



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

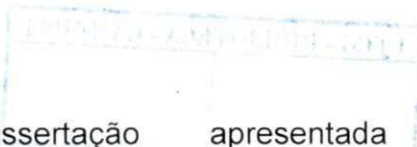
ROSSANA SEIXAS MAIA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS DE
QUITOSANA/GELATINA/HEPARINA**

**Campina Grande
2013**

ROSSANA SEIXAS MAIA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS DE
QUITOSANA/GELATINA/HEPARINA**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Polímeros, como exigência final para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

**Campina Grande
2013**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

S586d Silva, Rossana Seixas Maia da.
Desenvolvimento e avaliação de membranas de
quitosana/gelatina/heparina / Rossana Seixas Maia da Silva. -- 2013.
62 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado Ciência e Engenharia de Materiais) -
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".
Referências.

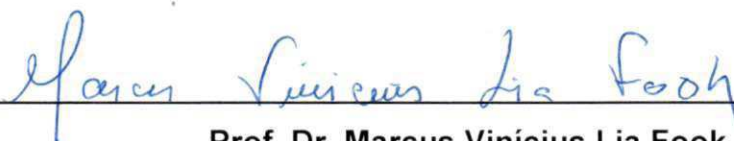
1. Heparina. 2. Gelatina. 3. Quitosana. 4. Membranas. 5. Biomateriais.
I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Título.

CDU 577.114.4 (043)

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS DE
QUITOSANA/GELATINA/HEPARINA**

ROSSANA SEIXAS MAIA DA SILVA

Dissertação aprovada em 23 de agosto de 2013 pela banca constituída pelos seguintes membros:



**Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
(Orientador - UFCG)**



**Profª Drª. Maria Roberta de Oliveira Pinto
(Examinadora Externa - UEPB)**



**Profª Drª. Rosemary Sousa Cunha Lima
(Examinadora Externa - UEPB)**

**Campina Grande
2013**

Aos meus pais, João
Augusto (in memoriam)
e Simone, por terem
sempre me estimulado
nos estudos, Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado inteligência.

Agradeço aos meus pais, João Augusto (*in memoriam*) e Simone, que sempre me incentivaram e apoiaram nos estudos.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, pela dedicação e paciência dispensadas.

Agradeço a Rossemberg Cardoso Barbosa, que esteve comigo nesta jornada, e me trouxe grandes contribuições, com sua paciência e seus pensamentos positivos.

Agradeço a Juliana, Paulo, Leonardo e a Maria do Carmo pela ajuda desempenhada.

Agradeço a Maria Eunice da Cruz, e Severino Lourenço, pelo companheirismo ao longo da jornada.

Agradeço ao CERTBIO.

Agradeço a Associação Médica da Paraíba.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

RESUMO

A heparina é um polissacarídeo que pertence à família dos glicosaminoglicanos, polianiónico de ocorrência natural. É um dos mais potentes anticoagulantes conhecidos, sendo amplamente utilizada na terapêutica de diversas doenças e alterações hematológicas. Dentre as desvantagens do tratamento com a heparina, tem-se a administração somente por via parenteral, devido a mesma ser degradada, quando administrada por via oral. A obtenção de uma blenda de quitosana/gelatina/heparina pode ser uma alternativa viável para outras formas de administração da heparina, pois tanto a quitosana quanto a gelatina poderá ser um carreador do fármaco até a corrente sanguínea, pois a gelatina, além de ser um carreador irá facilitar a homogeneização da heparina na solução de quitosana sem que haja precipitação macroscópica das mesmas. Desta forma, este trabalho teve o objetivo de desenvolver e avaliar membranas de quitosana/gelatina/heparina. As membranas de quitosana e gelatina com heparina nas proporções de 20 mg e 40 mg foram preparadas pelo método de evaporação de solvente e divididas em dois grupos, um neutralizado pelo hidróxido de amônia e outro neutralizado por hidróxido de sódio. Todas as membranas foram caracterizadas por DRX, FTIR, MEV, EDS, Tensão Superficial por Ângulo de Contato, Ensaio de Intumescimento e Ensaio de Biodegradação. Baseado nos resultados pode-se concluir que a interação entre a quitosana, gelatina e a heparina foi efetiva. No entanto, ocorreu diminuição significativa da heparina do grupo neutralizado com NaOH, isto, possivelmente, devido ao arraste do fármaco durante a lavagem das membranas com água destilada.

Palavras-chave: Heparina; gelatina; quitosana; membranas; biomateriais.

ABSTRACT

Heparin is a polyanionic polysaccharide that occurs naturally and belongs to the group of the glycosaminoglycan. It is one of the most powerful anticoagulants of which mankind has knowledge, taking part in the treatment of several diseases and hematological alterations. One of the disadvantages of heparin, though, is the fact that it is severely degraded when taken orally and therefore it is better introduced via a route other than the mouth. A possible solution to this problem involves a chitosan/gelatine/heparin blend, provided that both the chitosan and the gelatine manage to deliver the heparin all the way to the blood flow, not to mention that the gelatine plays an important role in the process of homogenizing the chitosan/heparin mixture – with no precipitation. The project's main goal was to develop and study chitosan/gelatine/heparin membranes. The membranes with 20mg and 40mg of heparin were prepared by means of evaporation of the solvent and they were divided in two groups: The first one was neutralized by the ammonium hydroxide and the second one, by the sodium hydroxide. Each one of them was submitted to the following characterization techniques: XRD, FTIR, SEM, DES, Wetting Test, swelling test and biodegradation tests. In light of the obtained results, it was concluded that the relation between chitosan, heparin and gelatin was effective. However, a significant decrease of the heparin in the second group was noticed, and that was possibly due to the transport of medicine while the membranes were being cleaned with distilled water.

Keywords: Heparin, gelatine, chitosan, membranes, biomaterials.

Livros Publicados

CAMPOS, J. Q.; FERNANDEZ, J. A. R.; SOUZA, J. D. A.; CAMPOS, M. L.; SILVA, R. S. M. da. A comunicação na educação sanitária. São Paulo: Jotacê, 1993. 160p.

SILVA, R. S. M. da. Pequeno atlas de fotomicrografias histológicas. João Pessoa: Editora Universitária, 2002. 128p.

SILVA, S. S. M. da; SILVA, R. S. M. da. Parasitologia: estudo dirigido. João Pessoa: Livro rápido, 2005. 171p.

PEREIRA, G.; SILVA, R. S. M. da. Cabelos: aprendendo e praticando. João Pessoa: JRC Gráfica e Editora, 2012. 145p.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – adenosina difosfato

CERTBIO – Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais

cm – centímetros

HBPM – heparina de baixo peso molecular

MRI – ressonância magnética por imagem

SPT – síndrome pós trombótica

TEP/ TP - tromboembolismo pulmonar

TEV – tromboembolismo venoso

TVP – trombose venosa profunda

pH – potencial hidrogeniônico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação do trombo na circulação sanguínea.....	20
Figura 2 – Liberação e migração de um coágulo pela circulação sanguínea....	21
Figura 3 - Representação da estrutura química da heparina.....	25
Figura 4 – Comparação das estruturas moleculares da Quitina e Quitosana....	31
Figura 5 – Unidade básica das cadeias de gelatina.....	34
Figura 6 – Fluxograma de preparação das membranas.....	41
Figura 7 – Difração de raios X do pó da gelatina (G) e das membranas quitosana com gelatina e a heparina.....	44
Figura 8 – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da gelatina (G) e das membranas quitosana com gelatina e a heparina.....	46
Figura 9 – Microscopia Eletrônica das membranas de quitosana com gelatina e heparina: a) Q:G:2F; b) Q:G:2F NaOH; c) Q:G:4F; e d) Q:G:4F NaOH.....	48
Figura 10 – Espectroscopia de Energia Dispersiva das membranas de quitosana com gelatina e heparina: a) Q:G:2F; b) Q:G:2F NaOH; c) Q:G:4F; e d) Q:G:4F NaOH.....	49
Figura 11 – Tensão Superficial por Medidas do Ângulo de Contato das membranas quitosana com gelatina e a heparina.....	50
Figura 12 – Ensaio de Intumescimento das membranas quitosana com gelatina e a heparina.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores de riscos para ocorrência de tromboembolia.....	22
Tabela 2: Doses de tratamento das heparinas de baixo peso molecular, comercialmente disponíveis no Brasil.....	27
Tabela 3: Perda percentual de massa das membranas submetidas a ensaios de biodegradação e respectivos desvios padrão.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Sistema Circulatório	17
3.2 Coagulação Sanguínea	18
3.2.1 <i>Distúrbio da Coagulação Sanguínea</i>	20
3.3 Tromboembolismo Venoso	21
3.3.1 <i>Formas de diagnóstico da TEV</i>	22
3.3.2 <i>Formas de tratamento do Tromboembolismo Venoso</i>	23
3.4 Heparina	24
3.4.1 <i>Heparina de baixo peso molecular</i>	26
3.5 Biomateriais	27
3.6 Quitina e Quitosana	30
3.6.1 <i>Propriedades biológicas da Quitosana</i>	31
3.7 Gelatina	34
3.7.1 <i>Modificação da Gelatina</i>	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 <i>Locais da pesquisa</i>	38
4.2 Materiais	38
4.3 Métodos	39
4.3.1 <i>Preparo das membranas de quitosana</i>	39
4.3.2 <i>Incorporação da heparina de baixo peso molecular nas membranas de quitosana</i>	40
4.4 Caracterização	41
4.4.1 <i>Difração de raios X</i>	41
4.4.2 <i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier</i>	41
4.4.3 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	42
4.4.4 <i>Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios X</i>	42
4.4.5 <i>Tensão Superficial por Medidas de Ângulo de Contato</i>	42

4.4.6 Ensaio de Intumescimento.....	43
4.4.7 Ensaio de Biodegradação.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Difração de raios X.....	44
5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier.....	45
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
5.4 Energia Dispersiva de raios X.....	49
5.5 Tensão Superficial por Medida de Ângulo de Contato.....	49
5.6 Ensaio de Intumescimento.....	51
5.7 Ensaio de Biodegradação.....	53
6 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida e o consequente envelhecimento populacional, doenças crônicas degenerativas têm figurado como a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo. São os chamados agravos não transmissíveis, que incluem doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, câncer e doenças respiratórias. Aproximadamente 50% dos pacientes portadores de doenças crônicas degenerativas não obtêm um benefício clínico, devido à baixa aderência aos tratamentos medicamentosos e, principalmente, por não assumirem as mudanças de estilo de vida necessárias. O ato de não atingir as metas terapêuticas estabelecidas está diretamente relacionado a um maior número de hospitalizações, surgimento de complicações de doenças, pior qualidade de vida e maiores custos com as doenças. Neste ponto diversas pesquisas têm sido desenvolvidas, no campo dos chamados biomateriais, para auxílio em tratamento desses agravos (SILVA 2006; OPAS, 2006).

Considera-se biomaterial, qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada no corpo por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido (WILLIAM, 1998).

Dentre os pré-requisitos, os biomateriais não devem produzir respostas biológicas adversas, nem serem tóxicos, carcinogênicos, antigênicos, mutagênicos ou trombogênicos (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008).

A utilização dos polímeros como biomateriais tem aumentado muito nos últimos anos, principalmente na substituição de tecidos, no preparo de membranas para liberação controlada de fármacos, entre outros. Os polímeros constituem uma fonte de possibilidades de aplicação na área da medicina e biomedicina, em virtude do seu fácil processamento e de se assemelharem aos materiais biológicos quanto as suas propriedades mecânicas (PARK, 1992; ORÉFICE, 2006). Dentre os polímeros utilizados como biomateriais, encontram-se os biopolímeros, que são os polímeros de origem animal (quitosana, colágeno) ou vegetal (celulose).

Dentre os biopolímeros destaca-se a quitosana, que é biocompatível, biodegradável e atóxica. Ela é derivada da quitina, um polissacarídeo

abundante na natureza. A quitosana tem sido utilizada para diversos fins, dentre eles, complexante de íons metálicos e matrizes de liberação controlada de fármacos (ASSIS; SILVA, 2003).

Outro polímero biodegradável muito utilizado como biomaterial é o colágeno que é capaz de promover cicatrização. Ele é uma proteína sintetizada por células do tecido conjuntivo denominado fibroblastos. No corpo humano o colágeno representa mais da metade da proteína total e 70% do peso seco da pele, além de ser o constituinte mais importante da matriz extracelular. O colágeno é encontrado na pele, cartilagens, osso e tendões, tendo como característica a formação de fibras insolúveis possuindo muita resistência elástica, controlando as diferentes intensidades de forças exercidas pelo organismo e de fundamental importância na constituição dos tecidos (SHOULDERS; RAINES, 2009).

A Interação entre a quitosana e o colágeno ocorre na maioria das vezes por forças eletrostáticas, entre os grupamentos $-NH_3^+$ da quitosana e os grupamentos $-COO^-$ do colágeno e em algumas situações essa interação pode ocorrer por ligações de hidrogênio (TARAVEL; DOMARD, 1995, TARAVEL; DOMARD, 1995a).

Diante do exposto, indivíduos acometidos por doenças crônicas (incuráveis) como é o caso do tromboembolismo Venoso e que necessitam de tratamento contínuo, por toda a vida, podem ser bastante beneficiados através do uso dos biomateriais utilizados como carreadores de fármacos (SANTOS, 2010).

O tratamento do tromboembolismo venoso envolve sucessivas aplicações subdérmicas com injeções diárias de heparina que é um polissacarídeo polianiônico sulfatado. Portanto um tratamento doloroso e frequente, apresentando desconforto e alta resistência por parte do paciente.

Diante do exposto, acredita-se que a produção de uma matriz polimérica composta por quitosana e gelatina, poderá ser uma alternativa para obtenção de uma base carreadora de heparina e uma alternativa para substituição dos tratamentos convencionais do tromboembolismo Venoso.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar membranas de quitosana/gelatina/heparina como possível alternativa para substituição dos tratamentos convencionais do tromboembolismo Venoso.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma metodologia para inclusão da heparina dentro de uma base polimérica biodegradável;
- Desenvolver membranas de quitosana/gelatina/heparina;
- Avaliar físico-quimicamente e morfologicamente todas as membranas;
- Estudar a molhabilidade o grau de Intumescimento das mesmas;
- Avaliar a biodegradação das membranas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistema Circulatório

O sistema circulatório é composto pelo coração, os vasos sanguíneos e do sangue. O coração é uma bomba muscular e seus batimentos regulares enviam sangue por tubos elásticos resistentes, denominados artérias, que se ramificam em vasos menores e transportam sangue rico em oxigênio para todo o corpo (PARKER, 2007).

Conforme o autor supracitado, um suprimento sanguíneo constante e adequado é essencial para tecidos saudáveis. Se um bloqueio ocorrer num vaso sanguíneo, os tecidos a sua frente podem ser privados de oxigênio, causando lesão do tecido ou, em casos mais grave sua morte. O coração também pode ser afetado. O bloqueio parcial ou total de uma artéria ou veia, ou mesmo do coração, pode ocorrer quando um coágulo sanguíneo (trombo) se forma em decorrência de um problema circulatório.

O coração possui os ventrículos direito e esquerdo que funcionam como bombas em série, ejetando sangue através de dois sistemas vasculares, a circulação pulmonar de baixa pressão, onde ocorre a troca gasosa (captação de oxigênio e liberação de gás carbônico pela hemoglobina circulante nas hemácias), e a circulação sistêmica que distribui sangue aos órgãos individuais, suprindo as suas demandas metabólicas, o fluxo de sangue, assim como a pressão sanguínea, são controlados pelo sistema nervoso autônomo (NETO, 2010).

Dependendo do tecido ou órgão que esta sendo vascularizado, o sistema cardiovascular tem muitas funções diferentes, tendo como função principal a transferência de oxigênio e gás carbônico entre os pulmões e os tecidos periféricos. O sistema cardiovascular, também é fundamental na distribuição dos líquidos nos diversos compartimentos extracelulares, na distribuição de hormônios nos órgãos alvo e no transporte de células e substâncias essenciais para a imunidade e coagulação sanguínea (NETO, 2010).

3.2 Coagulação Sanguínea

O sistema de coagulação é responsável pela fluidez do sangue e, em condições normais os processos de anticoagulação e coagulação protegem o indivíduo de eventos hemorrágicos e tromboembólicos. Mais de cinquenta substâncias estão envolvidas no processo de coagulação sanguínea, algumas promovendo a coagulação, as pró-coagulantes e outras inibindo a coagulação, as chamadas anticoagulantes. Na circulação sanguínea, predominam as substâncias anticoagulantes de modo que o sangue não coagula enquanto está circulando nos vasos. Quando um vaso é rompido, os pró-coagulantes são ativados para formarem coágulo (HIRSH; RASCHKE, 2004).

De acordo com Bermudez (2012), dentre as substâncias que vão interferir na coagulação, existem substâncias antiplaquetárias (inibem a agregação plaquetária), substâncias que interferem efetivamente na coagulação (heparina) e substâncias que degradam o trombo (fibrinolíticos ou trombolíticos).

Para a manutenção da circulação normal é necessário que o endotélio, ou seja, a parte mais interna de um vaso sanguíneo, aquela que está em contato com o sangue, esteja em sua forma íntegra. O endotélio possui cargas negativas, mantendo as plaquetas sem muito atrito com ele. O endotélio também mantém o fluxo sanguíneo sob a forma laminar, logo toda vez que se tem alteração do endotélio tem-se a conversão do fluxo sanguíneo laminar para o fluxo turbilhonar, e a lesão do endotélio vai expor tecidos subendoteliais que estão envolvidos na ativação da agregação das plaquetas. Além de sua estrutura normal, o endotélio também libera substâncias que são capazes de impedir a agregação plaquetária, diminuindo a atividade dos fatores da coagulação, sendo que um dos principais inibidores da coagulação secretado pelo endotélio é o ativador de plasminogênio, que durante a cascata da coagulação, é convertido em plasmina, que é o principal fibrinolítico secretado fisiologicamente, ou seja, é a principal substância que degrada efetivamente o trombo (BERMUDEZ 2012).

As plaquetas são os ativadores primários da coagulação sanguínea, e sua adesão pode ocorrer devido à turbulência do fluxo sanguíneo, que ocorre quando há uma grande envergadura em um vaso, ou quando a pressão arterial é muito alta ou quando o fluxo sanguíneo é muito grande, porém o fator mais importante para o turbilhonamento do fluxo é a presença de uma placa de ateroma no vaso.

Tudo que gera a conversão do fluxo é a presença de uma placa de ateroma no vaso. Tudo que gera a conversão do fluxo laminar para o turbilhonar causa a ativação da agregação plaquetária. Isso é importante porque atualmente tem-se antiplaquetários já utilizados clinicamente nos receptores de adenosina difosfato (ADP) nas plaquetas. O ADP pode ser proveniente ou de eritrócitos de tecidos epiteliais, ou de grânulos citoplasmáticos presentes no endotélio. O tromboxano, liberado pelas próprias plaquetas, é capaz de ativar a agregação plaquetária, uma vez que é um vasoconstrictor, o que gera uma maior facilidade para que ocorra a agregação plaquetária (BERMUDEZ 2012).

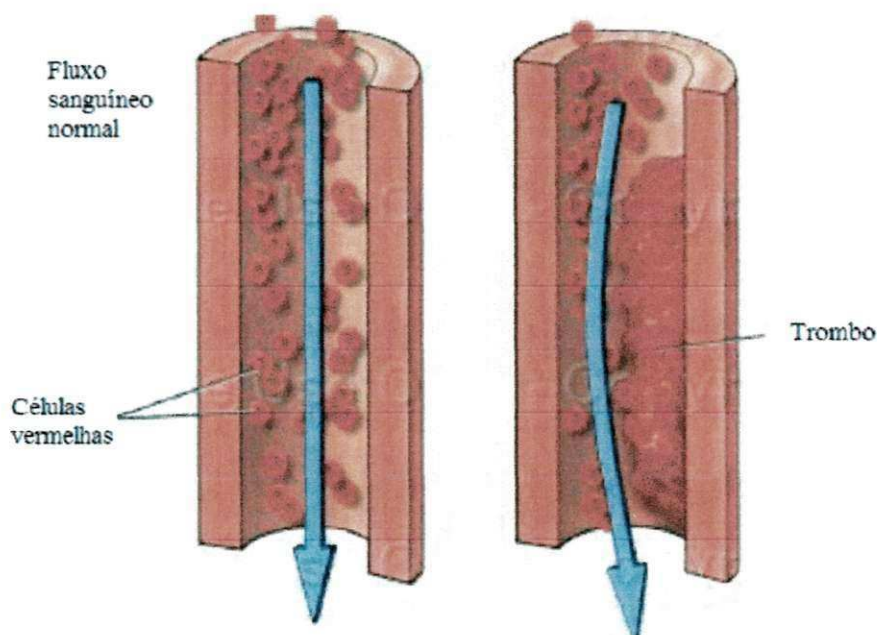
O coágulo é formado porque o fibrinogênio é convertido em monômeros de fibrina insolúvel que se ligam por meio de ligações covalentes. À medida que o tempo vai passando essas ligações entre os monômeros da fibrina insolúvel vão se tornando mais fortes na presença do cofator XIII, para que se tenha a formação da fibrina estável. Para haver a formação da fibrina temos uma série de etapas, logo, têm-se duas maneiras de ativar a cascata de coagulação: a via extrínseca e a via intrínseca. A ativação da via extrínseca ocorre pela exposição ou liberação de fatores do tecido lesado, sendo o mais importante deles a tromboplastina. Esses fatores teciduais vão ativar o fator VII, que significa o início da ativação da cascata de coagulação. O fator VII vai converter o fator X em fator Xa, que vai converter a protrombina em trombina, que é quem vai converter o fibrinogênio em fibrina, e, portanto a via extrínseca é ativada pela liberação de fatores extrínsecos ao sangue, que são liberados pelo tecido lesado.

A via intrínseca é ativada à medida que o sangue é exposto a uma superfície diferente do normal. O endotélio lesado permite a exposição do sangue a uma superfície que não é a normal, e, portanto a ativação da cascata da coagulação tendo a ativação de diversos fatores, que a partir da conversão do fator IX em fator X chega novamente na conversão da proteína solúvel do plasma, o fibrinogênio, em um polímero insolúvel, a fibrina, pela ação de uma enzima denominada de trombina (RUGGERI, 2003).

3.2.1 Distúrbios na coagulação sanguínea

Quando um coágulo anormal se forma no vaso sanguíneo recebe a denominação de trombo. Os trombos são compostos por fibrina e elementos figurados do sangue e podem se formar no sistema arterial, venoso, coração e na microcirculação. Os arteriais formam-se num sistema de alta pressão e fluxo e compõem-se, principalmente, de plaquetas e fibrina. Os venosos formam-se em áreas de estase, são ricos em hemácias, fibrina e pobre em plaquetas. A ativação da cascata da coagulação é o mecanismo principal da patogênese da trombose venosa profunda (TVP) (SCHREIJER; REITSM; CANNEGIETER, 2010; SANTANA, 2006; RUGGERI, 2003). Na Figura 3 observa-se o processo de formação do trombo.

Figura 1: Formação do trombo na circulação sanguínea.

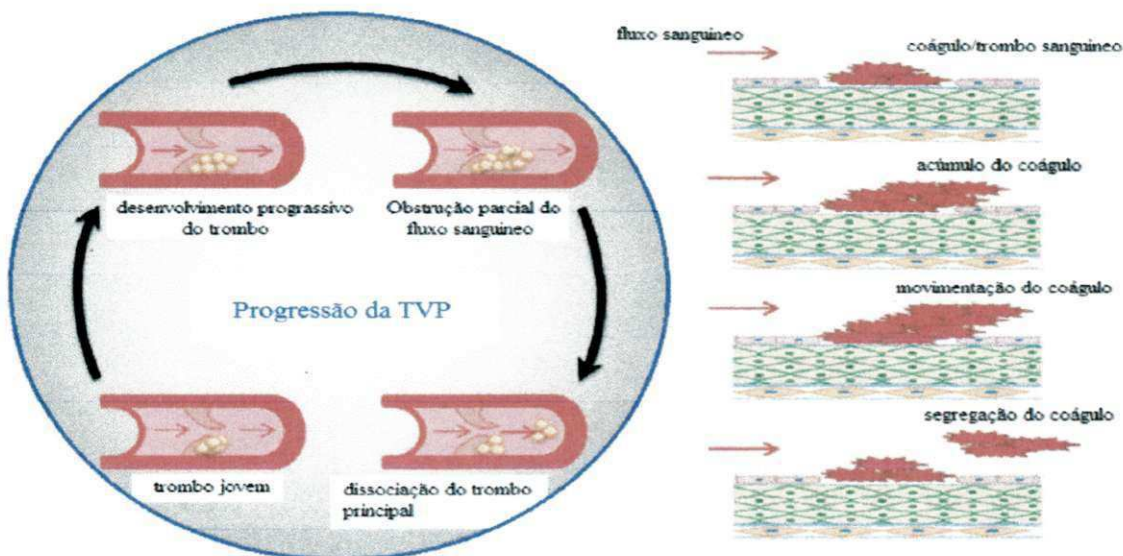


Fonte: SANTANA, 2006.

A maioria dos trombos dos membros inferiores localiza-se nos vasos distais (abaixo da veia poplítea), porém, podem se propagar para os segmentos proximais (veia poplítea, femoral, ilíaca, cava). Os principais sinais e sintomas de TVP são: os inflamatórios da parede do vaso, edema pela estase venosa e os embólicos pela fragmentação do trombo (LANDEFELD, 2008; SANTANA, 2006; TOVEY; WYATT 2003).

O trombo pode se desenvolver em qualquer lugar dentro do sistema venoso, mas na maioria geralmente surge nas veias profundas das pernas por meio da interação de três fatores: dano na parede dos vasos; estase venosa e hipercoagulabilidade. O dano direto nas veias ajuda a explicar a propensão à TVP depois de uma cirurgia ortopédica. Os leucócitos se prendem às células endoteliais ativadas e expressam o fator tecidual, enquanto que as plaquetas se tornam ativadas e se agregam. Doenças congênitas ou adquiridas associadas com hipercoagulabilidade promovem a coagulação nestes lugares, aumentando o risco da trombose. Os sinais e os sintomas se desenvolvem quando há obstrução do fluxo venoso e inflamação na parede do vaso e no tecido perivascular. Os sintomas de tromboembolia pulmonar (TP) surgem quando os segmentos dos trombos se separam e migram para a circulação pulmonar, conforme indicado na Figura 2 (BASTES, 2007).

Figura 2: Liberação e migração de um coágulo (êmbolo) pela circulação sanguínea.



Fonte: WADAJKAR et al., 2012.

3.3 Tromboembolismo venoso

O Tromboembolismo Venoso (TEV) é o termo comumente empregado para designar Trombose Venosa Profunda (TVP) e Tromboembolismo pulmonar (TEP). Sendo uma condição resultante de um desequilíbrio do sistema de coagulação do

organismo, devido à formação de um coágulo sanguíneo (trombo) que perturba a circulação sanguínea normal (PARKER, 2007).

O tromboembolismo venoso é a causa de morte evitável mais comum no paciente hospitalizado. A indicação de profilaxia se baseia na alta frequência destas complicações e no fato da maioria dos pacientes ser assintomática ou cursar com sintomas inespecíficos. Algumas doenças ou condições representam um risco adicional para o desenvolvimento de complicações tromboembólicas, tanto em pacientes clínicos quanto cirúrgicos.

Na Tabela 1 são observados os fatores de risco para ocorrência de tromboembolias.

Tabela 1: fatores de risco para ocorrência de tromboembolias.

Abortamento recorrente	Obesidade
Acidente vascular cerebral isquêmico ou hemorrágico	Paresia ou paralisia de membros inferiores
Anticoncepcional hormonal	Puerpério (até 4 semanas)
Câncer	Quimioterapia
Cateter venoso central	Reposição hormonal
Doença inflamatória intestinal	Síndrome nefrótica
Doença pulmonar obstrutiva crônica	Tabagismo
Doença reumatológica ativa	TEV prévio
Insuficiência cardíaca classe funcional III ou IV	Antecedente familiar de trombose
Infarto agudo do miocárdio atual	Varizes / Insuficiência venosa periférica
Infecção	Internação em unidade de terapia intensiva
Insuficiência arterial periférica	Insuficiência respiratória

Fonte: CARDOSO, 2011.

3.3.1 Formas de diagnóstico do TEV

A detecção e avaliação de trombos envolvido em TVP é um passo crítico para determinar as opções de tratamento adequadas. Ambos, sorologia e diagnóstico por imagem podem ser utilizados para o diagnóstico da TVP. Atualmente, os marcadores sorológicos desempenham papéis limitados na previsão de TVP. No entanto, a descoberta de marcadores sorológicos sensíveis e específicos tem sido muito útil no diagnóstico da TVP. As moléculas conhecidas

como biomarcadores de plasma para TVP incluem teste D-dimer, P-selectina, o Fator VIII, a geração de trombina, citocinas inflamatórias, monômeros de fibrina e contagem leucócitos (HOU et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que o diagnóstico usando uma combinação teste D-dimer e ultrassonografia venosa têm sido bastante eficiente (HIRSH; LEE, 2002). Na maioria das vezes, uma estratégia algorítmica é usada para avaliar o quadro clínico e a probabilidade do TVP. O teste D-dimer é uma análise do produto da degradação da ligação cruzada da fibrina presente no trombo, frequentemente presentes em trombose venosa aguda (ADAM; KEY; GREENBERG, 2009; SCARVELIS; WELLS 2006).

Além de imagens por ultrassonografia, várias outras estratégias foram desenvolvidas para visualizar a formação de trombos, os quais pode-se citar: venografia - envolve a utilização de um transdutor de 4,5 MHz para a observação do trombo local pela injeção de um agente de contraste. A detecção do coágulo é baseada na observação do fluxo do sangue no interior da veia. Esta técnica tem sido usada por muito tempo em combinação com outras técnicas de diagnóstico e a Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI) - fornece alta resolução espacial e definição estrutural que ajuda na identificação eficaz imagem do trombo. MRI reforçada com contraste aumenta a eficácia da Imagiologia, na ausência de qualquer substância gasosa. Além disso, a ressonância magnética pode distinguir coágulos antigos e novos na presença do sinal de alta frequência, mas somente com trombose subaguda. No entanto, esta técnica tem baixa sensibilidade, no caso de baixas concentrações de marcadores moleculares (WIETHOFF et. al., 2010).

3.3.2 Formas de tratamento do Tromboembolismo Venoso

O primeiro ensaio clínico controlado para o tratamento da TVE foi realizado em 1960. Desde então, numerosos estudos de boa qualidade têm fornecido adequado embasamento científico para o tratamento desta doença. Não há motivo para separar os regimes de tratamento para TVE e TEP, já que as duas condições são diferentes espectros do mesmo processo patológico. Vários ensaios clínicos incluíram pacientes com cada uma das doenças separadamente e com as duas

concomitantemente, validando esquemas de tratamento similares para todas as eventualidades. Merece menção o fato de que pacientes tratados para TEP têm uma chance quase quatro vezes maior (1,5% vs 0,4%) de morrer de uma recorrência de TEV no primeiro ano após o tratamento, quando comparados a pacientes nos quais havia sido diagnosticada somente TVP isolada (RIZZATTIL; FRANCO, 2001).

Os objetivos do tratamento da TEV são o alívio dos sintomas agudos da doença, a tentativa de evitar a recorrência do evento trombótico e a progressão para TEP, além da tentativa de diminuir a incidência, ou, ao menos, a morbidade da síndrome pós-trombótica (SPT) (RIZZATTIL; FRANCO, 2001).

O tratamento do TEV se faz principalmente por dois métodos: Medidas físicas (elevação dos membros inferiores, movimentação ativa e passiva dos membros inferiores, deambulação precoce, uso de meias elásticas de compressão graduada, Compressão pneumática intermitente externa dos membros inferiores e filtro de veia cava inferior: permanentes e temporários), e Profilaxia farmacológica utilizando medicamentos antitrombóticos que abrangem antiplaquetários, anticoagulantes, fibrinolíticos, antagonistas de trombinas, inibidores de receptores IIb-IIIa e inativadores diretos do fator Xa (Heparina não fracionada, Heparina fracionada ou de baixo peso molecular, Cumarínicos, Dextran, Danaparóide sódico e Inibidores diretos da trombina) (BARRETO et. al., 2000).

3.4 Heparina

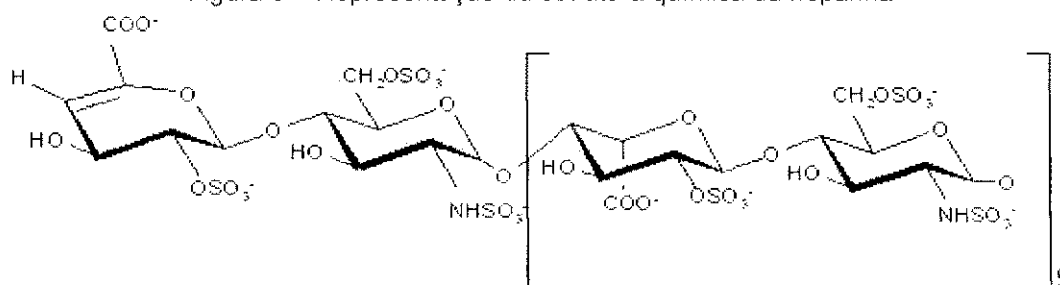
A heparina (Figura 3) é um polissacarídeo ácido que pertence à família das glicosaminoglicanas (mucopolissacarídeo sulfatado), de ocorrência natural, que apresenta massa molar média de $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$. É um dos mais potentes anticoagulantes conhecidos, sendo amplamente utilizada na terapêutica de diversas doenças e alterações hematológicas (MULLOY; HOGWOOD; GRAY, 2010). É obtida a partir de tecidos animais, mais especificamente da mucosa intestinal de suínos ou raramente, de pulmão bovino (EKBATANI; ASTRO; MALINOW, 2010).

Entre algumas desvantagens do tratamento com a heparina, tem-se que a administração ocorre somente por via parenteral (endovenosa ou subcutânea) e

este fato se deve à sua natureza hidrofílica e à alta massa molar, que dificulta a sua absorção gastrointestinal. Além disso, possui uma dose-resposta muito variável, exigindo monitoramento laboratorial constante, além da possibilidade de desenvolvimento da trombocitopenia e redução do número de plaquetas no sangue em um número significativo de pacientes que fazem tratamento prolongado com heparina (SAKR, 2011; PINEO; HULL; MARDER, 2004; MONEY, 2001)

A heparina apresenta biodegradação irregular, sendo removida da circulação pelas células reticulo endoteliais e pelo endotélio e é degradada por uma enzima hepática, a heparinase (LEE, et al., 1993).

Figura 3 – Representação da estrutura química da heparina



A administração oral da heparina seria muito mais conveniente para o paciente, contudo, por não apresentar absorção gastrointestinal, o desenvolvimento de suas formulações orais constitui objeto de importância clínica enorme, não apenas por eliminar o desconforto da dor durante as aplicações, mas também por diminuir o tempo de internamento e melhorar a adesão do paciente ao tratamento (KIM, et al., 2005). Nas últimas décadas, biomateriais para uso como sistemas de liberação de fármacos têm sido estudados e desenvolvidos, procurando amenizar esse problema. Esses sistemas tendem a melhorar a estabilidade, absorção, concentração terapêutica, farmacocinética e normalmente adequam um prazo para liberação do medicamento, mediante a necessidade da especificidade. Além disto, oferece proteção ao fármaco, reduzem a frequência das dosagens e melhoram o conforto do paciente (ORIVE, 2004).

A administração através da via oral pode ser utilizada fazendo o uso de sistemas carreadores de fármacos. Estes sistemas podem ser obtidos através de complexos polieletrólíticos (PECs). Quando dois polímeros com cargas opostas

são misturados em meio aquoso a atração eletrostática entre eles pode conduzir a formação de PECs. Desta forma, PECs são estruturas formadas por interações físicas entre um polímero que possui grupos com cargas positivas e outro com cargas negativas em solução. A atração eletrostática entre os grupos catiônicos e grupos aniônicos de polieletrólitos são as principais interações na formação dos PECs. Elas são mais fortes do que quaisquer outras interações secundárias, tais como ligações de hidrogênio, interações dipolo dipolo e interação de Van der Waals. Se as interações entre os polieletrólitos de cargas opostas forem muito intensas, os PECs podem precipitar. Os PECs podem ser sensíveis as alterações de pH e força iônica de soluções aquosas. Dependendo do meio em que estão inseridos, podem exibir alta densidade de carga e diferentes comportamentos de intumescimento (GHAFFARI, et al., 2007; DU, et al., 2006; BERGER, et al., 2004).

A quitosana, que é um polímero biodegradável, vem ganhando destaque na utilização destes sistemas, por ser um material policatiônico em meio ácido. Desta forma a utilização de quitosana como carreador na administração oral da heparina pode ser uma alternativa para novas vias de administração deste fármaco (FERNANDES, 2009).

3.4.1. Heparina de baixo peso molecular

Heparinas de baixo peso molecular (HBPM) têm sido indicadas em inúmeras doenças tromboembólicas com base em características vantajosas, tais como fácil esquema de administração, mais confiável relação dose-resposta, não necessidade de ajustes de dose e monitoramento laboratorial, menor incidência de trombocitopenia, menor custo global de tratamento e possibilidade de tratamento domiciliar (WANNMACHER, 2007).

As heparinas de baixo peso molecular, com peso molecular variando entre 4000 e 5000 daltons, têm substituído com algumas vantagens a heparina não fracionada. Seu mecanismo de ação envolve a inibição específica da atividade do fator Xa da coagulação. As HBPM possuem meia-vida plasmática mais longa, melhor biodisponibilidade após aplicação subcutânea e menor variabilidade de resposta a doses fixas. Como resultado dessas propriedades farmacocinéticas, um efeito anticoagulante estável e duradouro é atingido, quando essas drogas são

ministradas por via subcutânea, uma ou duas vezes ao dia, sem necessidade de monitorização com exames laboratoriais. Vários ensaios clínicos de boa qualidade, realizados nos últimos anos, forneceram o embasamento para a utilização da HBPM no tratamento da TEV (RIZZATTIL; FRANCO, 2001).

Algumas metanálises demonstraram semelhante eficácia terapêutica, para a heparina não fracionada, com menor recorrência do evento trombótico e menor número de complicações hemorrágicas. Um pequeno benefício em termos de sobrevida em favor da utilização da HBPM foi atribuído ao subgrupo de pacientes portadores de neoplasia, sugerindo um efeito protetor cujo substrato biológico ainda é desconhecido. Na Tabela 2 observam-se alguns tipos de HBPM, comercialmente disponíveis no Brasil e as doses preconizadas no tratamento da TEV.

Tabela 2: Doses de tratamento das heparinas de baixo peso molecular, comercialmente disponíveis no Brasil.

Fármaco	Nome comercial	Dose diária	Dose 12/12h
Nadroparina	Fraxiparina [®]	450 U. anti-Xa/Kg	225 U. anti-Xa/Kg
Enoxaparina	Clexane [®]	2mg/Kg	1mg/Kg
Dalteparina	Fragmin [®]	200 U. anti-Xa/Kg	100 U. anti-Xa/Kg

3.5 Biomateriais

Os biomateriais são definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982, entende-se por biomaterial toda substância (com exceção de fármacos) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais (NETO, 2007).

Segundo Simões (2007), os biomateriais podem ser de natureza metálica, cerâmica, polimérica, ou tratar-se de compósitos, porém, para que possam ser usados em aplicações médicas, eles devem possuir uma série de propriedades

específicas, que podem, fundamentalmente, serem agrupadas em uma característica chamada biocompatibilidade. O termo 'biocompatibilidade' foi utilizado para designar o desempenho biológico dos materiais. Materiais biocompatíveis podem ser considerados biomateriais, pois a biocompatibilidade indica a propriedade do material de provocar uma resposta adequada por parte dos tecidos do hospedeiro, quando utilizado em uma aplicação específica.

Os principais avanços no campo dos biomateriais têm ocorrido principalmente devido ao aumento do número de pacientes, em função do aumento da população e da expectativa de vida, que necessitam obter melhoria na qualidade de vida. O crescimento da expectativa de vida aumenta o número de pacientes nos hospitais em função principalmente da ocorrência de osteoporose e de acidentes nos meios de transporte. Além disso, a ampliação do número de pacientes nos hospitais está diretamente correlacionada ao aumento de veículos de transporte, gerando aumento no número de acidentes com lesões graves. Também o desenvolvimento das técnicas cirúrgicas tem expandido a demanda por próteses, implantes, enxertos e equipamentos médicos. De acordo com o Ministério da Saúde e Ministério de Ciência e Tecnologia, só os biomateriais de natureza ortopédica responderam, entre 2006/2007, por um orçamento de R\$ 8,5 milhões provando sua real importância também no contexto econômico (RIBEIRO, 2008).

Os polímeros formam uma classe versátil de materiais que têm sido amplamente estudados por médicos e profissionais de saúde com o objetivo de encontrar cada vez mais novas aplicações dos mesmos na área médica. Isto pode ser atribuído à sua facilidade de síntese e/ou modificação desses polímeros, o que gera significantes alterações nas propriedades físicas e mecânicas. O desenvolvimento de biomateriais poliméricos pode ser considerado como um processo revolucionário. Trabalhos sobre a aplicação de polímeros naturais como biomateriais datam de milhares de anos. No entanto, a aplicação de polímeros sintéticos na medicina pode ser considerada como um fenômeno recente (WILLIAMS, 1989).

O uso de polímeros como biomateriais teve início na década de 1940 durante a Segunda Guerra Mundial. Uma das primeiras tentativas foi o uso do polímero sintético poli (metacrilato de metila) (PMMA) como uma córnea artificial. Encorajados pelos sucessos iniciais, os cirurgiões começaram a usar uma

variedade de polímeros para diversas aplicações, tais como dispositivos intravenosos para contato com sangue, substituições de articulação de quadril e como lentes intraoculares. No entanto, na maioria desses casos, os médicos ficavam limitados a utilizar polímeros inicialmente desenvolvidos para outras aplicações (CATO; LAKSHMI, 2006).

Durante a segunda metade do século XX, os cientistas começaram a modificar polímeros já existentes com o intuito de adequar propriedades como a biocompatibilidade e propriedades mecânicas para aplicações biomédicas. Além disso, os avanços recentes na Farmacologia e na Biotecnologia abriram as fronteiras do campo da Biomedicina que exigia materiais com bioatividade, biocompatibilidade, e em muitos casos, a existência de um estágio intermediário entre as duas, a biodegradabilidade. A existência de materiais poliméricos biodegradáveis é altamente requerida para aplicações *in vivo*, tais como sistemas controlados de liberação de drogas e recuperação de tecidos danificados (CATO; LAKSHMI, 2006).

A descoberta de polímeros biodegradáveis a partir de polímeros bioinertes, foi considerada um avanço significativo na Ciência dos Biomateriais. Polímeros biodegradáveis são aqueles que se degradam *in vitro* e *in vivo* na presença de fluidos corporais. O critério básico de seleção de um polímero biodegradável para ser utilizado como um biomaterial é que seus produtos de degradação devem ser atóxicos e que a taxa de degradação e as propriedades mecânicas do material deve corresponder ao pretendido para a aplicação. A maior vantagem dos polímeros biodegradáveis em comparação com polímeros bioinertes é de que uma vez implantado evita-se a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico. Além disso, a biodegradação pode oferecer outras vantagens em curto prazo nas aplicações médicas, como por exemplo, em aplicações ortopédicas, onde implantes mecanicamente incompatíveis, tais como implantes metálicos podem às vezes levar ao desgaste do osso, enquanto implantes biodegradáveis podem lentamente transferir essa carga já que se degradam. Da mesma forma em sistemas de liberação controlada de drogas, o controle da cinética da liberação de drogas é possível através da variação da taxa de degradação da matriz polimérica (CATO; LAKSHMI, 2006).

Polímeros biodegradáveis podem ser classificados com base em sua origem, em naturais e sintéticos. Polímeros naturais parece ser a escolha óbvia para

aplicações biomédicas, devido à sua excelente biocompatibilidade. No entanto, polímeros naturais não foram totalmente explorados na área biomédica, devido às desvantagens inerentes associadas, tais como o risco de infecção viral, antigenicidade, instabilidade do material e variações significativas das propriedades. Polímeros sintéticos, por outro lado, oferecem enormes vantagens sobre polímeros naturais devido à sua facilidade de síntese, o que proporciona aos polímeros sintéticos um leque amplo de propriedades com excelente reprodutibilidade. Além do fato da taxa de degradação desses polímeros ser conhecida e determinada pelo seu tipo de estrutura (CATO; LAKSHMI, 2006).

3.6 Quitina e Quitosana

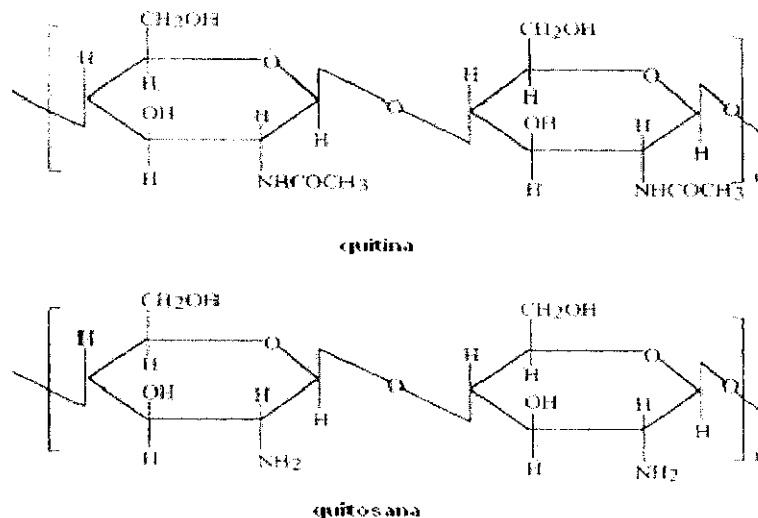
A quitina é um polissacarídeo biodegradável e de baixa toxicidade, largamente encontrada em invertebrados marinhos, terrestres e em fungos, sendo o segundo biopolímero mais abundante presente na natureza, depois da celulose (GUIBAL, 2004; MUZZARE, 2009). A quitosana é o produto da reação, em meio alcalino, da desacetilação da quitina (GUIBAL, 2005). A principal diferença entre ambas encontra-se no carbono-2 dos anéis glicosídicos de suas estruturas. Na quitina, há a presença de grupos acetil ($-\text{CO}-\text{CH}_3$) e na quitosana, grupos amina ($-\text{NH}_2$). O grau de desacetilação, de no mínimo 65%, induz e controla a maior parte das propriedades das quitosanas (CURTI; CAMPANHA-FILHO; MACROMAL, 2006).

Segundo Moura (2012), a quitina é insolúvel em solventes aquosos e na maioria dos solventes orgânicos convencionais, sendo este o principal fator limitante à sua utilização. A solubilização da quitosana, nomeadamente em soluções aquosas de ácidos orgânicos, é promovida pela protonação dos grupos NH_2 livres, presentes nas unidades desacetiladas.

A quitosana, que é um polímero natural, vem se destacando como polímero biodegradável e bioabsorvível, pois seus produtos de degradação são atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos (MUZZARELLI et al., 1997).

Ambos os polímeros são constituídos por unidades de 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopirranose (unidade acetilada) e 2-amina-2-desoxi-D-glucopirranose (unidade desacetilada) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, como observado na Figura 4 (KUMAR, 2000).

Figura 4: Comparação das estruturas moleculares da Quitina e Quitosana



Fonte: AZEVEDO et al., (2007).

A descoberta da quitosana data do século XIX. No entanto, somente nas últimas duas décadas a importância deste polímero tem crescido significativamente em função de ser uma fonte renovável e biodegradável e, também, por causa do recente aumento no conhecimento da sua funcionalidade nas aplicações tecnológicas e biomédicas (AJUN, et al., 2009). Muita atenção tem sido dada à quitina, quitosana e aos seus oligômeros como materiais bioativos naturais, devido a sua não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (KIM et al., 2001).

3.6.1 Propriedades Biológicas da Quitosana

Dentre as propriedades biológicas da quitosana destacam-se a atividade antimicrobiana, redução do tempo de coagulação, o efeito analgésico, a aceleração da cicatrização, o tratamento da osteoartrite e o efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico.

a) Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da quitosana pode ser explicada por três mecanismos: 1) a interação superficial iônica entre a quitosana e o microorganismo resulta em vazamento de eletrólitos e outros constituintes protéicos de baixa massa molar pela parede celular; 2) a penetração da quitosana dentro do núcleo dos microorganismos inibe a síntese de RNA e proteínas e 3) a formação de uma barreira externa provoca a diminuição de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano (GOY; BRITO; ASSIS, 2009).

A massa molar e o grau de acetilação são importantes fatores na determinação da atividade antimicrobiana da quitosana. Quanto mais baixa a massa molar e menor o grau de acetilação mais eficiente será essa atividade na redução do crescimento e multiplicação do microorganismo (DAMIAN et. al, 2005).

b) Efeito coagulante

A quitosana reduz o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente devido a sua capacidade em agregar plaquetas e eritrócitos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). No entanto, o efeito coagulante da quitosana ocorre no local da lesão e não de forma sistêmica como ocorre com a heparina.

c) Efeito analgésico

É atribuída à quitosana uma potente ação analgésica tópica. O principal efeito analgésico da quitosana é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ . A quitosana teria a propriedade de absorver a bradicinina liberada no sítio de inflamação, que tem importante papel no mecanismo da dor. Estudos tem mostrado que, quando aplicada topicamente, em feridas abertas, a quitosana fornece uma sensação refrescante, agradável e calmante (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

d) Aceleração da cicatrização

A proposta imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente os macrófagos e explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a biodegradabilidade desse polímero no organismo. Os macrófagos ativados pelos oligômeros da quitosana liberam interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, N-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de N-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias na biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos. Promovem a migração de neutrófilos, induzindo a resposta inflamatória (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Os estudos realizados têm apresentados resultados que corroboram com o uso da quitosana como agente de liberação de fármacos, visto que explicam as qualidades dessa substância, principalmente, quando se necessita de liberação lenta e controlada (SPIN-NETO et al., 2008).

Biomateriais baseados em quitosana constituem uma classe emergente com aplicação em vários campos biomédicos, tais como, regeneração tecidual, particularmente para cartilagem; dispositivos de liberação controlada de fármacos e sistemas de imobilização de células em gel (AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008).

e) A utilização da quitosana na liberação controlada de fármacos

Segundo Moura, 2012, o sucesso da quitosana na preparação de películas para liberação de fármacos, é devido a este polissacarídeo possuir um conjunto de características químicas e biológicas singulares, entre biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade.

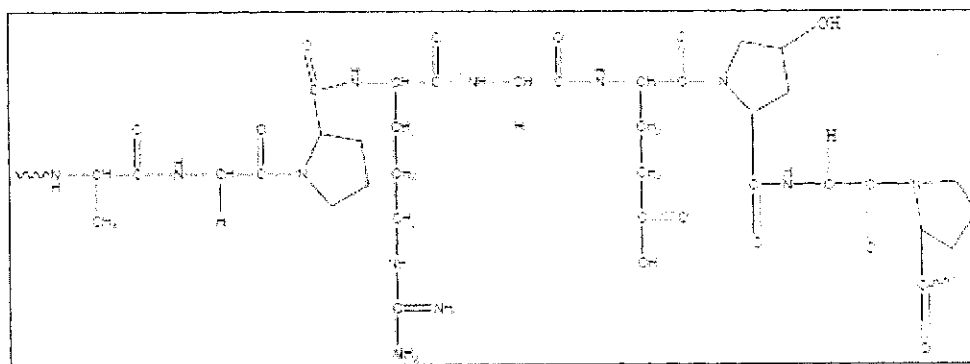
A biodegradação da quitosana é feita em vertebrados, principalmente pela lisozima e por enzimas bacterianas do cólon. Entretanto, oito tipos de quitinases foram isolados em humanos, três das quais apresentam atividade enzimática. Em geral o aumento do grau de desacetilação diminui a taxa de biodegradação. Outro polímero que tem sido muito estudado, juntamente com a quitosana para liberação

controlada de fármaco a gelatina (KEAN; THANOU, 2010; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

3.7 Gelatina

A gelatina (Figura 5) é um produto reconhecido pelas pessoas na sua forma tradicional para sobremesa literalmente chamada de gelatina, é utilizada na área alimentícia, mas também na área farmacêutica e técnica (adesivos, têxtil, etc.). É um polímero de origem animal formado por aminoácidos derivados do colágeno, que por sua vez é uma proteína encontrada na maioria dos seres vivos, apresentando composição diferente entre os reptéis, peixes. Ela é responsável em manter a integridade física em varias partes do organismo como cartilagens, ossos, dentes, pele, entre outras, e para desenvolver esta função, o colágeno forma fibras longas com moléculas de alto peso molecular, bem resistentes e insolúveis (ALMEIDA, 2012).

Figura 5. Unidade básica das cadeias de gelatina



Para obter a gelatina, que por sua vez tem aspecto de cola, é necessário quebrar a molécula de colágeno hidrolisando, diminuindo o comprimento e peso das moléculas, para o colágeno começar a se tornar solúvel, a qual permite sua extração com água quente. A proteína extraída tem a propriedade especial, pois toda vez que a solução contendo gelatina for resfriada, forma-se um gel sólido, de consistência elástica, que quando aquecido dissolve-se novamente, sendo chamado de termossensível. A maneira como é quebrada a molécula de colágeno, dá origem a varias gelatinas diferentes, com reflexo na viscosidade e

resistência do gel formado, mudando apenas o tamanho das gelatinas e não a composição, fornecendo uma boa quantidade de aminoácidos essenciais nas dietas dos seres humanos e outros animais. As fontes mais frequentes de colágeno para fabricação de gelatina são os ossos e as peles de bovinos e suínos (SILVA, 2010).

A gelatina na verdade é uma mistura de proteínas solúveis em água obtida de matérias-primas animais contendo colágeno, e as frações de proteína consistem basicamente dos aminoácidos como glicina, prolina, hidroxiprolina, ácido glutâmico, alanina, arginina, ácido aspártico, lisina, leucina, valina, fenilalanina, treonina, isoleucina, metionina, histidina, tirosina, serina, cistina e cisteína (PRESTES, 2012).

A gelatina reage com ácidos, bases, aldeídos, açúcares, íons metálicos, plastificantes, polímeros aniônicos e catiônicos e surfactantes (SINGH et al., 2002).

Têm-se dois processos principais empregados na fabricação da gelatina:

- Processo ácido: utilizado para fabricação de gelatina Tipo A, que é derivada da hidrólise ácida da pele suína e confere plasticidade e elasticidade ao material.

- Processo básico: este é utilizado na fabricação da gelatina Tipo B, a qual é derivada da hidrólise básica dos ossos e pele de bovinos e contribui com alta força de gel para o material.

A principal diferença entre os dois processos é o ponto isoelétrico (IEP). A gelatina obtida por processo alcalino tem uma maior proporção de grupos carboxila que são formados pela hidrólise dos grupos amida provenientes da asparagina e glutamina. Assim, ela é negativamente carregada e possui ponto isoelétrico menor quando comparados com a gelatina obtida via processo ácido, onde os grupamentos amida são poucos afetados, e assim, a gelatina tipo A possui ponto isoelétrico similar ao colágeno. Por conta dessa diferença, os fabricantes oferecem grande variedade de gelatina com diversos valores de IEP (YOUNG et al., 2005).

A gelatina utilizada na indústria farmacêutica é uma mistura dos dois tipos, entretanto, em algumas aplicações somente um dos tipos é utilizado. Vários graus de gelatina com diferentes tamanhos de partículas e massas molecular são vendidos comercialmente na forma de grânulos ou pós. Os diversos "grades" da gelatina são identificados por sua força de gelificação, denominada força de

bloom, que na realidade é a força, expressa em gramas, necessária para penetrar 4 mm na superfície de um disco de gelatina, que foi fabricado com solução aquosa de concentração 6,66% e foi mantido 17 h a 10° C (segundo método oficial da Association of Official Analytical Chemists).

Gelatina é amplamente utilizada em sistemas carreadores de fármacos, pois apresenta excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade. Grande parte dos estudos, tendo gelatina como veículo para entrega de fármacos, foca sua atenção na liberação controlada de antibióticos para tratamento quimioterápico do câncer (CORTESE; NASSTRUZI; DAVIS, 1998).

3.7.1 Modificação da Gelatina

A gelatina é um polímero solúvel em água, por este motivo precisa ser modificada para que sua aplicação no corpo humano (onde o meio é predominantemente aquoso). Esta modificação pode ser feita através de reticulação de suas cadeias proteicas, e o processo de reticulação pode ser feito através de processo físico ou químico (KUIJPERS, 2000).

Os métodos físicos mais comuns são a irradiação UV e o tratamento hidrotérmico, entretanto este tipo de reticulação não permite o controle da densidade de ligações cruzadas na matriz de gelatina (KUIJPERS, 2000). Os agentes de reticulação química são compostos bifuncionais ou polifuncionais que atuam ligando-se a grupos carboxílicos ou amino de cadeias laterais de gelatina. Exemplos deste tipo de reticulador incluem formaldeído, glutaraldeído, gliceraldeído, iminas, cetonas, sacarídeos, corantes, carbonato de cálcio, carbodiimidas, genipina e outros compostos bifuncionais (CHOUBEY; BAJPAI, 2010; GAIHRE et al., 2009; VANDELLI et al., 2001).

Singh e colaboradores (2002) relatam que a gelatina tipo B tem menor potencial de reticulação que a gelatina tipo A. No entanto, nenhum estudo mais profundo sobre o tema foi encontrado e poucas técnicas foram descritas para determinação da extensão da reticulação da gelatina. Entre as técnicas encontradas na literatura, podem-se citar: a Calorimetria Diferencial de Exploratória (DSC) - a presença de reticulação aumenta os valores de transição vítrea (Tg) da gelatina que passa de 170° C para valores próximos de 190° C

(CORTESE et al., 1998); Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) - esta técnica é rápida e segundo CORTESE et al. (1998), uma banda na região de 1450 cm^{-1} características da vibração de estiramento de aldimina deve ser observada como evidência da reticulação da gelatina por açúcar; Espectrofotometria de ultravioleta e fluorescência ácido trinitrobenzenosulfônico reage com os grupos amino terminais das cadeias de gelatina produzindo um cromóforo que absorve a 346 nm. A quantidade do cromóforo formado é inversamente proporcional à densidade de reticulação (VANDELLI, et al., 2001).

A solubilidade e inchamento dão uma idéia da extensão da reticulação porque a diminuição das propriedades de solubilidade e de inchamento é diretamente relacionada ao aumento das ligações cruzadas (SINGH et al., 2002).

A diminuição da solubilidade da gelatina quando suas cadeias estão reticuladas é alvo de diversos trabalhos acadêmicos. Por exemplo, Yan et al. (1991), prepararam microesferas de gelatina reticulada com glutaraldeído para infusão intra-arterial hepática. O sistema foi idealizado para transportar mitomicina (um agente anticâncer) e iodo 131 (radioisótopo) para quimioterapia e radioterapia simultâneas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO, localizado na Universidade Federal de Campina Grande/UFCCG.

4.2 Materiais

4.2.1 Biopolímero

Quitosana – 75-85 % desacetilada, fornecida pela Sigma Aldrich®. Lote MKBC 3804.

Gelatina tipo A obtida de pele suína fornecida pela Sigma Aldrich, lote 119 K0062.

4.2.2 Reagentes

- Ácido Acético Glacial - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico. Lote 0801000.
- Hidróxido de Sódio - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico, Lote 08071098.
- Lysozyme from hen egg White (Lisozima) - Sigma Aldrich®.
- PBS: *Phosphate Buffered Saline* (PBS) - Sigma Aldrich®, pH = 7,4. Lote 049K8204.
- Hidróxido de amônia.
- Água destilada;
- Soro fisiológico a 0,9%
- Heparina de baixo peso molecular - adquirido no comércio da Paraíba.

4.2.3 Outros materiais

- Pipeta de Pasteur descartável;
- Placas de Petri de acrílico;
- Becker;
- Bastão de vidro;
- Balão volumétrico;
- Barra magnética lisa sem anel (peixinho) 3x6 mm YI-b06;
- Seringa descartável de 20ml;
- Papel toalha;
- Sacos plásticos com fechamento zip lock;
- Caneta para CD Pilot ponta fina;
- Tesoura;
- Aquecedor magnético.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparo das membranas de quitosana

As membranas foram preparadas pelo método de evaporação de solvente, através da dissolução do polímero em ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica (1% m/v), sob agitação magnética por um período de 2 horas a aproximadamente 50 °C.

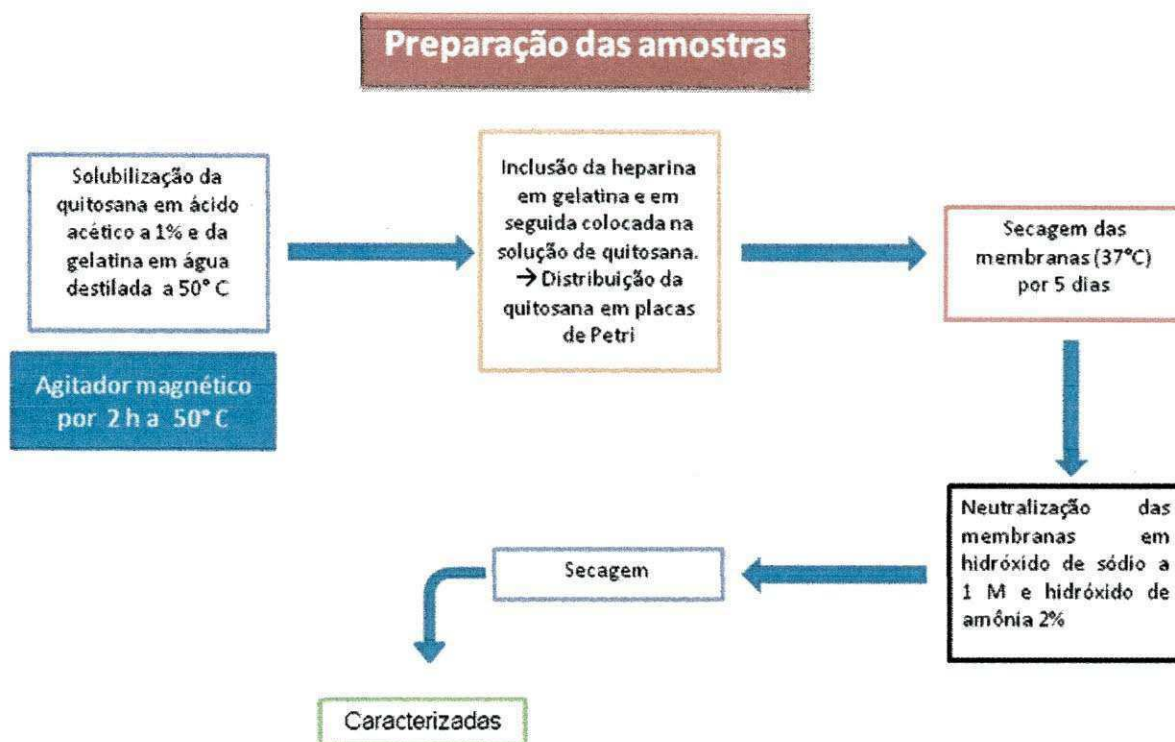
Após obtenção da solução de quitosana, a mesma foi distribuída em placas de petri de acrílico de 5,5 cm, com volume final em cada placa de 20 ml de solução e submetidas à secagem na estufa a 37 °C por 5 dias para completa evaporação do solvente, sendo em seguida neutralizada. Parte das membranas foi neutralizada com hidróxido de sódio a 1mol/L e outra parte foi neutralizada com hidróxido de amônia a 2%.

4.3.2 Incorporação da heparina de baixo peso molecular nas membranas de quitosana

Inicialmente, a heparina nas proporções de 20 mg e 40 mg iria ser colocada dentro da solução de quitosana obtida na etapa anterior. No entanto, a heparina por ser polianiónica e conter muitos pontos reativos, precipitou com a quitosana, impossibilitando a obtenção das membranas nessas condições. Desta forma, optou-se por colocar a heparina nas proporções de 20 mg e 40 mg dentro da solução de gelatina a 1 % (m/v) e em seguida misturada a solução de quitosana, também a 1 % (m/v), obtendo assim, uma solução com 1g:1g:0,02g e 1g:1g:0,04g. A solução de gelatina foi obtida em temperatura de 50° C. As membranas foram obtidas utilizando a mesma metodologia das membranas de quitosana descrita no item anterior. Para neutralização das membranas foram utilizadas duas técnicas, uma colocando 20 mL de solução de hidróxido de sódio a 1 mol/L sobre as membranas secas e permanecendo por 1 h e a outro foi submetendo as membranas a uma atmosfera de hidróxido de amônia a 2 % (v/v). A solução foi colocada sob uma cúpula de vidro, juntamente com as membranas por 2 h. As membranas neutralizadas com hidróxido de sódio foram lavadas com água destilada para retirada do excesso de NaOH e as neutralizadas com hidróxido de amônia ficaram ao ar livre até total desaparecimento do odor de amônia que encontravam-se nas membranas.

Todas as amostras foram obtidas como observado no fluxograma da Figura 6 e caracterizadas por Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS), Tensão Superficial por Ângulo de Contato, Ensaio de Intumescimento e Ensaio de Biodegradação. Foram preparadas 5 amostras de cada tipo de material, para cada ensaio.

Figura 6. Fluxograma de preparação das membranas



4.4 Caracterização

4.4.1 Difração de raios X

As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA. As amostras foram examinadas em um intervalo de 2θ entre 5 e 30,0 graus a uma velocidade de 2°/min. O objetivo deste ensaio foi estudar o comportamento cristalográfico do material.

4.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

As análises utilizando a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras foram realizadas em temperatura ambiente e o equipamento utilizado foi um Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi usada para identificar as bandas características

dos grupos funcionais presentes nas matérias primas e nas amostras estudadas nesta pesquisa, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 600 cm^{-1} .

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para realização das análises de microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas amostras de aproximadamente 0,5 cm^2 . Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de 1000x, sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

4.4.4 Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X

Para a identificação química do material foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi acoplado com sistema para micro análise químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

4.4.5 Tensão Superficial por Medidas do Ângulo de Contato

A técnica consiste no cálculo da tensão superficial da membrana baseada na análise do formato da gota. O ângulo de molhabilidade entre a água com tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que fariam a gota se espalhar sobre a superfície.

Na realização desta análise foi utilizado um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG e encontra-se instalado no CERTBIO.

4.4.6 Ensaio de Intumescimento

Antes de iniciar a pesagem das membranas, as mesmas foram colocadas em uma estufa a 37° C por 4 h. Em seguida foram pesadas e submersas em água destilada por 24 h. Após esse período as membranas foram colocadas, rapidamente, em papel toalha para retirada do excesso de água e pesadas. O grau de intumescimento foi calculado pela Equação 1.

$$\%I = \left[\frac{m_f - m_i}{m_i} \right] \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: m_i = massa inicial

m_f = massa intumescida

4.4.7 Ensaio de Biodegradação

Para este ensaio empregou-se como base as normas ASTM F1635-04 Standard teste Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants (2009) e a ASTM F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications (2007).

As amostras secas foram cortadas na dimensão de 2,0 cm², pesadas em balança analítica. Em seguida foram colocadas em placas de Petri contendo uma solução de Phosphate Buffered Saline – PBS e outras amostras em solução de PBS com lisozima e incubadas em estufa microbiológica à temperatura de 37 °C, sendo retiradas da estufa após 14 dias, seguindo um procedimento de lavagem em água destilada, secagem por 24 horas em estufa a 37 °C e pesadas em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à perda de massa das mesmas, observados a partir da média de ensaios repetidos em triplicata.

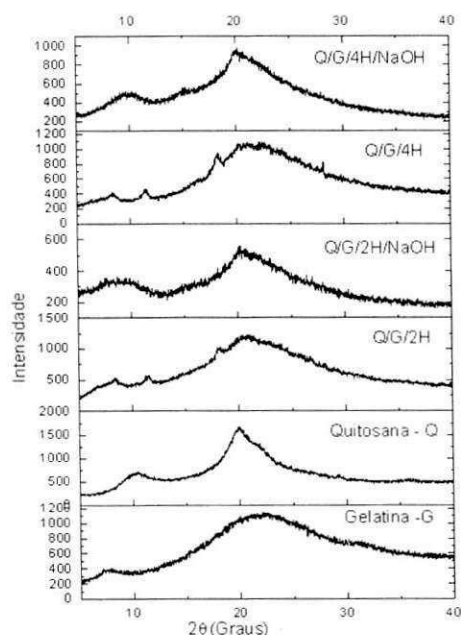
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras estão representadas por códigos. As membranas neutralizadas com hidróxido de amônia foram denominadas de membranas de quitosana (Q), quitosana com gelatina (Q/G), quitosana com gelatina com 20 mg de heparina (Q/G/2H), quitosana com gelatina com 40 mg de heparina (Q/G/4H) e as neutralizadas com hidróxido de sódio foram denominadas como quitosana (Q/NaOH), quitosana com gelatina (Q/G/NaOH), quitosana com gelatina com 20 mg de heparina (Q/G/2H/NaOH), quitosana com gelatina com 40 mg de heparina (Q/G/4H/NaOH). A heparina foi codificada pela letra H de heparina ou F de fármaco.

5.1 Difração de raios X

Todas as membranas de quitosana sem e com a gelatina e a heparina foram caracterizadas por difração de raios X com a finalidade de observar a influência da gelatina e da heparina na cristalinidade e consequentemente nas propriedades das membranas como observado na Figura 7.

Figura 7 – Difração de raios x do pó da gelatina e das membranas quitosana com gelatina e a heparina.



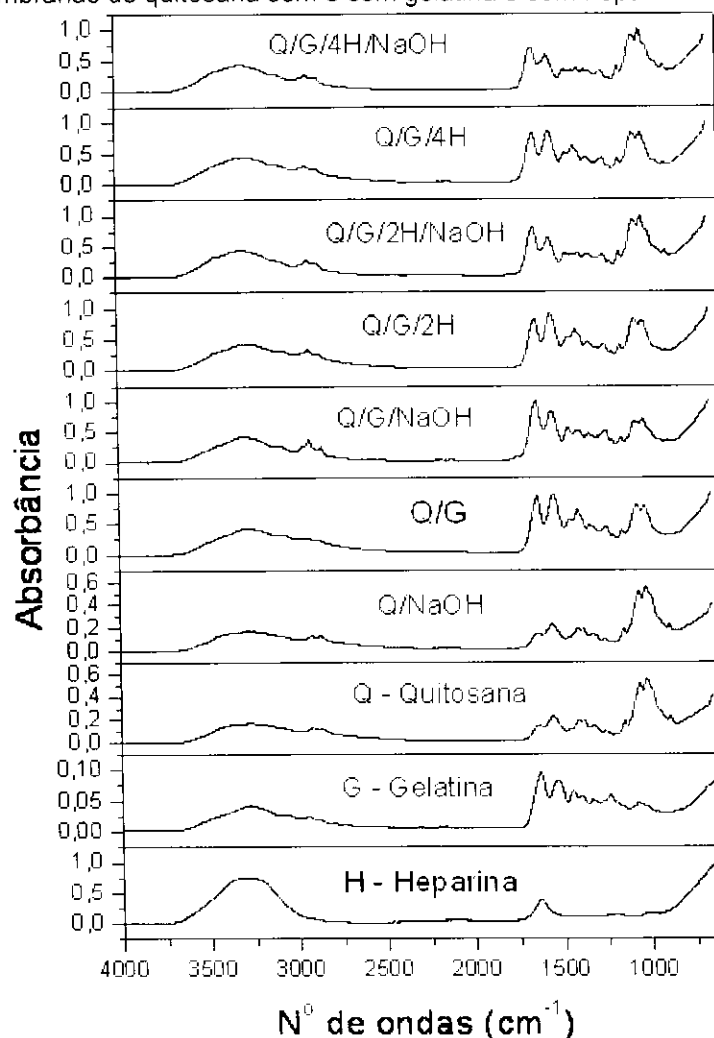
O difratograma da membrana de quitosana apresentou picos típicos de material semicristalinos, com base larga em torno de $2\theta = 10^\circ$ e $2\theta = 20^\circ$ e corrobora com Barbosa, (2011), Fidèles, (2010) e Lima (2010). A quitosana possui um perfil semicristalino devido às fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura cristalina da quitosana (URAGAMI; TOKURA, 2006). Na gelatina também foram observados picos típicos característicos de material parcialmente cristalino, com pico predominante em $2\theta = 22^\circ$ e um pequeno pico em $2\theta = 8^\circ$.

Não foram observadas alterações significativas na cristalinidade das membranas com gelatina e o fármaco. No entanto, nos difratogramas neutralizados com hidróxido de amônia, foi observado um pico em $2\theta = 18^\circ$ e dois pequenos picos em $2\theta = 8^\circ$ e $2\theta = 12^\circ$, que tornaram o material um pouco mais cristalino quando comparado aos demais. Essa alteração, possivelmente, não pode ter sido provocada pela heparina, já que segundo Martins (2011) a heparina é caracterizada pela ausência de cristalinidade, ou seja, é um material amorfo.

5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

A técnica de FTIR foi utilizada com o objetivo de demonstrar os espectros (bandas características dos grupos funcionais) obtidos das membranas de quitosana com e sem gelatina e também com diferentes concentrações de heparina. De acordo com a Figura 8, pode-se afirmar que a adição de heparina nas membranas de quitosana com gelatina provocou alteração no perfil das membranas quando comparada a de quitosana pura, indicando a presença de gelatina e de heparina nas mesmas.

Figura 8 – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com heparina



O espectro característico da quitosana está de acordo com Fidèles, (2010) e Barbosa (2011), pois apresentam todas as absorções relativas à quitosana e, ainda de acordo com o espectro da membrana de quitosana, pode-se afirmar que a mesma não é 100% desacetilada, pois encontra-se na região de 1658 cm^{-1} , uma banda característica da amida I ($\text{O}=\text{C}-\text{NHR}$).

As unidades desacetiladas da quitosana apresentam três grupos funcionais característicos, sendo eles uma amina primária no C-2, uma hidroxila primária no C-3 e uma hidroxila secundária no C-6. No espectro da quitosana, a banda em torno de 3332 cm^{-1} é referente ao estiramento axial de OH, sobreposta à banda de estiramento N-H. A banda em 2885 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico do grupo C-H. A banda em 1646 cm^{-1} está associada à deformação axial C=O da amida primária. A banda em 1581 cm^{-1} é referente a deformação vibracional do grupo amina protonado (NH_3^+). A banda em 1379 cm^{-1} pode ser atribuída à

deformação axial - CN de grupos amino. A banda intensa em 1016 cm^{-1} está associada ao estiramento C-O-C dos anéis piranosídicos.

O espectro referente a gelatina apresentou bandas características em 1656 cm^{-1} , típica de amida I, devido ao estiramento da carbonila; em 1556 cm^{-1} , relacionado à amida II, devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N; em 1229 cm^{-1} , correspondem as vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e a deformação N-H; em 1454 cm^{-1} , correspondente a estereoquímica dos anéis pirrolidínicos e próximo a 3268 cm^{-1} , devido ao estiramento O-H e corrobora com Sionkowska et al., (2004).

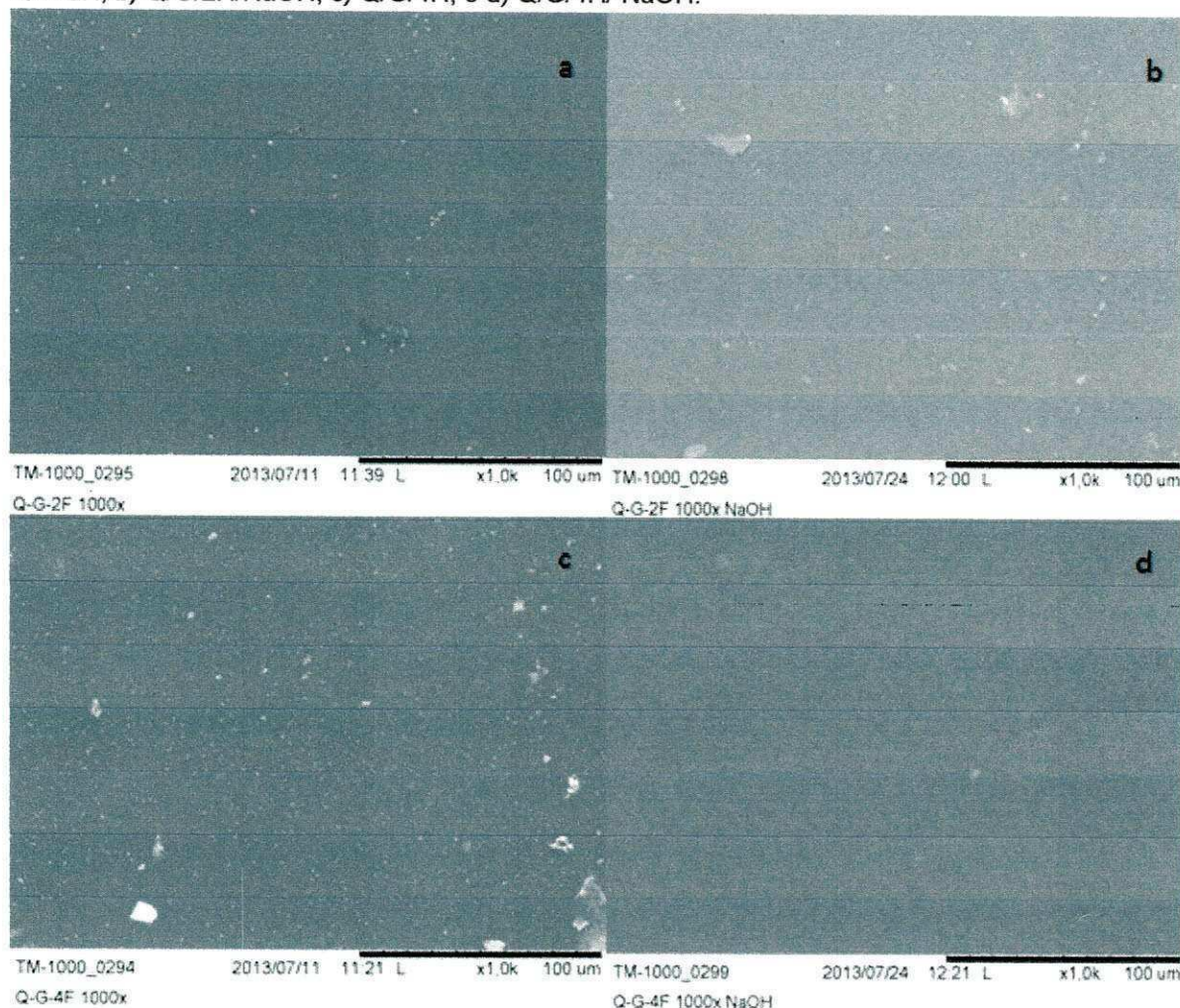
No espectro referente à heparina observa-se bandas características em 3692 e 2880 referente ao estiramento assimétrico dos grupos O-H e N-H, em 1635 cm^{-1} referente a deformação angular N-H, em 1240 cm^{-1} referente ao estiramento dos grupos C-N, C-O e S=O, em 1067 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo HSO_3^- e em 648 cm^{-1} referente ao S=O (PANZARINI, 2003)

Para a quitosana com gelatina e o fármaco foram observados picos referentes a todos os componentes das membranas, indicativo da presença dos mesmos nas membranas. No entanto, observou-se no espectrograma das amostras que foram neutralizadas com hidróxido de amônia uma discreta diminuição da intensidade do pico em 1628 cm^{-1} referente ao grupo C=O e aumento no pico em 1541 cm^{-1} referente ao grupo C=C, além do aparecimento de um pico intenso em 1408 cm^{-1} que pode ser referente aos grupos C-O e C-C. Estas alterações podem está relacionadas à presença do acetato, derivado do ácido acético, pois, possivelmente, a neutralização das membranas não foi efetiva e esse resultado corrobora com os resultados obtidos no ensaio de molhabilidade, de intumescimento e, principalmente no de biodegradação, onde estas membranas se dissolveram durante o período de 15 dias.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Este ensaio foi realizado com a finalidade de observar a morfologia de todas as membranas obtidas nesta pesquisa e compará-las. Na Figura 9 podem ser observadas as fotomicrografias das membranas de quitosana com gelatina e com diferentes proporções de heparina.

Figura 9 – Microscopia Eletrônica das membranas de quitosana com gelatina e heparina: a) Q/G/2H; b) Q/G/2H/NaOH; c) Q/G/4H; e d) Q/G/4H/ NaOH.

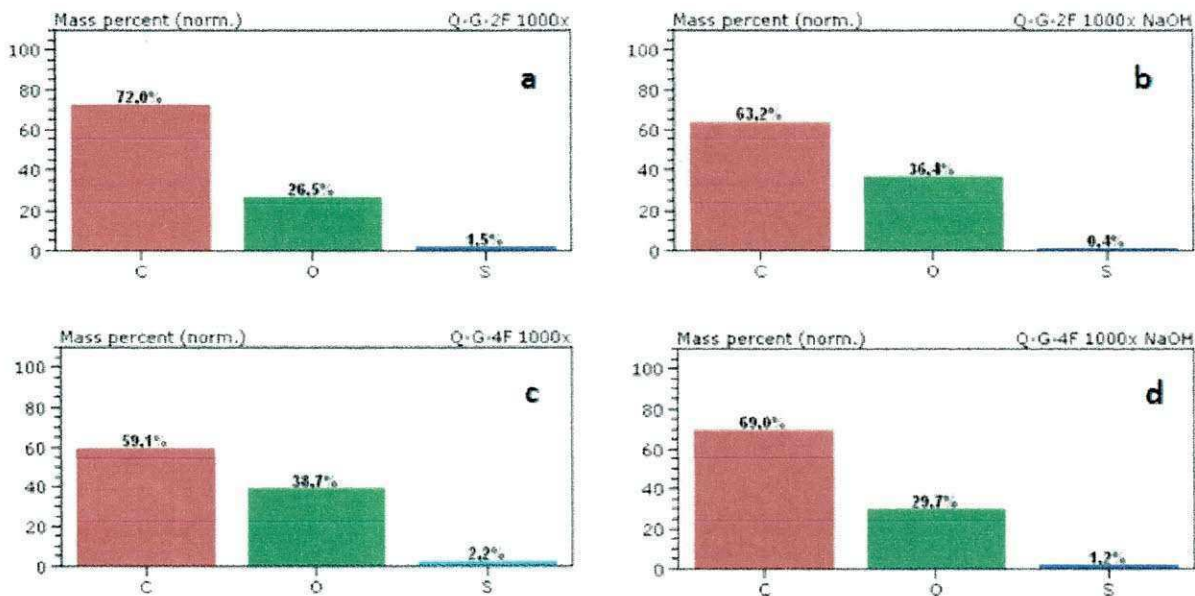


Nas imagens a e c da Figura 9 são observadas microesferas que são resultados da ligação eletrostática da quitosana e da heparina que são policatiônica e polianiônica respectivamente. Observa-se também que, a membrana c apresenta maior quantidade de microesferas por ter maior quantidade da heparina. Já nas membranas b e d não são observadas estas microesferas com a mesma clareza das observadas nas imagens a e c. Acredita-se que este fato ocorreu por causa da lavagem com água destilada, que foi utilizada para retirada do excesso de hidróxido de sódio. Este resultado é confirmado pelos ensaios de FTIR, onde foi observado uma diminuição do pico em 648 cm^{-1} referente ao S=O e no EDS, onde foi observado diminuição do percentual de enxofre.

5.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios X

A espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) foi utilizada para identificar os constituintes de cada uma das amostras. A heparina foi identificada pela presença de enxofre como observado na Figura 10.

Figura 10 – Espectroscopia de Energia Dispersiva das membranas de quitosana com gelatina e heparina: a) Q/G/2H; b) Q/G/2H/NaOH; c) Q/G/4H; e d) Q/G/4H/NaOH.



Através dos resultados observados no ensaio de EDS, foi possível confirmar diferentes quantidades do fármaco nas membranas e que as membranas neutralizadas com hidróxido de sódio tiveram uma diminuição significativa no percentual de enxofre, que é uma substância que caracteriza a presença do fármaco na membrana. Isto ocorreu, possivelmente, devido a lavagem com água destilada para retirada do excesso de hidróxido de sódio, que arrastou o fármaco que é hidrossolúvel. Este fato foi confirmado pelo MEV e pelo FTIR.

5.5 Tensão Superficial por Medidas do Ângulo de Contato

Com o desenvolvimento de novas técnicas de modificação de superfícies, ampliou-se o uso de materiais para os mais diversos setores industriais,

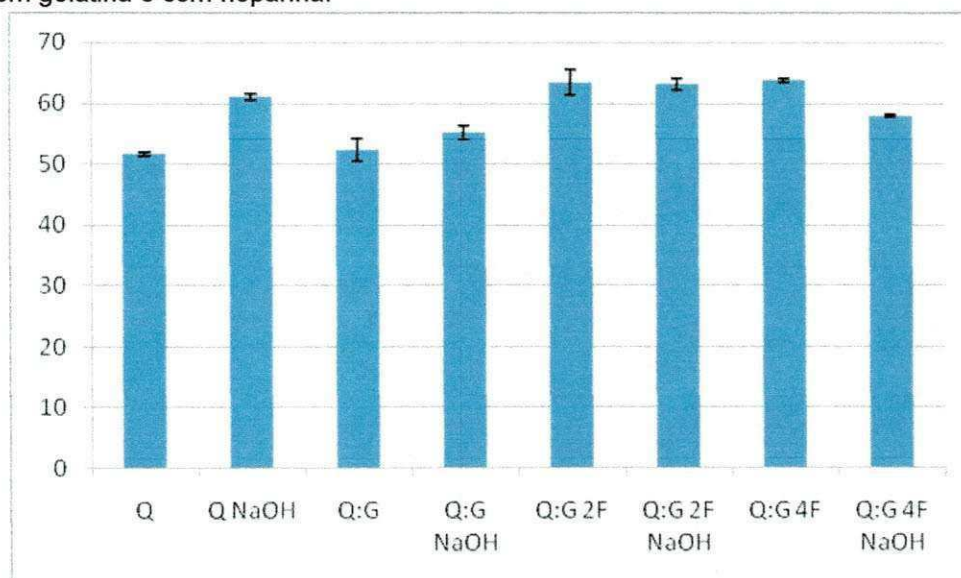
principalmente no setor biomédico, pois é grande a contribuição que essas técnicas trazem na modificação de propriedades superficiais como molhabilidade, biocompatibilidade, adesão celular, diferenciação celular, etc. Todas essas propriedades físico-químicas estão sempre relacionadas com medidas de ângulo de contato. Desse modo, medidas de ângulo de contato têm sido amplamente usadas para monitorar propriedades superficiais, tais como, tensão superficial crítica, componentes dispersivas e polares da energia superficial livre, interações ácido-base na superfície, cristalinidade superficial, orientação superficial dos grupos funcionais, rugosidade superficial, contaminação superficial e molhabilidade (BEAKE et. al., 1998).

Por meio de medidas de ângulo de contato (θ) entre o substrato e água pode-se avaliar a hidrofiliicidade das membranas.

As análises de ângulo de contato deste trabalho foram efetuadas com o gotejamento de água destilada na superfície da membrana, com posterior análise das medidas dos ângulos formados pela bolha de água na membrana, com software próprio do Grupo de Biomateriais.

Observa-se na Figura 11 que a presença da gelatina nas membranas aumentou os valores médios (52° a 62°) de ângulo de contato, ou seja, as membranas tornaram-se menos hidrofílica. Todavia, a diminuição da hidrofiliicidade não pode ser considerada significativa quando observado o desvio padrão.

Figura 11 – Tensão Superficial por Medidas do Ângulo de Contato das membranas de quitosana sem e com gelatina e com heparina.



Na Figura 11 pode-se, também, observar que, a diminuição da hidrofiliicidade ocorreu pela adição do fármaco, pois todas as amostras com heparina tiveram um aumento no ângulo de contato, sendo que ocorreu uma pequena e não significativa diminuição do ângulo da membrana com maior quantidade de fármaco neutralizada com NaOH. Isto pode está relacionado com a quantidade do fármaco retirado na lavagem das membranas ou pela ação do próprio hidróxido de sódio. No entanto, essas alterações não foram significativas no perfil hidrofílico das membranas.

5.6 Ensaio de Intumescimento

Este ensaio foi realizado com a finalidade de observar a capacidade de absorção e retenção de líquido das membranas. Segundo Thein-Han e Kitiyanant (2007), essa habilidade de absorção e retenção de água é um fator importante para materiais implantáveis, pois ela permite a absorção de fluidos corpóreos e a transferência de nutrientes e metabólitos, sendo importante para liberação controlada de fármacos. No entanto, essa elevada taxa de absorção pode trazer consequências indesejáveis como a redução da estabilidade estrutural do polímero, ou seja, a presença constante de umidade na estrutura do polissacarídeo provoca o intumescimento da matriz com consequente degradação das membranas.

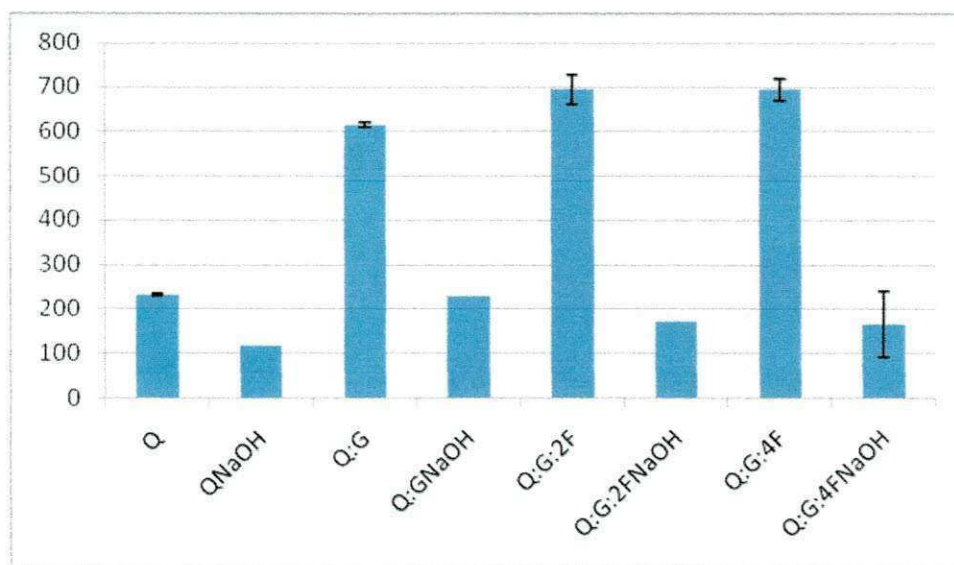
Segundo Fernandes (2009), a membrana de quitosana pura apresentou um alto grau de intumescimento para a primeira hora de imersão, chegando a mais de 850 % para uma das amostras. Este grau de intumescimento foi reduzido para os tempos de 3 h e 24 h. Isso pode ter ocorrido porque o processo de absorção de água atingiu o equilíbrio.

Neste trabalho foi realizado o ensaio de intumescimento com todas as membranas de quitosana sem e com gelatina e heparina.

Durante o ensaio as amostras foram pesadas antes de serem colocadas em água destilada. Este ensaio foi realizado com triplicata de cada tipo de amostra analisada. Após 24 h todas as membranas foram pesadas na mesma balança utilizada para pesagem anterior. Em seguida foram realizados os cálculos para saber o quanto as membranas intumesceram.

A presença da gelatina nas membranas promoveu o aumento da taxa de intumescimento das amostras. No entanto, essa taxa teve um aumento mais significativo nas membranas que foram neutralizadas com hidróxido de amônia, isso, possivelmente, devido a neutralização não ter sido efetiva, como já observado nos ensaios de FTIR e biodegradação. O aumento da taxa de intumescimento também pode ter sido influenciado pela adição do fármaco, já que, de acordo com a Figura 12 as amostras com heparina apresentaram taxa de intumescimento em torno de 700 %.

Figura 12 – Ensaio de Intumescimento das membranas quitosana sem e com gelatina e com heparina.



A hidrofiliçidade da quitosana se dá em função de seus grupos desacetilados que, naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam esta forte afinidade por moléculas polares. Esses grupos possuem uma grande influência sobre o montante de água retida, considerando que o aumento da concentração de quitosana na membrana interfere com a água absorvida (ASSIS et al., 2003). As membranas que foram neutralizadas com NaOH apresentaram menor percentual de intumescimento, isto pode está relacionado a efetiva neutralização das mesmas e conseqüentemente menos pontos reativos livres para se ligar com a molécula de água, pois a quitosana em pH acima de 6,4 apresenta-se neutra, ou seja, perde o perfil policatiônico.

5.7 Ensaio de Biodegradação

Este ensaio teve como objetivo observar a ação da solução tampão fosfato (PBS) sem e com lisozima no processo de degradação das membranas, como também, verificar a influência da gelatina e do fármaco neste processo. Para avaliação deste ensaio, foi considerada a perda de massa das amostras degradadas como observada na Tabela 3.

Tabela 3. Perda percentual de massa das membranas submetidas a ensaios de biodegradação e respectivos desvios padrão.

Ensaio	Perda de massa das membranas 15 dias de ensaio			
	PBS (pH=6,78)		Lisozima/PBS (pH=6,80)	
	Média (%)	D. Padrão	Média (%)	D. Padrão
Q	34	4	38	0,6
Q NaOH	26	5	22	1
Q:G	*	*	*	*
Q:G NaOH	**	**	**	**
Q:G:2F	*	*	*	*
Q:G:2F NaOH	**	**	**	**
Q:G:4F	*	*	*	*
Q:G:4F NaOH	**	**	**	**

* As amostras dissolveram-se ou desmancharam-se na hora da coleta para pesagem e ficaram impossibilitadas de serem pesadas.

**As amostras não dissolveram-se, mas degradaram-se ou fragmentaram-se ficando impossibilitadas de serem pesadas.

A lisozima é a principal enzima responsável pela degradação *in vivo* da quitosana através da hidrólise dos resíduos acetilados, embora outras enzimas proteolíticas tenham mostrado um baixo nível de atividade de degradação sobre a molécula. A velocidade de degradação da quitosana é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade e ao grau de desacetilação (PONCIANO, 2010). Esta enzima está presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais de mamíferos, inclusive no fluido lacrimal com teores acima de 1% (BERGER et al., 2004).

Neste trabalho, a degradação das membranas ocorreu basicamente devido a presença do tampão PBS e não da lisozima, pois ocorreu perda de massa de todas as membranas.

Para Dallan, (2005) os valores de degradação das membranas quando da exposição à enzima lisozima pelo período de um mês e quando da exposição somente ao tampão PBS, notou-se que, na maioria das composições, a degradação das membranas ocorreu também, basicamente devido à presença do tampão PBS e não à ação da lisozima. Contudo, após dois meses de exposição à lisozima, houve um aumento da degradação das membranas, sendo que, diferentemente do contato por um mês, na maioria dos ensaios foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a degradação quando da presença e da ausência da enzima na solução.

Segundo Tomihata e Ikada (1997), quitosanas com grau de desacetilação de até 69% apresentam considerável degradação enzimática mesmo em períodos curtos de exposição à lisozima, enquanto que as de grau de desacetilação superior a 69% são dificilmente degradadas. Além disso, as características morfológicas dos materiais também interferem na degradação enzimática dos mesmos.

A presença da gelatina nas membranas de quitosana foi um fator que acelerou o processo de degradação das mesmas, isto pode está relacionado a quantidade de gelatina utilizada neste trabalho. Outro fator importante na degradação das membranas foi o tipo de neutralização, pois as que foram neutralizadas com hidróxido de amônia, possivelmente, se dissolveram devido a neutralização não ter sido efetiva como observado no ensaio de FTIR. Já as membranas de quitosana com gelatina e o fármaco que foram neutralizadas com hidróxido de sódio, também dissolveram-se ou degradaram-se, mas apresentando-se no final do ensaio fragmentos de membrana impossibilitando a pesagem.

Sabe-se que a quitosana é considerada um polímero degradável pela lisozima, porém, tal degradabilidade é dependente, dentre outros fatores, do grau de desacetilação da quitosana, já que a lisozima se liga aos grupamentos N-acetilglicosamina presentes na estrutura deste polissacarídeo (SUH; MATTHEW, 2000). O que justifica os resultados obtidos por Dallan, 2005 e Ponciano, 2010 e neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

Na técnica de DRX foi possível observar que não ocorreu alteração significativa na cristalinidade das membranas, já que as membranas apresentam características de polímeros semicristalinos. No entanto, as membranas neutralizadas com hidróxido de amônia tiveram uma discreta alteração no perfil cristalográfico;

A técnica de FTIR mostrou picos característicos de todos os componentes utilizados nesta pesquisa, inclusive os picos relativos à heparina. Todavia, ocorreu uma diminuição do pico em 648 cm^{-1} referente ao S=O, nas membranas neutralizadas com NaOH, possivelmente, devido a lavagem com água destilada que arrastou o fármaco e esse comportamento foi comprovado com os resultados de MEV e EDS.

Na microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a presença de microesferas de heparina com quitosana nas membranas neutralizadas com hidróxido de amônia e as mesmas não foram visualizadas nas membranas neutralizadas com hidróxido de sódio como justificado pelos ensaios de FTIR e EDS, onde foi evidenciada uma significativa diminuição do enxofre nas membranas.

No ensaio de molhabilidade observou-se uma diminuição da hidrofilicidade das membranas com gelatina e heparina. No entanto essa diminuição não foi considerável e não interferiu na capacidade de absorção e retenção de líquido verificado no ensaio de intumescimento onde as membranas com gelatina e heparina apresentaram um maior grau de intumescimento, e esse intumescimento foi muito significativo nas membranas neutralizadas com hidróxido de amônia.

O ensaio de biodegradação apresentou perda de massa significativas das membranas, principalmente das neutralizadas com o hidróxido de amônia. Isto pode ser justificado pelo alto grau de intumescimento, pois quanto maior o grau de intumescimento, maior a degradabilidade do polissacarídeo. Concluir também que a degradação ocorreu basicamente por ação do PBS e não da lisozima.

Baseado nos resultados pode-se concluir que a interação entre a quitosana, gelatina e a heparina foi efetiva. No entanto a neutralização com NaOH não é a mais indicada para neutralização das membranas devido ao arraste do fármaco durante a lavagem e o tempo de 2 h para neutralização das membranas em atmosfera NH_4OH a 2% não foi efetiva.

7 REFERÊNCIAS

ADAM, S. S.; KEY, N. S.; GREENBERG, C. S. "D-dimer antigen: current concepts and future prospects". *Blood*, v. 113, p. 2878–2887, 2009.

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILI, L.; *Carbohydr. Polym.*, v. 75, p. 566, 2009.

ALMEIDA, P. F. Análise da Qualidade de Gelatina obtida de tarsos de frango e aspectos envolvidos no processo produtivo. 135f. 2012. Dissertação (Mestre em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2012.

ASSIS, O.B.G.; SILVA, V.L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção em Água em Filmes Finos de Quitosana Processadas em Diversas Concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.13, nº4, p.223-228, 2003.

AYALA, G. G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P.; *Molecules*, p. 13, 2069, 2008.

BARRETO, E. S. M.; AGUIAR, V. A. N.; GAZZANA, M. B.; MENDES, E. S. P. S.; MESSEDER, O.; MORRONE, N. "Recomendações para a prevenção do tromboembolismo venoso". *Jornal de Pneumologia*, v. 26, n. 3, 2000.

BARBOSA, R. C. Compósitos quitosana/carbonato de cálcio para utilização em cânulas de fístula ruminal. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, 2011, 119 f.

BASTES, S. M. "Emerging anticoagulant drugs". *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 27, p. 721-727, 2007.

BEAKE, B.D.; et al. Correlation of friction, adhesion, wettability and surface chemistry after argon plasma treatment of poly (ethylene terephthalate). *Journal of Materials Chemistry, Manchester*, v. 8, p. 2845-2854, 1998.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 57, 19-34.

BERMUDEZ, F.; BERMUDEZ V.; CANO, C.; MEDINA, M.; NUNES, N.; RESTREPO, H.; VARGAS ME.; GARCIA, D.; SOREKI, A.; SEYFI. H.; PEREZ, A. Heparinas de bajo peso molecular em la cardiopatia isquêmica metabólica. Bases moleculares. Experiência clinica y Resultados. *ArchivosVenezolanos de Farmacologia y Terapeutica. AVFT. V.19 n.2 Caracas julho 2012.*

CARDOSO, L. F. "Profilaxia de Tromboembolismo Venoso em Pacientes Internados". Protocolo Institucional do Hospital Sírio-Libanês, 2011.

CORTESI, R.; NASSTRUZI, C.; DAVIS, S.S. Sugar cross-linked gelatina for controlled release: microspheres and disks. *Biomaterials*, v-19, p. 1641-1649, 1998.

CHOUBEY, J.; BAJPAI, A.K. Investigation on magnetally controlled decovery of doxorubich from superparmagnetic nanocarriers of gelatin crosslinked with genitin. *Jornal of Materialis Science; Materials in Medicine*, v.21, p.1573-1586, 2010.

CURTI, E.; CAMPANA-FILHO, S. P.; *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem A43*, 555, 2006.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. (Tese). 194f, 2005.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPIRITO SANTO, M. L. P. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr. Araraquara* v. 16, n. 2, p. 195-205, abr./jun. 2005.

DU, J.; DAI, J.; LIU, J-L.; DANKOVICH, T. *React. Funct. Polym.* 2006, 66, 1055-1061.

EKBATANI, A. ASARO, L.R., MALINOW, A.M. Anticoagulation with argatroban in a parturient with heparina-induced thrombocytopenia *Int J. Obst. Anest* ;19(1) 82-7, 2010.

FIDÉLES, T.B. Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial. Programa de pós-graduação em Ciência e engenharia de Materiais. Universidade federal de Campina Grande (Dissertação), 72f, 2010.

GAIHRED, B.; KHIL, M.S.; KANG, H.K.; KIM, H.V. Bioactiving of gelatin coated magnetic iron oxide nanoparticles in vitro evaluation. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, v.2, p.573-586, 2009.

GHAFFARI A.; NAVAE, K.; OSKOUI, M.; BAYATI, K.; TEHRANI, M. R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007, 67, 175-186.

GOY, R.C.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.19, no 3, p. 241-247, 2009.

GUIBAL, E.; *Sep. Purif. Technol.*, p.38, 43, 2004,

GUIBAL, E.; *Prog. Polym. Sci.*, p.30, 71, 2005

HELMUS, M.N; GIBBONS, D.F.; CEBON, D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. *Toxicologic Pathology*, 2008.

HIRSJ, RASCHER. Heparin and Low-Molecular- Weight Heparin: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *American College of chest physicians*; 126 (3): p.188-203, 2004.

HOU, H.; GE, Z.; YING, P.; DAI, J.; SHI, D.; XU, Z.; CHEN, D.; JIANG, Q. "Biomarkers of deep venous thrombosis". *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 34, n. 3, p. 335-346, 2012.

KAMINSKI, K.; ZAZAKOWNY, K.; SZCZUBIAŁKA, K.; NOWAKOWSKA, M. *Biomacromolecules* 2008, 9, 3127-3132.

KEAN, T.; THANOU, N. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Review*, v-62, p3-11, 2010.

KIM, S. K.; PARK, P. J.; YANG, H. P.; HANM, S. S.; *Drug Res.* 2001, 51, 769.]

KIM, S.K., VAISHALI, B., LEE, E. LEE, S., LEE, Y. KUMAR, T.S. MOON, H.T. & BRUN, Y. Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. *Thrombosis Research*, in press, 2005.

KUIJPERS, A.J.; ENGBERS, G.; H.; KRIJGIVELD, J.; ZAAS, S.A.; DANKERT, J.; FEIJEN, J.; Cross linking and characterization of gelatin matrices for matrices for biomedical application. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, v.11, n-3, p.225-243, 2000.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, V.46, p. 1-27. 2000.

LANDEFELD, C. S. "Noninvasive diagnosis of deep vein thrombosis". *The Journal of the American Medical Association*, v. 300, p. 1696-1697, 2008.

LARANJEIRA, M. C.; FAVÉRE, V.T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, 2009, v.32, p.672-678.

LAKSHMI S NAIR, CATO T LAURENCIN, "Biodegradable polymers as biomaterials", *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798

LEE, G.R., BITHELL, T.C., FOERSTER, J., ATHEUS, J.W. & LUCKENS, J.N., *Wintrobe's clinical hematology*. Philadelphia Lee & Febiger, v.1, p.1297, 1993.

LIMA, R.S.C. Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, 2010, 112 f.

MONEY, S. & YORK, J.W. Development of oral heparin therapy for prophylaxis and treatment of venous thrombosis. *Cardiovascular Surgery* v.9, p.211-218, 2001.

MOURA, M. J. Aplicações do quitosano em liberação controlada de fármacos: Algumas considerações, Centro Científico Conhecer, Enciclopédia Biosfera, Goiânia, v.8, N14, 2012, p.1489.

MULLOY, B., HOGWOOD, J., J. GRAY, E. Assays and reference materials for current and future applications of heparins. *Biologicals*, v.38, p.459 e 466, 2010.

MUZZARELLI, R. A. TARSIS, R. A., GUZMAN, C. A. PRUZZO, C. (1997). Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight Chitosans. *J Dent Res* 76, 665-672.

NETO, F. A. D. "Avaliação do cimento de alfa-fosfato tricálcico em artrodeses tarsocrurais experimentais em cães", 2007. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal.

ORÉFICE, R. L. - "Biomateriais: fundamentos e aplicações", 2006, Cultura Médica, Rio de Janeiro.

ORIVE, G., GASCON, A. R. HERNANDEZ, R. M., DOMINGUEZ, A. PEDRAZ, J. L., Techniques; New approaches to the delivery of biopharmaceuticals. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 25, p. 382-387, 2004.

PANZARINI, L. C. G. A. Estudo da enxertia e heparinização simultâneas do poli (cloroeto de vinila), via radiação gama. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

PARENTEAU-BAREIL, R., GAUVIN, R. BERTHOD, F., Collagen-Based Biomaterials for tissue engineering Applications, *Materials*, v3(3), p. 1863-1887, 2010.

PARK, J. B. & Lakes, R. S. - "Biomaterials an introduction", Plenum Press, 1992, New York.

PARKER, Steve. O Livro do Corpo Humano. São Paulo: Ciranda Cultural, 2007. 256 p.

PINEO, G.; HULL, R. & MARDER, V. Oral delivery of heparina: SNAC and related formulation, *Best practice & Research Clinical Haematology* v. 17, p. 153-160, 2004.

PONCIANO, J. J. In: Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

PRESTES, Rosa Cristina. Colágeno e seus derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. *UNOPAR CientCiêncBiol Saúde*, v. 15, p. 65-74, 2012.

RIBEIRO, C. "Obtenção e caracterização de biocerâmicas porosas à base de fosfatos de cálcio processadas com a utilização de albumina", 2008, Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo

RIZZATTIL, E. G.; FRANCO, R. F. "Tratamento do tromboembolismo venoso". *Jornal de Medicina*, v. 34, p. 269-275, 2001.

RUGGERI, Z. M. "Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions". *Journal of Thrombosis Haemostologica*, v. 1, p. 1335–1342, 2003.

SAKR, Y.; HAETSCHER, F.; Heparin-induced thrombocytopenia type II in a surgical intensive care unit. *Journal of Critical Care* (2011).

SANATANA, A. P. B. "Avaliação de pacientes ambulatoriais em uso de anticoagulantes orais", 2006, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria.

SANTOS, R. M. M. O futuro aponta para novas formas de administrar medicamentos. Disponível em: Acesso em 14 jan. 2013.

SCARVELIS, D.; WELLS, P. S. "Diagnosis and treatment of deep-vein thrombosis". *Canadian Medical Association Journal*, v. 175, p. 1087–1092, 2006.

SCHREIJER, A. J.; REITSMA, P. H.; CANNEGIETER, S.C. "High hematocrit as a risk factor for venous thrombosis. Cause or innocent bystander?". *Haematologica*, v. 95, p. 182–184, 2010.

SINGH, S.; RAMA RAO, K.V. VENOPUGAL, K.; MANIKANDAW, R.; alteration in Dissolution Characteristics of Gelatin – Containing Formulations. A Review of the Problem, Test Methods, and Solutions. *Pharmaceutical Technology*, April 2002.

SILVA, C. A. da. A EDUCAÇÃO NO TRATAMENTO DAS DOENÇAS CRÔNICO-DEGENERATIVAS. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*. Fortaleza, v. 19, n. 004, p. 195-196, 2006.

SILVA, C. R. S. H.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, 776-785, 2006.

SIMÕES, M. S. "Desenvolvimento e estudo *in vitro* de implante biorreabsorvível em poli (L-lactídeo) (PLLA) para artrodese de coluna lombar". 2007, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

SIONKOWSKAA.; WISNIEWSKI M.; SKOPINSKA J.; KENNEDYB C. J.; WESS T. J. (2004). "Molecular interactions in collagen and chitosan blends". *Biomaterials*, vol. 25, 795-801.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.; MARCANTONIO, R.A.C.; MARCANTONIO, JÚNIOR, E. (2008). Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*. v. 37, n. 2, p. 155-161.

SUH, J.K.F.; MATTHEW, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, v.21, p.2589-2598, 2000.

THEIN-HAN, W. W. KITIYANANT, Y., 2007, "Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 80, n.1, pp. 92-101.

TOMIHATA, K., IKADA, Y. (1997). Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. *Biomaterials*. 18, Nr.3, 189-195.

URAGAMI T.; TOKURA S. *Material Science of Chitin and Chitosan*, Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006

VANDELLI, M.A.; RIVASI, F. GUERRA, P.; FORNI, F.; ARLETTI, R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 215, p. 175 – 184, 2001.

WANNMACHER, L. "Heparinas de baixo peso molecular: evidências que fundamentam indicações". *Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados*, v. 4, n. 2, p. 1 – 6, 2007.

WADAJKAR, A. S.; SANTIMANO, S.; RAHIMI, M.; YUAN, B.; BANERJEE, S.; NGUYEN, K.T. "Deep vein thrombosis: Current status and nanotechnology advances". *Biotechnology Advances*, 2012.

WIETHOFF, A.; MAKOWSKI, M.; KATOH, M.; SPUNTRUP, E.; BOTNAR, R. "Molecular imaging of thrombosis". *Current Cardiovascular Imaging Reports*, v. 3, p. 34–41, 2010.

WILLIAM, D. F. *On the Mechanisms of Biocompatibility*. *Biomaterials*. Elsevier, 2008, p. 2941-2953.

WILLIAMS, D. F. "Definitions in Biomaterials". *Journal of Biomechanics*, v. 22, n. 1, p. 79-151, 1989.

YONG, S.; WONG, M.; TABATA, Y.; MIKOS, A. G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*, v. 109, p. 256 – 274, 2005.

MINI GLOSSÁRIO

Anticoagulante - são os fármacos usados para prevenir a formação de trombos sanguíneos.

Citoquinas - é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes.

Endotélio - Constitui a camada celular interna dos vasos sanguíneos.

Linha - é um fluido transparente, que impregna o corpo, que é produzido quando o sangue atravessa os vasos capilares e vaza para o corpo; os poros dos capilares são pequenos e não permitem a passagem dos glóbulos vermelhos, mas deixam passar o plasma sanguíneo, contendo oxigênio, proteínas, glicose e glóbulos brancos.

Trombocitopenia - é a redução do número de plaquetas no sangue, ao contrário do que ocorre na trombocitose.

Trombo - é uma coagulação de sangue no interior do vaso sanguíneo.