

3.13.01 - Bioengenharia.

ESTUDO DA QUITINA COMO ALTERNATIVA DE BIOMATERIAL PARA DISPOSITIVOS DE ASSISTÊNCIA CIRCULATÓRIA: ANÁLISE PRÁTICA DOS BENEFÍCIOS DA QUITINA EM DETRIMENTO DOS EFEITOS COLATERAIS CAUSADOS PELO USO DE ANTICOAGULANTES.

Marta C. Souza¹, Sergio T. Bernatavicius²

1. Estudante da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (FCET-PUC/SP)

2. Professor Doutor da FCET-PUC/SP - Departamento de Engenharia/Orientador

Resumo

Materiais sintéticos de uso médico em contato com o sangue podem suscitar a coagulação, levando os pacientes à terapia anticoagulante e causando diversos efeitos colaterais. Nesse contexto, o presente trabalho versa sobre o estudo da quitina destacando seu derivado, a quitosana, como alternativa de biomaterial para Dispositivos de Assistência Circulatória (DACs). Assim, busca-se evidenciar que o biomaterial estudado possui características próximas ao natural, representando boa biocompatibilidade junto à propriedade anticoagulante.

Através da pesquisa qualitativa-descritiva, foram desenvolvidos revestimentos utilizando a quitosana comestível. Com a análise laboratorial foram mapeados procedimentos para a obtenção de quitosana a partir da desacetilação da quitina, a qual foi extraída das cascas de camarões desprezadas na produção alimentar da população humana. Os resultados demonstram que também é possível desenvolver materiais para uso biomédico com melhor custo-benefício.

Palavras-chave: Biocompatibilidade; revestimento; custo-benefício.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Trabalho selecionado para a JNIC: PUC-SP.

Introdução

As doenças cardiovasculares ainda estão entre as principais causas de morte na sociedade brasileira, onde a necessidade estimada da população para transplantes de coração é muito superior aos procedimentos realizados ⁽¹⁾. Nesse cenário, os Dispositivos de Assistência Circulatória (DACs) se inserem de modo a restabelecer o débito cardíaco, aumentando o tempo de vida do paciente ⁽²⁾. Ao realizar sua função é ideal que o dispositivo não interfira no processo de coagulação natural, porém, como parte dos DACs não é feita de material biológico, faz-se necessário o uso de agentes anticoagulantes. A submissão à terapia anticoagulante implica cuidados com a ingestão de alimentos ricos em vitamina K e medicamentos que possam reagir com o princípio ativo do fármaco, reduzindo ou aumentando seu efeito, levando à formação de trombos, sangramentos e outros efeitos colaterais ⁽³⁾.

Revestimentos hemocompatíveis são cada vez mais desenvolvidos para solucionar o problema de coagulação dos DACs, constituindo-se de materiais como a heparina e a quitosana sulfatada. A quitosana, polissacarídeo desacetilado da quitina, se comporta como polieletrólito catiônico e tem propriedade anticoagulante intensificada através do processo de sulfatação (introdução do grupo inorgânico sulfato SO_4^{2-}), o qual a torna mais similar a heparina ⁽⁴⁾, que é um popular anticoagulante feito a partir de células bovinas ou suínas. Os principais problemas em torno dos compostos são as iminentes rejeições e sangramentos, no caso da heparina ⁽⁵⁾ e a complexidade de produção de revestimentos sintéticos inorgânicos, que aumenta a artificialidade e a relação custo-benefício ⁽⁶⁾.

Tendo em vista as exigências e complexidade na produção de revestimentos hemocompatíveis, bem como a busca por torná-los mais naturais e inertes ao organismo, o presente trabalho teve como objetivo, de modo geral, desenvolver revestimentos biocompatíveis para DACs a partir da quitosana comestível, comprovando seu efeito anticoagulante sem a necessidade de sulfatação. Inseridos como objetivos específicos, o estudo buscou levantar os efeitos indesejáveis que se fazem sentir no bem-estar dos usuários de anticoagulantes e melhorar a relação custo-benefício de métodos para a obtenção de quitosana a partir de resíduos sólidos de camarão.

Metodologia

Os procedimentos metodológicos para a obtenção da quitina e quitosana foram realizados de modo temporal, começando pelos processos físicos de separação, lavagem térmica e moagem da matéria-prima (cascas de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*), passando pelos processos químicos de acordo com o método fermentativo ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾, que sofreu adaptações. Trabalhou-se com um tamanho de grãos de 0,42mm, feito de forma manual em Granutest ABNT 40 e uso de ácido clorídrico 2,5% v/v, com proporção 1:3 (g/mL) na etapa

de desmineralização. A quitosana obtida ao final do processo foi submetida à análise do grau de desacetilação, mensurado por método potenciométrico de titulação condutimétrica⁽⁹⁾.

Foram preparados dois tipos de revestimento a partir da quitosana comestível (cápsulas de procedência Vitalab com grau de desacetilação entre 80 e 90%), um por membrana e outro por filme de quitosana, segundo métodos adaptados de preparo de membranas modificadas⁽¹⁰⁾ e filme de quitosana⁽¹¹⁾. Na produção das membranas, trabalhou-se com 3g de quitosana e filtração à vácuo com filtro de Buchner, o filtrado foi colocado em placas de Petri esterilizadas com 15cm de diâmetro. Para a produção do filme de quitosana foi usado ácido acético 10% v/v, sendo feita apenas uma filtração simples e submersão de placas metálicas de aço inoxidável 316 e zinco (sem tratamento superficial) na solução, o material foi seco em estufa até a incorporação do revestimento nos metais.

Os revestimentos foram então submetidos a testes de corrosão salina e de resistência, caracterização por espectrofotometria de cubeta e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a um ensaio comparativo para a verificação da atividade anticoagulante, no qual foram preparadas soluções dos principais anticoagulantes laboratoriais: ácido etilenodiamino tetra-acético ou EDTA 0,33 M⁽¹²⁾ e citrato de sódio 0,129 M⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾, bem como amostras aquosas da quitosana pura e dos revestimentos em diferentes estágios do desenvolvimento. Foi colocado 1mL de cada solução, separadamente, em tubos de coleta de sangue para transporte (desprovidos de conservantes) devidamente identificados e acrescentado a cada tubo 1mL de material sanguíneo, testado e aprovado por exame laboratorial coagulograma, procedendo com homogeneização por inversão e análise comparativa⁽¹⁵⁾.

Ao decorrer dos procedimentos laboratoriais foi feita uma pesquisa de campo, partindo do método qualitativo-indutivo de investigação científica⁽¹⁶⁾. Entrevistaram-se adultos e idosos que relataram o uso da terapia anticoagulante em conjunto, ou não, com DACs, a fim de verificar os efeitos colaterais sentidos e o impacto que têm em diferentes esferas da vida social. A partir de um questionário de respostas alternativas, termo de compromisso e termo de consentimento livre e esclarecido, segundo modelo proposto pela Faculdade de Medicina de Sorocaba (FCMS-PUC/SP) modificado para a presente pesquisa, iniciou-se o levantamento estatístico.

Resultados e Discussão

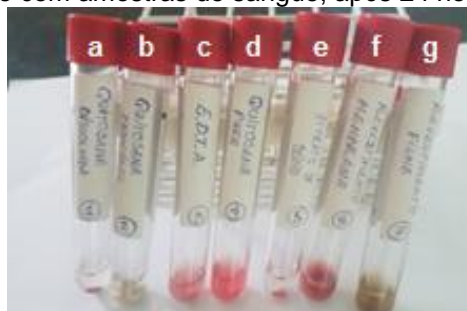
A quitina e quitosana obtidas apresentaram aspectos visuais dentro dos padrões normais e qualidade adequada com o parâmetro exigido, confirmada pelo grau de desacetilação alcançado de 63% (a quitosana é considerada como o derivado da quitina com grau de desacetilação acima de 50%)⁽¹⁷⁾. A viabilidade econômica também foi um resultado observado no processo, uma vez que foi feito de forma manual, com poucas quantidades de reagentes e sem custos adicionais com a matéria-prima.

A partir dos testes físicos e caracterização, o revestimento por filme obteve melhores resultados com relação à incorporação nas placas de aço e zinco, já que o revestimento por membrana apresentou menor resistência e aderência superficial aos metais.

A caracterização por MEV confirmou a incorporação do filme de quitosana nas placas metálicas, onde mesmo sofrendo interação com o feixe de elétrons, pela técnica de metalização, conseguiu se integrar à estrutura metálica. O teste de corrosão salina se mostrou satisfatório para ambos os revestimentos, visto que as placas metálicas apenas apresentaram coloração mais escura, sem sinal de deterioração após 24h. A análise por espectrofotometria indicou um comprimento de onda médio de 390nm para o revestimento por filme, que se mantém dentro dos achados literários para filmes de quitosana (entre 200 e 600nm)⁽¹⁸⁾. Não foi possível a comparação com o revestimento por membrana, uma vez que a mesma é opaca e não permite a mensuração fidedigna por meio da passagem de luz no espectrofotômetro de cubeta.

No ensaio comparativo para a verificação da atividade anticoagulante (figura 1), os revestimentos se mostraram discrepantes entre si. No tubo contendo o revestimento aquoso do filme de quitosana (figura 1 - g), quando em contato com o material sanguíneo, reagiu de imediato mudando a coloração natural de avermelhada para esverdeada; já no tubo com a membrana de quitosana (figura 1 - f) houve a conservação do material sanguíneo por cerca de 40h, modificando a cor característica natural após esse período, resultado semelhante aos tubos contendo o anticoagulante EDTA (figura 1 - c) e a quitosana pura aquosa (figura 1 - d), que conservaram o material sanguíneo durante as 48h analisadas; no tubo com solução de citrato de sódio (figura 1 - e) houve a coagulação do material sanguíneo, precipitando-o no fundo do recipiente ao decorrer de 24h.

Figura 1 – Ensaio comparativo com amostras de sangue, após 24 horas em contato com soluções.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Segundo a Rede de Serviços Tecnológicos para Sangue e Hemoderivados, no controle da qualidade de bolsas de sangue por meio de inspeção visual é relatado que a coloração atípica (diferente da avermelhada) ou a modificação de cor e presença de coágulos representam alterações de estabilidade e qualidade, devendo ser cuidadosamente observadas⁽¹⁹⁾.

Através da pesquisa de campo encontrou-se, na amostra analisada (n = 10), um número significativo de pessoas em relação ao total que sentiram efeitos colaterais ao usarem anticoagulantes orais ou têm medo e dificuldades na adequação dos mesmos. Nas respostas alternativas (afirmativas/negativas), os entrevistados observaram ou sentiram efeitos colaterais (60%), dificuldades na adequação (30%), dificuldades com relação à compra e ingestão (10%) e medo ao usar (40%). Partindo das respostas afirmativas para as qualitativas relatadas, foram levantadas as principais adversidades sentidas, sendo náuseas (30%), fadiga (10%) e tontura (20%), bem como as dificuldades de adequação, sejam pelo ajuste das doses (30%) ou o alto valor dos medicamentos (10%) e mapeados os motivos que geram medo ao usar medicamentos anticoagulantes, dentre eles a iminência de sangramentos (20%), “afinar o sangue” (10%) e acelerar ou diminuir demais os batimentos cardíacos (10%).

Conclusões

A partir das referências teóricas multidisciplinares que nortearam o presente trabalho, foi possível obter o material de estudo para a produção da quitosana com baixo custo e com pouca quantidade de reagentes devido à proporção e tamanho dos grãos selecionados, impactando positivamente a produção econômica sustentável. No mesmo sentido, também foi possível produzir dois diferentes materiais para uso alternativo de revestimento de DACs, a membrana e o filme de quitosana, sendo que o último foi avaliado e caracterizado como um adequado material de recobrimento para o aço inoxidável 316 e zinco metálico sem receber tratamento superficial.

Os estudos, para a avaliação da atividade anticoagulante nos materiais, foram supridos de forma eficaz mediante os fatos obtidos pela análise visual comparativa, onde a quitosana em seu estado puro (apenas posta em solução aquosa) conseguiu manter as características intrínsecas do sangue ao não coagular e modificar a amostra sanguínea, bem como a membrana de quitosana, que conservou da mesma forma a amostra durante período de tempo considerável. Dessa maneira, é possível inferir que a quitosana comestível, sem modificações pelo processo de sulfatação, pode proporcionar efeito anticoagulante e ser usada como material biomédico para revestimentos de DACs.

Em todo o estudo de pesquisa que considera novas tendências, tecnologias e materiais podem ocorrer limitações, sejam metodológicas, financeiras, éticas, entre outras esferas. O presente trabalho também encontrou dificuldades para a sua concretização, das quais é relatada, principalmente, a falta de achados na literatura que direcionassem métodos específicos de baixo custo para a análise desejada, que foi suprida a partir do ensaio comparativo. Apesar de toda a descrição analítica embasada, bem como os fatos de caráter técnico obtidos, o ensaio não é um teste cientificamente comprovado de atividade anticoagulante de materiais e ainda precisa ser validado. Além disso, com relação aos revestimentos desenvolvidos, mesmo visto como bom revestimento para metais, o filme de quitosana não obteve efeito anticoagulante de tempo significativo, o que foi alcançado pela membrana de quitosana, indicando a necessidade de estudos mais direcionados tanto para purificação do filme, a partir da evaporação total do solvente, quanto para o prolongamento do efeito anticoagulante da membrana, que pode ser alcançado pelo aumento do grau de desacetilação.

Em suma, o presente trabalho de pesquisa científica atingiu os objetivos propostos inicialmente e contribuiu, de forma técnica e informacional, para a produção de conhecimento no tocante a um estudo de caráter novo, uma vez que ainda não há literatura contendo que versa sobre o estudo e o ensaio com a quitosana comestível sem o emprego de sulfatos para uso biomédico com atividade anticoagulante em revestimentos para DACs. O custo-benefício no desenvolvimento da pesquisa também possui caráter inovador, onde a produção de materiais biomédicos mais próximos ao seu arranjo natural, aliada a baixa complexidade procedimental e baixo custo abrem caminhos para explorar de maneira mais específica os recursos naturais muitas vezes desprezados, reduzindo o impacto socioambiental.

Pretende-se dar continuidade ao aperfeiçoamento dos revestimentos para DACs com quitosana comestível, buscando, a partir da motivação pelos resultados da pesquisa de campo, modificações mais naturais para contribuir no aumento da biocompatibilidade e minimização dos efeitos do processo de anticoagulação sintética.

A presente pesquisa teve o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio da bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), bem como da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC/SP), através do suporte laboratorial e acadêmico. Também houve contribuições do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), com a caracterização por MEV e do Laboratório de Química da Escola Técnica Estadual Tiquatira, com o auxílio na realização dos procedimentos físico-químicos. As contribuições estatísticas se originaram de hospitais particulares e pacientes das diferentes zonas da cidade de São Paulo, através da disponibilização de informações.

Referências bibliográficas

- (1) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS. **Registro Brasileiro de Transplantes de Órgãos**. São Paulo: ABTO, 2018. Janeiro/Setembro - 2018.
- (2) Stevenson LW, Miller LW, Desvigne-Nickens P, Ascheim DD, Parides MK, Renlund DG, et al. **Left ventricular assist device as destination for patients undergoing intravenous inotropic therapy: a subset analysis from REMATCH (Randomized Evaluation of Mechanical Assistance in Treatment of Chronic Heart Failure)**. *Circulation*. 2004; 110(8): 975-81.
- (3) FILHO, Mario Terra; MENNA-BARRETO, Sérgio Saldanha. Recomendações para o manejo da tromboembolia pulmonar, 2009. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], 2010.
- (4) CHANG, S.H.; HUANG, J.-J. Biodegradability and anticoagulant properties of chitosan and sulfonated chitosan films coated on TiNi alloys. **Surface and Coatings Technology**, v.206, n. 23, p. 4959-4963, 2012.
- (5) HAMERSCHLAK, Nelson; ROSENFELD, Luiz Gastão Mange. Utilização da Heparina e dos Anticoagulantes Oraís na Prevenção e Tratamento da Trombose Venosa Profunda e da Embolia Pulmonar. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. São Paulo, 1996.
- (6) SOUSA, H.C.; BRAGA, Mara E.M.; SOSNIK, Alejandro. **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados**. Portugal: Coimbra University Press, 2015.
- (7) CAVALCANTI, *et al.* Produção de Quitosana a Partir da Fermentação da Casca de Camarão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 18, n. Especial, p. 503-515, 2016.
- (8) ANDRADE, Sânia Maria Belísio *et al.* Extração e Caracterização de Quitina e Quitosana e a sua Utilização na Fabricação de Nanofibras. *In: VI Congresso Nacional de Engenharia Mecânica*, 2010, Campina Grande. **Anais [...]**. Paraíba: CONEM, 2010.
- (9) SANTOS, J. E. *et al.* **Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens**. *Polímeros [online]: Ciência e Tecnologia*, vol. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.
- (10) LIMA, Maria do Socorro Pereira. **Preparo e Caracterização de Membranas de Quitosana Modificadas com Poli (Ácido Acrílico)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2007.
- (11) ALMEIDA, Luciana Mayara Mendonça *et al.* Utilização da Quitosana Como Inibidor De Corrosão em Metais. *In: VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação*, 2012, Palmas. **Anais [...]**. Tocantins: Editora do CONNEPI, 2012.
- (12) ANTICOAGULANTE Glicose. Goiânia: Editora da Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, 2017.
- (13) SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Coleta e preparo da amostra biológica**. Barueri, SP: Manole, 2014.
- (14) GREINER BIO-ONE BRASIL. **Catálogo de Produtos Linha Pré-Analítica**. Brasil: PEFC, 2015.
- (15) GIVISIEZ, Flávia Naves. Controle de Qualidade de Hemocomponentes. *In: CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE RIO GRANDE DO SUL. Curso de Boas Práticas no Ciclo do Sangue*. Porto Alegre: [s. n.], 2017.
- (16) MARTINS, Gilberto de Andrade; THEÓPHILO, Carlos Renato. **Metodologia da Investigação Científica para Ciências Sociais Aplicadas**. 2.ed. São Paulo: Atlas, 2009.
- (17) RINAUDO, Marguerite. **Chitin and chitosan: Properties and applications**. *Progress in Polymer Science*, 2006.
- (18) LLANOS, J.H.R. Caracterização dos filmes de quitosana neutralizados com bases de sódio e potássio. *In: LLANOS, Jaiber Humberto Rodrigues. Propriedades Físicas de Filmes de Quitosana Dopados Como Condutores Iônicos*. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências - Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- (19) REDE DE SERVIÇOS TECNOLÓGICOS PARA SANGUE E HEMODERIVADOS. **Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes**. São Paulo: RedSang-SIBRATEC, 2011.