e parcialmente ativadas não se mostra um bom revestimento para *stents* cardiovasculares. É possível identificar as plaquetas ativadas na Figura 49.

Figura 49 - Em destaque agregado de plaquetas totalmente ativadas sobre superfície de aço inoxidável recoberta com quitosana natural (C3). Plaqueta parcialmente ativada sobre superfície de liga de titânio recoberta com quitosana natural (I3). Em destaque agregado de plaquetas ativadas sobre superfície da liga de titânio recoberta com quitosana natural (I4).



Fonte: elaborado pela autora.

Já nas amostras de aço inoxidável (E) e liga de titânio revestidos com quitosana sulfatada (K) não foram identificadas plaquetas totalmente ativadas. Isso pode ser explicado pela redução da disponibilidade de grupos amino da quitosana após a reação de sulfatação e pela presença de grupos sulfatados que são carregados negativamente e podem reduzir a adsorção de proteínas plasmáticas que são responsáveis por iniciar a cascata da coagulação. A ausência de plaquetas ativadas nos materiais recobertos com quitosana sulfatada corrobora com os resultados identificados no teste de TTPA e agregação de plaquetas, indicando uma maior hemocompatibilidade da quitosana sulfatada.

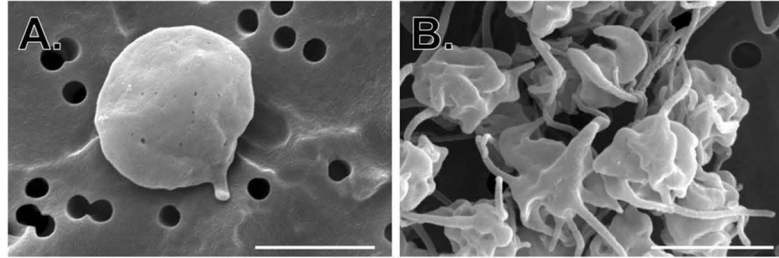
O resultado reportado está de acordo com a literatura, Campelo e colaboradores (2017) avaliaram a adesão plaquetária em superfícies de aço inoxidável 316L recobertas com quitosana natural e quitosana sulfatada. Assim como no presente trabalho, foi observada a inexistência de plaquetas ativadas sobre a superfície recoberta por quitosana sulfatada, o resultado foi atribuído as cargas negativas presente no polímero. No presente trabalho a metodologia utilizada resulta na sulfatação da quitosana nas posições 2,3 e 6 resultados na quitosana 2-N-3,6-O-quitosana sulfatada com peso molecular de 5,050 Da e grau de sulfatação

de 1,37 (MORAES *et al.*, 2019), desse modo, a reação reduziu a presença dos grupos protonados e aumentou a carga negativa presente no polímero resultando em propriedades hemocompatíveis. Entretanto, o grau de sulfatação nem sempre vai ser o único fator determinante para a redução de plaquetas aderidas, pois essa redução também depende dos outros grupos presentes na molécula, por exemplo, a presença de muitos grupos protonados vai induzir uma grande adesão plaquetária. Os efeitos das cargas positivas nas características de biomateriais artificiais já foram demonstrados em estudos anteriores (OKAMOTO *et al.*, 2003).

KERCH e colaboradores (2017) produziram revestimentos sobre discos de Cobalto-Cromo baseados em polieletrólitos com cargas opostas: heparina, quitosana e quitosana sulfatada com diferentes graus de sulfatação. Foram produzidos quatro tipos quitosana/ quitosana sulfatada CS60 com grau de sulfatação de 40%, quitosana/ quitosana sulfatada CS80 com grau de sulfatação de 80%, quitosana sulfatada CS60/ quitosana e quitosana/heparina. Os autores observaram que a aderência de plaquetas no revestimento com uma camada mais externa de quitosana sulfatada com um menor grau de sulfatação foi menor quando comparado a amostra com maior grau de sulfatação, o resultado foi atribuído as interações eletrostáticas mais fortes entre polieletrólitos de cargas opostas que resultaram em hidratação reduzida e aumento da rigidez levando assim a um aumento de adsorção de proteínas e a adesão de plaquetas. Além disso, uma menor rigidez da camada mais externa com o uso de quitosana sulfatada levou a uma diminuição da adesão das plaquetas, visto que no revestimento contendo quitosana sulfatada a adesão foi menor do que no revestimento contendo heparina. Assim, o estudo relatado demonstrou que a quitosana sulfatada pode ser projetada para ter propriedades superiores às da heparina quando usada em revestimentos multicamadas de implantes e dispositivos que entram em contato com o sangue. (KERCH *et al.*, 2017).

Para comparação com os resultados apresentados anteriormente, na Figura 50 é possível identificar imagens da literatura de plaquetas somente aderidas em seu formato original (50-A) e ativadas (50-B) (TOMAIUOLO *et al.*, 2020)

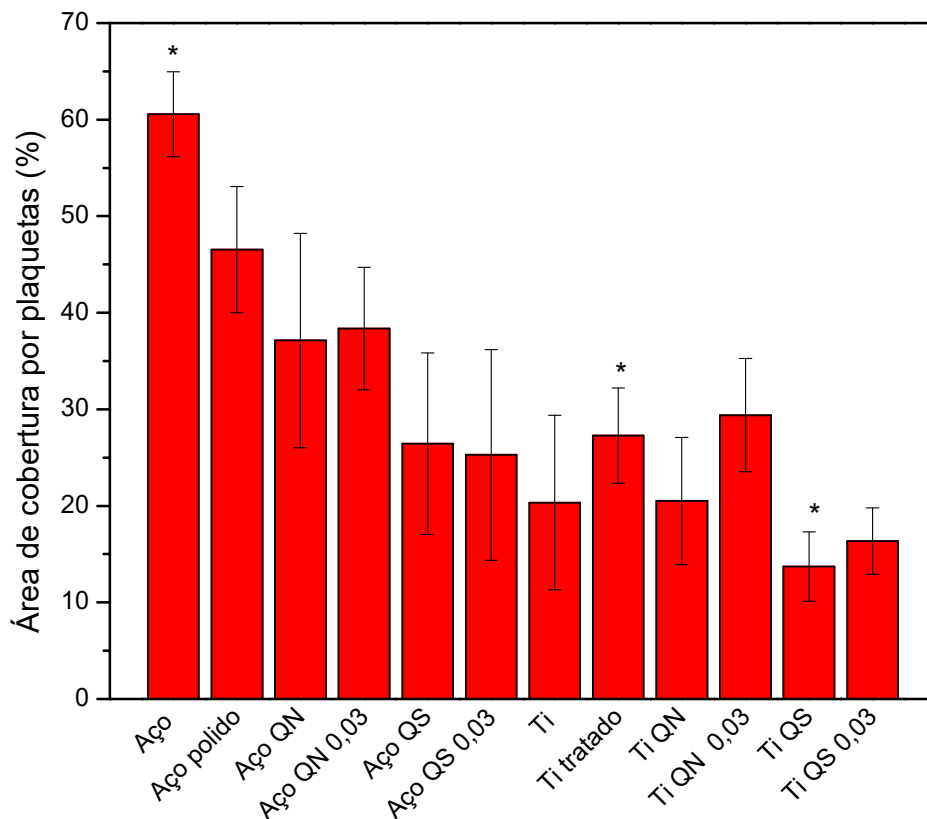
Figura 50 - Imagens na microscopia eletrônica de varredura. (A) Nota-se a presença de uma plaqueta isolada sobre a superfície. (B) Nota-se a presença de plaquetas ativadas. Barra representa a distância de 2 μm



Fonte: TOMAIUOLO *et al.*, (2020).

A partir das imagens obtidas no MEV, foi realizado o cálculo da porcentagem de cobertura das plaquetas com o auxílio do software ImageJ. O resultado pode ser observado na Figura 51.

Figura 51 - Área de cobertura pelas plaquetas nas amostras de aço inoxidável (Aço), aço inoxidável polido (Aço polido), aço inoxidável com quitosana natural (Aço QN), aço inoxidável com quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído (Aço QN0,03), aço inoxidável com quitosana sulfatada (Aço QS), aço inoxidável com quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (Aço QS0,03), titânio (Ti), titânio tratado (TI tratado), titânio com quitosana natural (Ti QN), titânio com quitosana natural reticulada com 0,03% de glutaraldeído (Ti QN0,03), titânio com quitosana sulfatada (Ti QS), titânio com quitosana sulfatada reticulada com 0,03% de glutaraldeído (Ti QS0,03). Os valores foram expressos como porcentagem de cobertura de área (média \pm E.P.M). *, $p < 0,05$; 1 way ANOVA e teste de Turkey.



Fonte: elaborado pela autora.

Foram identificados os seguintes valores para a porcentagem de cobertura de plaquetas das amostras avaliadas 60,5 \pm 4,3 (Aço), 46,5 \pm 6,5 (aço polido), 37,1 \pm 11,0 (Aço QN), 38,3 \pm 6,4 (Aço QN 0,03), 26,4 \pm 9,4 (Aço QS), 25,7 \pm 10 (Aço QS 0,03), 20,3 \pm 9,0 (Ti),

27,2 ± 4,9 (Ti tratado), 20,5 ± 6,5 (Ti QN), 29,4 ± 5,8 (Ti QN 0,03), 13,7 ± 3,5 (Ti QS), 16,3 ± 3,4 (Ti QS 0,03).

As amostras com glutaraldeído apresentaram no geral maior agregação e ativação plaquetária quando comparada aos revestimentos sem glutaraldeído. Isso se deve provavelmente ao fato do glutaraldeído aumentar a rigidez do material levando a um aumento da agregação e ativação plaquetária. Esse mesmo efeito foi relatado por Qiu e colaboradores (2014) que avaliaram a capacidade das plaquetas de sentir a rigidez do substrato durante a formação do coágulo. O aumento na rigidez do substrato elevou a adesão e espalhamento das plaquetas, aumentando assim o nível de ativação das plaquetas e secreção de grânulos com atividade pró-coagulante. Com o aumento da rigidez, as plaquetas espalharam e se tornaram mais ativadas (QIU *et al.*, 2014).

Em relação às ligas utilizadas para receber os recobrimentos, foram avaliadas duas ligas diferentes: aço inoxidável 316L e Ti10Mo8Nb6Zr modificada com crescimento de nanotubos de TiO₂. Foi possível identificar que a liga de Ti já modificada com o crescimento dos nanotubos apresentou uma menor adesão plaquetária quando comparada com as amostras de aço inoxidável sem eletropolimento 20,3 ± 9,0% e 60,5 ± 4,3% respectivamente.

O melhor resultado se deve provavelmente devido à superfície da liga de titânio com nanotubos de TiO₂ já apresentar importantes características para o sucesso clínico do implante quando comparada ao aço inoxidável como, por exemplo, a camada de óxido de titânio que apresenta alta estabilidade térmica, baixa solubilidade e baixa toxicidade em meio fisiológico (ROSA *et al.*, 2014). Aroussi e colaboradores (2019) compararam a performance em meio biológico do aço inoxidável 316L e titânio. A liga de titânio se mostrou mecanicamente mais forte quando comparada ao aço inoxidável e apresentou também uma menor corrente de corrosão (AROSSI; AOUR; BOUAZIZ, 2019). Desse modo, a baixa corrosão por si já representa uma melhoria na hemocompatibilidade do material da liga de titânio já que haverá uma menor liberação de produtos de degradação no corpo.

O resultado do presente trabalho está de acordo com estudos reportados na literatura por Huang e colaboradores (2014) que reportaram uma redução na adesão e ativação plaquetária em aço inoxidável que recebeu o recobrimento com nanotubos de Titânio quando comparados ao aço sem revestimento. Foi observado também uma melhor resistência a corrosão nas superfícies modificadas (HUANG *et al.*, 2015).

Foi reportado um efeito semelhante no estudo de Vishwakarma e colaboradores (2015) que avaliaram a hemocompatibilidade do aço inoxidável 316L com e sem a adição de

um recobrimento de TiO₂, sendo, a superfície obtida após o recobrimento menos rugosa. Foram identificadas plaquetas aderidas com pseudópodes sobre o aço inoxidável 316L, indicando que houve a ativação plaquetária em virtude da irregularidade e rugosidade da superfície que causaram uma maior interação com proteínas de fibrinogênio levando a uma forte adesão de plaquetas pelos receptores de proteínas das plaquetas (GpIIbIIIa) induzindo a agregação e liberação de substâncias pró-coagulantes. Por outro lado, a amostra recoberta apresentou plaquetas aderidas sem pseudópodes e sem ativação, pois provavelmente não houve a liberação do conteúdo procoagulante e a superfície menos rugosa minimizou o dano às plaquetas sanguíneas, inibindo ativação de fibrina e subsequentemente a trombose. Assim, o aço inoxidável com TiO₂ apresentou maior hemocompatibilidade (VISHWAKARMA *et al.*, 2015).

Outro trabalho que corrobora com os resultados apresentados acerca da superioridade dos nanotubos de titânio frente ao aço inoxidável foi realizado por Manivasagam e Popat (2020) que modificaram a superfície do Ti com NaOH 5M por 24 horas formando uma nanoestrutura de poros densos e pequenos (70-170 nm) que foi capaz de reduzir a ativação plaquetária quando comparado a superfície de Ti sem modificação. Foi identificado no MEV pelos autores a formação do complexo de plaquetas ativadas e leucócitos sobre a superfície de Ti não modificada. Após a modificação, embora houvesse agregação plaquetária, não foi observada a formação de prolongamento, indicando assim que as plaquetas não foram ativadas (MANIVASAGAM; POPAT, 2020).

No presente trabalho, os melhores resultados, ou seja, uma menor adesão plaquetária foi observada com a utilização da liga de Ti com nanotubos quando comparados à liga de aço inoxidável. Entretanto, houve ainda uma maior redução da adesão plaquetária em ambas as ligas aço inoxidável e Ti em virtude da adição dos revestimentos de quitosana sulfatada sobre as superfícies. De fato, dentre todas as amostras, a maior redução na porcentagem de plaquetas aderidas foi identificada na amostra da liga de Ti modificada com o crescimento de nanotubos que recebeu o recobrimento de quitosana sulfatada, sendo, portanto, o desenvolvimento desse material de grande interesse para o aprimoramento de produtos com características hemocompatíveis.

5.3 Indicação para trabalhos futuros

A fim de se avaliar profundamente a hemocompatibilidade dos materiais, outros ensaios são reportados na literatura como, por exemplo, o ensaio de hemólise, pois a interação

com os eritrócitos pode influenciar negativamente quando o dispositivo intravascular entra em contato com a circulação sanguínea. Também são reportados ensaios de proliferação celular visando utilizar o material em aplicações de osteoindução e ensaios de avaliação da presença de NO (óxido nítrico) no material, visto que o NO desempenha um papel importante na mediação de muitos aspectos das respostas inflamatórias. Dessa forma, para trabalhos futuros é indicado a realização de ensaios com células vasculares, hemólise e inflamação visando um maior conhecimento do material desenvolvido.

Shelma e colaboradores (2011) realizaram a reação da quitosana com o ácido 1-benzaxitiol-3-um-1,1-dióxido por 5 horas e posteriormente com cloreto de Lauril durante a noite produzindo uma quitosana lauroil sulfatada com a inclusão do grupo sulfatado (hidrofílico) e do grupo laurel (hidrofóbico) na estrutura da quitosana. Foi realizado ensaio de hemólise com células sanguíneas vermelhas a fim de se observar os efeitos sobre os eritrócitos, enquanto a quitosana natural apresentou uma porcentagem de hemólise de $6,92 \pm 0,94$, o derivado de quitosana apresentou uma porcentagem de $0,18 \pm 0,01$. Os autores atribuíram as características hemolíticas de quitosana natural a presença de grupos amino na superfície, pois quando a quitosana entra em contato com o sangue, a atração eletrostática entre a superfície da quitosana e a membrana dos eritrócitos contendo glicoproteínas aniônicas induzem a curvatura da membrana dos eritrócitos levando a ruptura e liberação da hemoglobina. Por outro lado, o derivado de quitosana pobre em grupos amino não apresentou hemólise e essa atividade não hemolítica foi atribuída a cargas negativas presentes no material (SHELMA; SHARMA, 2011).

Cao e colaboradores (2014) produziram a quitosana sulfatada 2-N, 6-O quitosana sulfatada reagindo a quitosana com ácido clorossulfônico por 2 horas. Foram realizados ensaios com células endoteliais da veia umbilical humana e foi identificado que um aumento de viabilidade celular de $180,24 \pm 1,49\%$ na concentração de $1,2 \mu\text{g/ml}$ (CAO *et al.*, 2014). Em outro trabalho reportado na literatura, Qiu e colaboradores (2020) produziram a quitosana 2-N,6-O-Quitosana Sulfatada a partir da reação com ácido clorossulfônico por 4 horas e aplicaram o material como revestimento de um *stent* cardiovascular com esqueleto de PCL em impressora 3D. Ensaio indicaram que os materiais apresentaram menos de 5% de hemólise, sendo, portanto, considerados hemocompatíveis (QIU *et al.*, 2020).

Han e colaboradores (2020) realizaram a sulfatação da quitosana com o ácido clorossulfônico obtendo a 2-N,6-O-Quitosana sulfatada que foi utilizada como recobrimento do poliácido lático (PDLLA) e assim como no presente trabalho, foi utilizada dopamina como

ancora de ligação para o polímero sobre o substrato. Os autores realizaram um ensaio de co-cultura celular com MC3T3-E1 e HUVEC misturando na proporção de 1:1 os meios de cultura no qual as células tinham sido semeadas, a morfologia das células foi visualizada sobre diferentes membranas por meio do MEV após 1, 4 e 7 dias de cultura. Ao dos dias amostra recoberta com quitosana sulfatada foi apresentada uma maior cobertura pelas células indicando que o substrato favorece a adesão e proliferação das células, em relação à viabilidade celular o resultado indica que a adição de quitosana sulfatada apresentou um melhor suporte para proliferação celular, dessa forma, os autores concluíram que o recobrimento de quitosana sulfatada é benéfico para proliferação e ossificação. O conteúdo de NO do sobrenadante também foi avaliado pelos autores em 24 horas de incubação e foi identificado que o material recoberto apresentou melhores resultados para expressão de NO celular quando comparado a superfície sem recobrimento (HAN *et al.*, 2020).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As superfícies dos *stents* são sujeitas a fenômenos de superfícies como adsorção de proteínas e corrosão quando entram em contato com o corpo humano. A fim de evitar essas interações, são propostos recobrimentos das superfícies. No presente trabalho foi desenvolvido um revestimento a partir do polímero quitosana que foi sulfatado quimicamente a fim de mimetizar a estrutura da heparina. A inserção de grupos sulfatados na quitosana natural após a reação com ácido clorossulfônico foi confirmada pelo FTIR com o aumento da banda vibracional em 800 cm^{-1} e 1218 cm^{-1} . A quitosana sulfatada não foi capaz de causar agregação plaquetária nas concentrações avaliadas. Além disso, a atividade anticoagulante na via intrínseca foi confirmada pelo prolongamento em 2,5 vezes o tempo de coagulação no teste de TTPA em relação ao controle quando o plasma foi tratado com $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ de quitosana sulfatada.

Os filmes desenvolvidos a partir de uma solução de quitosana sulfatada 2% (m/v) com glutaraldeído 0,03% (v/v) apresentou-se não tóxico para as células L929 de fibroblastos de rato. Além disso, o FTIR confirmou a manutenção dos grupos sulfatados nos filmes produzidos com quitosana sulfatada e foi identificada uma redução na estabilidade do filme de quitosana sulfatada quando foi adicionado o reticulante glutaraldeído na composição. As ligas metálicas de aço inoxidável e de liga Ti10Mo8Nb6Zr modificada com crescimento de nanotubos de TiO_2 foram recobertas com quitosana natural ou sulfatada. Em virtude das melhorias proporcionadas pelos nanotubos de TiO_2 , a liga de Ti10Mo8Nb6Zr com nanotubos e recoberta com quitosana sulfatada apresentou melhores resultados, mostrando-se um material promissor para utilização como *stents* cardiovasculares.

Os experimentos do presente trabalho foram realizados de maneira estática, sem levar em consideração a dinâmica envolvida com a circulação sanguínea, entretanto quando esse material for implantado nas artérias, em alguns casos, poderia haver a formação de trombos sobre esse *stent* e devido ao fluxo sanguíneo esses trombos poderiam se desprender e ser arrastados para vasos sanguíneos menos calibrosos levando a problemas como aneurismas. Além disso, os fluidos corporais podem atacar o material e os produtos da corrosão de alguns metais podem induzir citotoxicidade e hipersensibilidade. Desse modo, estudos futuros envolvendo a dinâmica sanguínea são indicados para um maior conhecimento sobre o material.

REFERÊNCIAS

- ABU EL-SOAD, A. M. *et al.* Synthesis and characterization of modified sulfonated chitosan for beryllium recovery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 153–160, 15 out. 2019.
- ADRIEN, A. *et al.* Anticoagulant Activity of Sulfated Ulvan Isolated from the Green Macroalga *Ulva rigida*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 291, 14 maio 2019.
- AMIJI, M. M. Platelet adhesion and activation on an amphoteric chitosan derivative bearing sulfonate group. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 10, n. 5, p. 263–271, 15 abr. 1998.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 86–100, abr. 2008.
- AROSSI, D.; AOUR, B.; BOUAZIZ, S. A. A Comparative Study of 316L Stainless Steel and a Titanium Alloy in an Aggressive Biological Medium. **Engineering, Technology and Applied Science Research**, v. 9, p. 5093–5098, 1 dez. 2019.
- AUGUSTINE, T. N. *et al.* Thrombin-Mediated Platelet Activation of Lysed Whole Blood and Platelet-Rich Plasma: A Comparison Between Platelet Activation Markers and Ultrastructural Alterations. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, n. 3, p. 630–639, jun. 2016.
- BARBUCCI, NULL *et al.* Influence of Sulfation on Platelet Aggregation and Activation with Differentially Sulfated Hyaluronic Acids. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 6, n. 2, p. 109–115, set. 1998.
- BARTLET, K. *et al.* Superhemophobic titania nanotube array surfaces for blood contacting medical devices. **RSC Advances**, v. 7, n. 56, p. 35466–35476, 11 jul. 2017.
- BEKMURZAYEVA, A. *et al.* Surface modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 93, p. 1073–1089, 1 dez. 2018.
- BEPPU, M. M. *et al.* Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, n. 1, p. 126–130, 1 set. 2007.
- BERTOLINI, R.; BRUSCHI, S.; GHIOTTI, A. Enhancement of corrosion resistance to sterilization stages of a biomedical grade AISI 316L stainless steel by means of low-temperature machining. **Materials Today: Proceedings**, 1st International Conference on Materials, Mimicking, Manufacturing from and for Bio Application (BioM&M), 27-29 June 2018. v. 7, p. 552–559, 1 jan. 2019.
- BORHANI, S. *et al.* Cardiovascular stents: overview, evolution, and next generation. **Progress in Biomaterials**, v. 7, n. 3, p. 175–205, 1 set. 2018.
- CAMPELO, C. S. *et al.* Sulfonated chitosan and dopamine-based coatings for metallic implants in contact with blood. **Materials Science and Engineering: C**, v. 72, p. 682–691, 1 mar. 2017.

CAMPELO, C. S. *et al.* Development, Validation, and Performance of Chitosan-Based Coatings Using Catechol Coupling. **Macromolecular Bioscience**, v. 20, n. 1, p. 1900253, 2020.

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, n. 2, p. 684–698, 1 jan. 2014.

Cardiovascular diseases (CVDs). Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 7 mares. 2021.

CASTRO, L. S. E. P. W. *et al.* Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown macroalgae *Lobophora variegata* with antioxidant, anti-inflammatory, and antitumoral effects. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 4, p. 1783–1790, 1 ago. 2014.

CAVALHEIRO, A. B. **Modificação da superfície da quitosana através da reação de sulfatação semi-heterogênea**. [s.l.] UFSC, 23 nov. 2009.

CHAGAS, F. D. DA S. *et al.* Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 415–421, 15 set. 2020.

CHEN, Y. *et al.* Enhanced water-solubility, antibacterial activity and biocompatibility upon introducing sulfobetaine and quaternary ammonium to chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 246–253, 5 jun. 2016.

CHURAKOVA, A. A. *et al.* **Influence of ECAP on the structure and properties of Ti18Zr15Nb and Ti10Mo8Nb6Zr alloys for medical application**. 2021.

COSTA, M. A.; SIMON, D. I. Molecular Basis of Restenosis and Drug-Eluting Stents. **Circulation**, v. 111, n. 17, p. 2257–2273, 3 maio 2005.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, Biobased Polymers and Related Materials. v. 49, n. 4, p. 780–792, 1 abr. 2013.

DE CLERCK, F.; DAVID, J. L.; JANSSEN, P. A. Inhibition of 5-hydroxytryptamine-induced and -amplified human platelet aggregation by ketanserin (R 41,468), a selective 5-HT₂-receptor antagonist. 1982. **Agents and Actions**, v. 43, n. 3–4, p. 225–234, dez. 1994.

DEE, G. J.; RHODE, O.; WACHTER, R. Chitosan: Multi-functional marine polymer. **Chitosan : Multi-functional marine polymer**, v. 116, n. 2, p. 39–44, 2001.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions**. [s.l.] Wiley-Liss, Inc, 2002.

DIPPE. **Vantagens e desvantagens dos stents coronarianos convencionais e farmacológicos – Portal do Coração**. Disponível em: <<https://portaldocoracao.com.br/vantagens-e-desvantagens-dos-stents-coronarianos-com-drogas-e-sem-drogas/>>. Acesso em: 14 maio. 2023.

DORE, C. M. P. G. *et al.* A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae

Sargassum vulgare with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 467–475, 2 jan. 2013.

DREYFUSS, J. L. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 409–429, set. 2009.

ELIAS, C.; LIMA, J.; VALIEV, R. Biomedical applications of titanium and its alloys. **JOM: the journal of the Minerals, Metals & Materials Society**, v. 60, p. 46–49, 1 mar. 2008.

ELIAZ, N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. **Materials**, v. 12, n. 3, p. 407, 28 jan. 2019.

FAN, B. E.; FAVALORO, E. J. Counting the carbon cost of heparin: an evolving tragedy of the commons? **The Lancet Haematology**, v. 9, n. 7, p. e469–e471, 1 jul. 2022.

FINN, A. V. *et al.* Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 7, p. 1500–1510, jul. 2007.

GAMZAZADE, A. *et al.* Structural features of sulfated chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 1, p. 113–116, 5 dez. 1997.

GARCÍA, A.; PEÑA, E.; MARTÍNEZ, M. A. Influence of geometrical parameters on radial force during self-expanding stent deployment. Application for a variable radial stiffness stent. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 10, p. 166–175, jun. 2012.

GE, B. *et al.* Preparation of chitosan–dopamine–multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for electrocatalytic oxidation and sensitive electroanalysis of NADH. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 137, n. 2, p. 547–554, 2 abr. 2009.

GOKILA, S. *et al.* Removal of the heavy metal ion chromium (VI) using Chitosan and Alginate nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, 11th APCCS-2016-Chemistry, Environmental, Biotechnology and Biomedical Aspects of Chitin and Chitosan. v. 104, p. 1459–1468, 1 nov. 2017.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica - 11ª Ed. 2007**. 11ª edição ed. Rio de Janeiro: MC Graw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GROUSE, L. H. *et al.* Surface-activated bovine platelets do not spread, they unfold. **The American Journal of Pathology**, v. 136, n. 2, p. 399–408, fev. 1990.

GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochimica Acta**, v. 444, n. 2, p. 128–133, 15 maio 2006.

HAÏDOPOULOS, M. *et al.* Development of an optimized electrochemical process for subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 17, n. 7, p. 647–657, jul. 2006.

HAN, G. *et al.* Sulfated chitosan coated polylactide membrane enhanced osteogenic and vascularization differentiation in MC3T3-E1s and HUVECs co-cultures system. **Carbohydrate Polymers**, v. 245, p. 116522, 1 out. 2020.

HASEBE, T. *et al.* Design for improved adhesion of fluorine-incorporated hydrogenated amorphous carbon on metallic stent: Three-layered structure with controlled surface free energy. **Diamond and Related Materials**, v. 20, n. 7, p. 902–906, jul. 2011.

HEDBERG, Y. *et al.* Surface-protein interactions on different stainless-steel grades: effects of protein adsorption, surface changes and metal release. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 4, p. 1015–1033, 1 abr. 2013.

HEISE, K. *et al.* Low-molecular-weight sulfonated chitosan as template for anticoagulant nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 4881–4894, 30 ago. 2018.

HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Recent Developments in Hydrogels. v. 54, n. 1, p. 13–36, 17 jan. 2002.

HØL, P. J.; GJERDET, N. R.; JONUNG, T. Corrosion and metal release from overlapping arterial stents under mechanical and electrochemical stress – An experimental study. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 93, p. 31–35, maio 2019.

HOVEN, V. P. *et al.* Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 44–53, 1 mar. 2007.

HU, P. *et al.* Modulating the properties of flow-assembled chitosan membranes in microfluidics with glutaraldehyde crosslinking. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 12, p. 2519–2529, 25 mar. 2020.

HUANG, Q. *et al.* Reduced platelet adhesion and improved corrosion resistance of superhydrophobic TiO₂-nanotube-coated 316L stainless steel. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 125, p. 134–141, 1 jan. 2015.

HUANG, R. *et al.* Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 6, p. 483–489, 14 mar. 2003.

IMRAN, MOHD. *et al.* Synthesis, characterization, and anticoagulant activity of chitosan derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 1, p. 25–32, 1 jan. 2020.

IQBAL, J.; GUNN, J.; SERRUYS, P. W. Coronary stents: historical development, current status and future directions. **British Medical Bulletin**, v. 106, p. 193–211, 2013.

JAFARI, S. *et al.* Biomedical Applications of TiO₂ Nanostructures: Recent Advances. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 3447–3470, 14 maio 2020.

JAFFER, I. H. *et al.* medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, n. S1, p. S72–S81, 2015.

Ji, X. *et al.* Influence of glutaraldehyde on the performance of a lignosulfonate/chitosan-based medium density fiberboard adhesive. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 7, p. 45870, 2018.

KERCH, G. *et al.* Heparin-like polyelectrolyte multilayer coatings based on fungal sulfated chitosan decrease platelet adhesion due to the increased hydration and reduced stiffness. v. 1, p. 4, 2017.

KILDEEVA, N. R. *et al.* About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 360–369, 1 maio 2009.

KLEINEDLER, J. J. *et al.* Novel nanocomposite stent coating releasing resveratrol and quercetin reduces neointimal hyperplasia and promotes re-endothelialization. **Journal of Controlled Release**, v. 159, n. 1, p. 27–33, 10 abr. 2012.

KLOK, O.; IGUAL MUNOZ, A.; MISCHLER, S. An Overview of Serum Albumin Interactions with Biomedical Alloys. **Materials**, v. 13, n. 21, p. 4858, jan. 2020.

KOCABAY, S. *et al.* Chemical and biological characterization of sulfated chitosan oligomer as heparin mimics. **Polymers and Polymer Composites**, v. 29, n. 9_suppl, p. S1023–S1032, 1 nov. 2021.

KOHRI, M. *et al.* Size control of polydopamine nodules formed on polystyrene particles during dopamine polymerization with carboxylic acid-containing compounds for the fabrication of raspberry-like particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 449, p. 114–120, 1 maio 2014.

KONG, M. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, p. 51–63, 1 out. 2010.

KORNOWSKI, R. *et al.* In-Stent Restenosis: Contributions of Inflammatory Responses and Arterial Injury to Neointimal Hyperplasia. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 224–230, jan. 1998.

KUBO, T. *et al.* Comparison of vascular response after sirolimus-eluting stent implantation between patients with unstable and stable angina pectoris: a serial optical coherence tomography study. **JACC. Cardiovascular imaging**, v. 1, n. 4, p. 475–484, jul. 2008.

LAMMER, J. *et al.* Heparin-bonded covered stents versus bare-metal stents for complex femoropopliteal artery lesions: the randomized VIASTAR trial (Viabahn endoprosthesis with PROPATEN bioactive surface [VIA] versus bare nitinol stent in the treatment of long lesions in superficial femoral artery occlusive disease). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 15, p. 1320–1327, 8 out. 2013.

LAN, G. *et al.* Improvement of platelet aggregation and rapid induction of hemostasis in chitosan dressing using silver nanoparticles. **Cellulose**, v. 27, n. 1, p. 385–400, jan. 2020.

LI, J. *et al.* Polydopamine-assisted decoration of TiO₂ nanotube arrays with enzyme to construct a novel photoelectrochemical sensing platform. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, p. 133–139, 1 fev. 2018.

LIANG, W. *et al.* Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 776–785, 30 jan. 2014.

LIAO, H. *et al.* Improved cellular response on multiwalled carbon nanotube-incorporated electrospun polyvinyl alcohol/chitosan nanofibrous scaffolds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 528–535, 1 jun. 2011.

LIVINGSTON, M.; TAN, A. Coating Techniques and Release Kinetics of Drug-Eluting

Stents. **Journal of medical devices**, v. 10, n. 1, p. 10.1115/1.4031718, 4 maio 2019.

LUZ, P. L. DA *et al.* Endotélio e doenças cardiovasculares: biologia vascular e síndromes clínicas. **Endotélio e doenças cardiovasculares: biologia vascular e síndromes clínicas**, p. 767–767, 2016.

MA, B. *et al.* A comparative study on the chitosan membranes prepared from glycine hydrochloride and acetic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 477–482, 16 jan. 2013.

MAHADEVAN, K.; COSGROVE, C.; STRANGE, J. W. Factors Influencing Stent Failure in Chronic Total Occlusion Coronary Intervention. **Interventional Cardiology: Reviews, Research, Resources**, v. 16, p. e27, 12 out. 2021.

MANIK, E. R.; KABAN, J. Synthesis of Sulfated Chitosan Through Sulfation Reaction of Chitosan with Chlorosulfonic Acid in N, N-Dimethylformamide, and Antibacterial Activity Test. **Journal of Chemical Natural Resources**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 26 ago. 2022.

MANIVASAGAM, V. *et al.* Surface modification strategies to improve titanium hemocompatibility: a comprehensive review. **Materials Advances**, v. 2, n. 18, p. 5824–5842, 2021.

MANIVASAGAM, V. K.; POPAT, K. C. In Vitro Investigation of Hemocompatibility of Hydrothermally Treated Titanium and Titanium Alloy Surfaces. **ACS Omega**, v. 5, n. 14, p. 8108–8120, 14 abr. 2020.

MEHRAN, R. *et al.* Safety of an Aspirin-Alone Regimen After Intracoronary Stenting With a Heparin-Coated Stent. **Circulation**, v. 108, n. 9, p. 1078–1083, 2 set. 2003.

MIRJALILI, A.; ZAMANIAN, A.; HADAVI, M. M. TiO₂ nanotubes-polydopamine-silver composites for long-term antibacterial properties: preparation and characterization. **Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications**, v. 31, n. 03, p. 1950023, 7 maio 2019.

MITTAL, H. *et al.* Recent progress in the structural modification of chitosan for applications in diversified biomedical fields. **European Polymer Journal**, v. 109, p. 402–434, 1 dez. 2018.

MONTGOMERIE, Z.; POPAT, K. C. Improved hemocompatibility and reduced bacterial adhesion on superhydrophobic titania nanoflower surfaces. **Materials Science and Engineering: C**, v. 119, p. 111503, fev. 2021.

MORAES, A. F. Quitosana sulfatada: caracterização e estudo da hemocompatibilidade. 2016.

MORAES, A. F. *et al.* Hemocompatibility of 2- N -3,6- O -sulfated chitosan films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 9, p. 47128, 5 mar. 2019.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for Alternatives to Heparin: Sulfated Fucans from Marine Invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 225–232, 1 nov. 1999.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, n. 6, p. 1013–1051, 1 jun. 2008.

- NAGASAWA, K. *et al.* Reaction between carbohydrates and sulfuric acid: Part I. Depolymerization and sulfation of polysaccharides by sulfuric acid. **Carbohydrate Research**, v. 18, n. 1, p. 95–102, 1 maio 1971.
- NAM, J. A. *et al.* Successful stabilization of functionalized hybrid graphene for high-performance antimicrobial activity. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7996–8003, 1 ago. 2013.
- NEGM, N. A. *et al.* Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 681–702, 2020.
- NETO, C. G. T. *et al.* Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 2, p. 97–103, 10 nov. 2005.
- OKAMOTO, Y. *et al.* Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 3, p. 337–342, 15 ago. 2003.
- OUERGHEMMI, S. *et al.* Synthesis and characterization of polyampholytic aryl-sulfonated chitosans and their in vitro anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p. 8–17, 15 set. 2018.
- PAN, C. *et al.* Preparation of chitosan-Zn²⁺ complex coating on polydopamine-modified TiO₂ nanotubes to enhance osteoblast behaviors. **Materials Letters**, v. 282, p. 128665, 1 jan. 2021.
- PENG, B. L. *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. 1191–1206, 2011.
- PEREIRA JÚNIOR, A. Caracterização microestrutural e mecânica da liga Ti10Mo8Nb6Zr para aplicações biomédicas. 22 fev. 2019.
- PINHO, R. A. DE *et al.* Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arq. bras. cardiol**, p. 549–555, 2010.
- PINTO, R. V. *et al.* Glutaraldehyde-crosslinking chitosan scaffolds reinforced with calcium phosphate spray-dried granules for bone tissue applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 109, p. 110557, 1 abr. 2020.
- POON, L.; WILSON, L. D.; HEADLEY, J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 92–101, 30 ago. 2014.
- QIU, T. *et al.* Development of 3D-Printed Sulfated Chitosan Modified Bioresorbable Stents for Coronary Artery Disease. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 462, 19 maio 2020.
- QIU, Y. *et al.* Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 40, p. 14430–14435, 7 out. 2014.
- Que stent escolher? - MedicalExpo.** Disponível em:

<<https://guide.medicaexpo.com/pt/como-escolher-um-stent/>>. Acesso em: 14 maio. 2023.

RAKHMANOVA, V. N. *et al.* Determination of the degree of sulfation of bombyx mori chitosan by conductometric titration. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 82, n. 12, p. 2192–2196, 2009.

RAMOS-TONELLO, C. M. *et al.* Titanium dioxide nanotubes addition to self-adhesive resin cement: Effect on physical and biological properties. **Dental Materials**, v. 33, n. 7, p. 866–875, 1 jul. 2017.

RENGIER, F. *et al.* In vitro validation of flow measurements in an aortic nitinol stent graft by velocity-encoded MRI. **European journal of radiology**, v. 80, p. 163–7, 1 set. 2010.

ROCHA NETO, J. B. M. *et al.* Polysaccharide-based layer-by-layer nanoarchitectonics with sulfated chitosan for tuning anti-thrombogenic properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 213, p. 112359, 1 maio 2022.

ROSA, J. L. *et al.* Wettability behavior of nanotubular TiO₂ intended for biomedical applications. **Archives of Health Investigation**, 31 dez. 2014.

SAIDIN, S. *et al.* Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilisation on metallic biomaterials surface. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4715–4724, 1 dez. 2013.

SALIMI, E. *et al.* Current Approaches in Improving Hemocompatibility of Polymeric Membranes for Biomedical Application. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 301, n. 7, p. 771–800, 2016.

SHAGDAROVA, B. *et al.* Neutralization of anticoagulant activity of heparin by N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chloride derivatives of chitosan. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, p. 445–451, 1 jul. 2016.

SHANMUGAM, M.; MODY, K. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Curr Sci**, v. 79, 30 nov. 1999.

SHELMA, R.; SHARMA, C. P. Development of lauroyl sulfated chitosan for enhancing hemocompatibility of chitosan. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 561–570, 1 jun. 2011.

SILVERTHORN, D. U. **Human Physiology: An Integrated Approach**. [s.l.] Pearson, 2019. v. 8th Edition

SKORIK, Y. A. *et al.* Synthesis of N-succinyl- and N-glutaryl-chitosan derivatives and their antioxidant, antiplatelet, and anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 166–172, 15 jun. 2017.

SOLACI. **Aprisionar a corda no ramo lateral para prevenir oclusão após o implante do stent no vaso principal: devemos proceder assim rotineiramente?** SOLACI, 29 mar. 2022. Disponível em: <<https://solaci.org/pt/2022/03/29/aprisionar-a-corda-no-ramo-lateral-para-prevenir-occlusao-apos-o-implante-do-stent-no-vaso-principal-devemos-proceder-assim-rotineiramente/>>. Acesso em: 4 mar. 2023

SOLARI, F.; VARACALLO, M. Low Molecular Weight Heparin (LMWH). Em: **StatPearls [Internet]**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2022.

SPRIANO, S. *et al.* Surface properties and cell response of low metal ion release Ti-6Al-7Nb alloy after multi-step chemical and thermal treatments. **Biomaterials**, v. 26, n. 11, p. 1219–1229, 1 abr. 2005.

TAYLOR, S. L. *et al.* By-Products of Heparin Production Provide a Diverse Source of Heparin-like and Heparan Sulfate Glycosaminoglycans. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2679, 25 fev. 2019.

TEGART, W. J. M. **The Electrolytic and Chemical Polishing of Metals in Research and Industry**. [s.l.] Pergamon Press, 1956.

TOMAIUOLO, M. *et al.* Use of electron microscopy to study platelets and thrombi. **Platelets**, v. 31, n. 5, p. 580–588, 3 jul. 2020.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 711–716, 11 fev. 2010.

VAINA, S.; ONG, A. T. L.; SERRUYS, P. W. Chapter 8 - Drug-eluting stents. Em: NORELL, M. S. *et al.* (Eds.). **Essential Interventional Cardiology (Second Edition)**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2008. p. 83–99.

VAZ, J. M. *et al.* Antibacterial Coatings Based on Chitosan for Pharmaceutical and Biomedical Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 8, p. 866–885, 28 fev. 2018.

VERMA, M. L. *et al.* Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 2, p. 315–323, 1 mar. 2020.

VISHWAKARMA, V. *et al.* Bacterial Adhesion and Hemocompatibility Behavior of TiN, TiO₂ Single and TiN/TiO₂ Multilayer Coated 316L SS for Bioimplants. **Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering**, v. 25, p. 73–82, 2015.

WANG, Y.; ZHITOMIRSKY, I. Bio-inspired catechol chemistry for electrophoretic nanotechnology of oxide films. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 380, n. 1, p. 8–15, 15 ago. 2012.

WEITZ, D. S.; WEITZ, J. I. Update on heparin: what do we need to know? **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 29, n. 2, p. 199–207, 1 fev. 2010.

WU, D. *et al.* A novel proton-conductive membrane with reduced methanol permeability prepared from bromomethylated poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide) (BPPO). **Journal of Membrane Science**, v. 310, n. 1, p. 522–530, 5 mar. 2008.

XING, R. *et al.* Preparation of low-molecular-weight and high-sulfate-content chitosans under microwave radiation and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2515–2519, 20 out. 2004.

- XING, R. *et al.* Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 1387–1392, 15 fev. 2005.
- XU, C. *et al.* Immunostimulatory effect of N-2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan-sulfate chitosan complex nanoparticles on dendritic cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117098, 1 jan. 2021.
- XU, W. *et al.* Accelerated corrosion of 316L stainless steel in simulated body fluids in the presence of H₂O₂ and albumin. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 11–19, 1 nov. 2018.
- XU, X. R. *et al.* Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 53, n. 6, p. 409–430, dez. 2016.
- YANG, J. *et al.* The structure-anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide: effect of carboxyl group and position of sulfation. **International journal of biological macromolecules**, v. 36, n. 1–2, p. 9–15, 1 jul. 2005.
- YANG, Y. *et al.* Immunostimulatory effects of sulfated chitosans on RAW 264.7 mouse macrophages via the activation of PI3K/Akt signaling pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1310–1321, 1 mar. 2018.
- YU, J. Y. *et al.* Antiplatelet and antithrombotic activities of Korean Red Ginseng. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 10, p. 898–903, out. 2006.
- YUTANI, C. *et al.* Histologic Evidence of Foreign Body Granulation Tissue and de novo Lesions in Patients with Coronary Stent Restenosis. **Cardiology**, v. 92, n. 3, p. 171–177, 1999.
- ZHANG, J. *et al.* Systematically evaluate the physicochemical property and hemocompatibility of phase dependent TiO₂ on medical pure titanium. **Surface and Coatings Technology**, v. 404, p. 126501, 25 dez. 2020.
- ZHANG, X.; SUN, J. Synthesis, Characterization, and Properties of Sulfonated Chitosan for Protein Adsorption. **International Journal of Polymer Science**, v. 2020, p. e9876408, 7 set. 2020.
- ZHAO, P.; METCALF, M.; BUNNETT, N. W. Biased Signaling of Protease-Activated Receptors. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, 2014.
- ZHOU, H. *et al.* Enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 with low dose of 2-N, 6-O-sulfated chitosan in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 30, n. 9, p. 1715–1724, 1 mar. 2009.
- ZIA, A.; O'BRIEN, S. H. Global coagulation assays: a clinical perspective. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 39, n. 1, p. 89–94, jan. 2015.