

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPONJAS NANOESTRUTURADAS DE
QUITOSANA E POLICAPROLACTONA PARA HEMOSTASIA**

ALESSANDRA GABRIELA LEONEL FONSECA

SAPIENTIA AEDIFICAT

2016

ALESSANDRA GABRIELA LEONEL FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPONJAS NANOESTRUTURADAS DE
QUITOSANA E POLICAPROLACTONA PARA HEMOSTASIA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, da Universidade Federal
da Paraíba, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia – Área de Concentração
em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista

João Pessoa

2016

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F676c Fonseca, Alessandra Gabriela Leonel.

Caracterização de esponjas nanoestruturadas de quitosana e policaprolactona para hemostasia / Alessandra Gabriela Leonel Fonseca. - João Pessoa, 2016.

32 f. : il.

Orientação: Juliano Elvis de Oliveira.

Coorientação: André Ulisses Dantas Batista.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

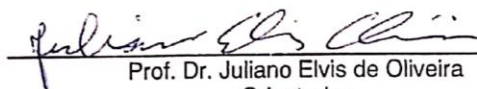
1. Hemostasia. 2. Quitosana. 3. Policaprolactona. I. Oliveira, Juliano Elvis de. II. Batista, André Ulisses Dantas. III. Título.

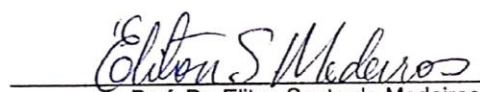
UFPB/BC

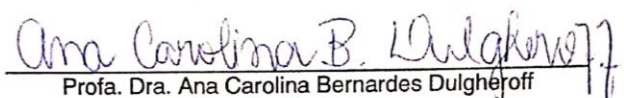
ALESSANDRA GABRIELA LEONEL FONSECA

CARACTERIZAÇÃO DE ESPONJAS NANOESTRUTURADAS DE
QUITOSANA E POLICAPROLACTONA PARA HEMOSTASIA

Banca Examinadora


Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira
Orientador


Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros
Examinador - UFPB


Profa. Dra. Ana Carolina Bernardes Dulgheroff
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Zenira. Que não está mais entre nós, mas sempre será meu maior exemplo de fé, perseverança, coragem e força! Sei que onde estiveres estás sempre olhando por mim!

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me fortalece e capacita para vencer os obstáculos em meu caminho e por me permitir concluir mais essa etapa em minha vida profissional!

Ao meu esposo Marcel, meu porto seguro! Agradeço por sempre torcer por mim, por todo apoio, confiança e amor de sempre!

Ao meu pai pela torcida e apoio durante mais essa jornada!

A minha cunhada Larissa e minha sogra Diana, pelo apoio e torcida e todo carinho a mim dispensados.

Ao meu orientador Juliano Elvis, pela oportunidade de conhecer novas perspectivas na pesquisa.

Ao meu co-orientador André Ulisses, por todo apoio, disponibilidade e atenção dispensadas nesse período.

À Jefferson por sua disponibilidade e ajuda durante os ensaios de hemaglutinação.

A Rebeca Tibau por estar sempre disposta a ajudar e dividir seus conhecimentos.

À todos professores que compõem o PPGO-UFPB. Em especial Lúcio e Eliton que cederam seus laboratórios para que essa pesquisa fosse realizada.

NOTAS PRELIMINARES

A presente Dissertação foi redigida conforme o Manual para Normatização da Defesa do Trabalho Final proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, adotando o formato alternativo (Anexo A). O artigo científico que compõe este trabalho de Dissertação foi redigido de acordo com as exigências da revista a ser enviado (Materials Letters).

RESUMO

Introdução: A medicina regenerativa tem avaliado os efeitos biológicos de polímeros naturais, na tentativa de criar materiais que possam ser usados para fins de reparo tecidual, como a hemostasia. Dentre estes materiais podemos destacar a quitosana que tem sido estudado devido sua propriedade hemostática. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo caracterizar esponjas de blendas constituídas por quitosana (QS) e policaprolactona (PCL) para possível utilização como agente hemostático tópico. **Material e Métodos:** Foram preparadas soluções de quitosana em ácido acético a 1% e de PCL em acetona. Estas foram associadas nas seguintes proporções volumétricas (v/v): 100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100, e então congeladas a -80 °C e logo após liofilizadas para formar as esponjas, conforme a metodologia *freeze-drying*. As amostras foram submetidas a caracterizações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e uma avaliação da interação das esponjas com tecido sanguíneo através do ensaio de hemaglutinação. **Resultados:** Foi possível observar a formação de esponjas de quitosana (QS) e QS/PCL, já quando foi utilizada a solução pura do PCL, observou-se que não houve a formação da esponja. Nos espectros de FTIR observou-se que não houve mudanças significativas da frequência característica dos grupos funcionais quando analisamos as esponjas de QS/PCL se comparados aos espectros dos polímeros puros. O aspecto de hemaglutinação positiva foi observado nos poços que continham as esponjas de quitosana pura e QS75/PCL25. Os valores de hemólise foram QS:12,7%; QS50/PCL50: 9,6%; QS75/PCL25: 23,2%; QS25/PCL75: 6,5% e PCL: 3,52%. **Conclusão:** As blendas de QS/PCL, desenvolvidas no presente estudo, foram capazes de formar esponjas, apresentando características físico-químicas intermediárias entre os materiais, bem como capacidade hemaglutinante, constituindo assim uma possível alternativa de agente hemostático tópico para utilização biomédica.

Descritores: Hemostasia, Quitosana, Policaprolactona.

ABSTRACT

Introduction: Regenerative medicine has analyzed biological effects of natural polymers, as an attempt to create materials which can be used for tissue repair purposes, such as hemostasis. Among these materials we can highlight the chitosan that has been studied because of its hemostatic property. **Objective:** This study aimed to characterize sponges made of chitosan (CS) and polycaprolactone (PCL) blends for possible use as a topical hemostatic agent. **Material e Methods:** Chitosan solutions were prepared in 1% acetic acid and PCL in acetone. These were associated in the following volumetric proportions (v/v): 100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100, then they were frozen at -80°C and lyophilized to form the sponges by a freeze-drying method. The samples were subjected to characterizations of Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). It was held also an assessment of the interaction between sponges and blood tissue through the hemagglutination assay. **Results:** It was possible to observe the formation of chitosan sponges (CS) and CS/PCL, while when the solution of the pure PCL was used, it was observed that there was no sponge formation. The FTIR spectra revealed that there were no significant changes in the characteristic frequency of the functional groups when analyzed CS/PCL sponges when compared to spectra of pure polymers. The positive aspect hemagglutination was observed in the wells containing the pure chitosan sponges and CS75/PCL25. The hemolysis values were CS: 12.7%; CS50/PCL50: 9.6%; CS75/PCL25: 23.2%; CS25/PCL75: 6.5% e PCL: 3.52%. **Conclusion:** The blends of CS/PCL developed in this study were able to form sponges which showed intermediate chemical-physical characteristics between the materials, as well as hemagglutinating capacity, thus constituting a feasible alternative topical hemostatic agent for biomedical use.

Key words: Hemostasis, Chitosan, Polycaprolactone.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 CAPÍTULO 1.....	5
3 CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS.....	18
ANEXOS.....	20
A – Normas para defesa da Dissertação.....	20
B – Parecer consubstanciado do CEP.....	21

1. Introdução

A hemostasia é um componente crítico para a preservação da estabilidade hemodinâmica e visibilidade operatória durante uma cirurgia. Inicialmente, ela é obtida através da aplicação de uma pressão direta para dar tempo para a cascata de coagulação criar fibrina e o tampão plaquetário. Outros métodos de primeira linha para hemostasia em cirurgia incluem reparo ou ligadura do vaso sangrante com suturas, cliques ou grampos e coagulação do sítio de sangramento com um dispositivo baseado em energia térmica. Quando estes métodos são insuficientes para proporcionar hemostase adequada, agentes hemostáticos tópicos podem ser usados para aumentar a criação de um coágulo durante a cirurgia (OVERBEY; JONES; ROBINSON, 2014).

Existem vários agentes hemostáticos disponíveis, mas ainda não está disponível um agente hemostático tópico e cirúrgico ideal para tratamento de hemorragias súbitas. Este agente ideal hemostático deve possuir mecanismos de coagulação nativos que não passem através dos sistemas de filtração residual, deve apresentar baixo custo, tem que ser de fácil aplicação e exigir o mínimo de supervisão, deve apresentar longa duração com baixo risco, deverá ser capaz de conseguir a hemostase dentro do período de tempo necessário, e não causar reações alérgicas (MERCY; HALIM; HUSSEIN, 2012). Dentre os materiais estudados para uso hemostático, podemos destacar a quitosana.

A quitosana é um biopolímero derivado da desacetilação da quitina, um polímero natural encontrado no exoesqueleto de crustáceos, insetos e parede celular de fungos (SALGADO et al, 2012; TAVARIA et al, 2013; ALLAKER; MEMARZADEH, 2014). Este biomaterial tem sido muito utilizado em diferentes áreas biomédicas devido suas vantagens, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliabilidade, não-antigenicidade e não-toxicidade, e atividade anti-microbiana, bem como bioadesão e afinidade celular. (WAN et al, 2009).

Este polímero apresenta uma estrutura química única formando um polímero linear, com alta densidade de carga e de grupos reativos bem como

inúmeras ligações de hidrogênio. Estas características permitem que esse biomaterial seja facilmente processado e apresente biocompatibilidade (TAVARIA et al, 2013; RABEA et al, 2003).

Dentre as propriedades biológicas descritas na literatura para a quitosana, as mais relevantes são: a capacidade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, hemostática, cicatrizante, analgésica, e coagulante, sendo apta a parar hemorragias (DIAS et al., 2013; MALHEIRO et al, 2010; SPINNETO et al, 2008; TAVARIA et al, 2013).

Visto que a quitosana consiste em moléculas com múltiplas cargas positivas, este polissacarídeo pode interagir com moléculas que possuem cargas negativas, como os glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular (SALGADO et al, 2012).

Devido à sua natureza catiônica a quitosana pode ser considerada como um potencial agente hemostático. Uma vez que as aminas são protonadas ao pH ácido, a carga positiva é transferida para a cadeia da proteína. Como a maioria das membranas biológicas apresenta natureza aniônica, a quitosana seria capaz de aderir fortemente a elas através de interações eletrostáticas. A hemostasia provocada pela quitosana não está relacionada à cascata de coagulação sanguínea normal, que resulta na formação de fibrina. Sendo, então, atribuída à interação física entre a quitosana e as membranas celulares dos glóbulos vermelhos. Acredita-se que eritrócitos ligados a quitosana formam uma rede local, independentemente de outros agentes hemostáticos (LIMA et al, 2015; RAO, SHARMA, 1997).

Um estudo avaliou *in vitro* a capacidade de coagulação e adesão de plaquetas da quitina, quitosana e seus derivados e observou que a quitosana, reduziu significativamente o tempo total de coagulação do sangue e atribuiu essa capacidade hemostática ao aumento da aglutinação de glóbulos vermelhos, afirmando que a hemostasia causada pela quitosana não seguiu a cascata de coagulação normal, que resulta na formação de fibrina. Na verdade, foi atribuída à interação física entre a quitosana e as membranas celulares dos glóbulos vermelhos (Janvikul et al., 2006).

Ao avaliar os efeitos de um curativo hemostático de quitosana sobre a perda de sangue após a lesão hepática grave em suínos, verificou-se que a perda de sangue pós-tratamento foi reduzida no grupo da quitosana e que o mesmo foi capaz de controlar a hemorragia venosa melhorando a hemostasia (Pusateri et al, 2003).

A policaprolactona (PCL) é um polímero sintético, que é um poliéster alifático de cadeia linear com caráter semicristalino derivado da síntese química do petróleo. É um biomaterial biodegradável e biocompatível, amplamente utilizado em aplicações biomédicas, em particular na área de engenharia de tecidos (FERNANDES, 2011; WAN et al, 2009). O PCL é um material termoplástico que pode ser facilmente transformado em complexo tridimensional (scaffolds) utilizando tecnologias convencionais devido ao seu baixo ponto de fusão, e baixa viscosidade. Além disso, suas propriedades mecânicas e mecanismo de degradação podem ser alterados quimicamente (CRUZ et al, 2009).

É um material aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), e tem sido utilizado para diversos fins clínicos como reconstrução de tecidos como o osso, a pele, tecido nervoso, retina, entre outros. Para além destas aplicações este polímero também tem sido usado noutras aplicações biomédicas como fios de sutura e na liberação controlada de fármacos. A principal desvantagem deste polímero é a sua hidrofobicidade, sendo insolúvel em qualquer tipo de solução aquosa, o que dificulta a adesão celular, bem como interações biológicas com o meio (FERNANDES, 2011; MARTINS, 2011). Além disso, PCL tem uma taxa de degradação lenta em comparação com outros poliésteres alifáticos, devido à sua alta cristalinidade. Vários esforços têm, portanto, sido dirigidos para superar estas desvantagens, sendo a estratégia mais comum a mistura de PCL com outros polímeros sintéticos ou naturais (WAN et al, 2009).

A associação entre dois polímeros é uma abordagem para o desenvolvimento de novos biomateriais exibindo combinações de propriedades que não podiam ser obtidas por polímeros individuais. Blendas feitas de

polímeros sintéticos e naturais podem absorver uma vasta gama de propriedades físico-químicas e de técnicas de processamento de polímeros sintéticos, bem como a biocompatibilidade e as interações biológicas dos polímeros naturais. Com base no que foi descrito, as respectivas características da quitosana e da policaprolactona (PCL) associadas resultam na formação de um biomaterial superior, onde podemos observar a presença de propriedades mutuamente complementares. É, por conseguinte, razoável esperar que suas deficiências individuais possam ser superadas a partir da formação de blendas entre eles (SARASAM; MADIHALLY, 2005; WAN et al, 2009).

Esta pesquisa teve como objetivo caracterizar esponjas de blendas poliméricas constituídas de quitosana e PCL para possível utilização como agente hemostático tópico.

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico: **Materials Letters**

DEVELOPMENT OF CHITOSAN SPONGES WITH PCL NANOPARTICLES AS HOMEOSTATIC AGENTS

Alessandra G. L. Fonseca^a; Rebeca T. Aguiar^a; André U. D. Batista^a; Jefferson M. Lima^b; Lucio R. C. Castellano^a; Juliano E. Oliveira^{c*}

a Health Science Center, Federal University of Paraiba (UFPB), CEP 58.051-900, João Pessoa, Paraiba, Brazil

b Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

c Department of Engineering, Federal University of Lavras, CEP 37.200-000, Lavras, MG, Brazil.

Corresponding authors at: Postgraduate Program in Dentistry, Health Science Center (CCS), Federal University of Paraiba (UFPB), CEP 58.051-900, João Pessoa, Paraiba, Brazil

E-mail addresses: alessandragaby@hotmail.com; *juliano.oliveira@deg.ufla.br

ABSTRACT

This study aimed to characterize sponges made of chitosan (CS) and polycaprolactone (PCL) blends for possible use as a topical hemostatic agent. Chitosan solutions and PCL nanoparticles were associated in the following volumetric proportions (v/v): 100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100, then the freeze-dried. The samples were subjected to characterizations of Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and hemagglutination assay. It was possible to observe the formation of CS/PCL sponges with interconnected porous morphology. The blends were able to form sponges which showed intermediate chemical-physical characteristics between the polymers, as well as hemagglutinating capacity.

Keywords: Hemostasis, Chitosan, Polycaprolactone

1 INTRODUCTION

Hemostasis is a critical component for the preservation of hemodynamic stability and operative visibility during surgery. Initially, it is obtained by applying direct pressure, offering time to the coagulation cascade create fibrin and platelet clot. When this method are insufficient, topical hemostatic agents can be used [1].

Chitosan (CS) is a polymer derived from the deacetylation of chitin, a natural polymer found in the exoskeleton of crustaceans and insects and cell walls of fungi [2]. This material has been used in many biomedical areas as consequence of their advantages such as biocompatibility, biodegradability, hydrophilicity, non-toxicity and non-antigenicity, and anti-microbial activity as well as cell bioadhesion and cell affinity [3].

PCL is a synthetic polymer which is a linear aliphatic polyester with semicrystalline character derived from petroleum chemical synthesis. It is a biodegradable and biocompatible biomaterial, widely used in biomedical applications [3].

So, in this work, we adopted the blending strategy by combining CS with poly(ϵ -caprolactone) (PCL), to improve the application of these materials.

In this context, here we develop CS-PCL sponges for possible use as a topical hemostatic agent.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Ethical considerations

This study was conducted with the approval of the Research Ethics Committee, Health Science Center, Federal University of Paraiba (CAAE: 45844615.6.0000.5188).

2.2Sponge Preparation

2.2.1 PCL Nanoparticles synthesis

PCL nanoparticles were made by the emulsification and solvent evaporation methods with some modifications [4,5]. Was diluted 100 mg of PCL ($50.000 \text{ g.mol}^{-1}$, CapaTM 6500, Perstorp, Sweden) in 27 mL of acetone (Química Moderna, São Paulo, Brazil) under magnetic stirring (Fisatom, Brazil) at 37 °C. Then, 72 μL of polysorbate 80 (Tween[®] 80) (surfactant) (Sigma Aldrich, Brazil) was added and the solution remained under stirring at room temperature for 15 minutes. This organic phase was dropped (Pump 11, Harvard Aparattus, USA) into 53 mL of distilled water with a drip rate of $330 \mu\text{L.min}^{-1}$. The solution was stirred up to complete acetone evaporation (24 hours) and the lost volume was completed with distilled water.

2.2.2 Chitosan solution

For CS solution preparation, it was used 250 mg of CS (Sigma Aldrich, Brazil), 0.5 mL of acetic acid (Química Moderna, São Paulo, Brazil) and 49.5 mL of distilled water which were left on the magnetic stirrer at room temperature for 24 hours until complete solubilization occur.

2.2.3 Sponge preparation

Chitosan solutions and PCL nanoparticles were associated in the following volumetric proportions (v/v): 100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100, whose nomenclature was 100CS, 75CS, 50CS, 25CS and 100PCL. These solutions were stored in a 45 mL Falcon tube and were frozen at -10 °C and packed in a freeze-dryer equipment (Terroni brand, model Enterprise II) for 36 hours meaning the sponge formation.

2.3 Morphological characterization

The sponge morphologies were analyzed using a Scanning Electron Microscopy (SEM) (FEI Quanta 450, Hillsboro, USA). Previously, they were fixed in stubs with carbon tape and metallized with gold layers, 90 seconds to each overlay, in a sputter coater (K550X, Emitech, United Kingdom).

2.4 Chemical analysis

Chemical analysis of the sponges was performed with Fourier Transformation Infrared (FTIR) Spectroscopy (IRPrestige-21, Shimadzu, Kyoto, Japan). The spectra obtained contemplated wavelength ranging from 4000 to 600 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} and 20 scans.

2.5 Tests on erythrocytes

The collection and preparation of erythrocytes was made as described by Lima et al. [6].

For the hemagglutination assay, the sponges were cut into 3 mm diameter disks. As control groups, sterile saline 0.9% (w/v) NaCl (negative), and distilled water (positive) were used.

The hemagglutination tests were performed in accordance with immunological assay protocol of Banerjee et al. [7]. The visual observation and photography were taken 1 hour after inoculation to verify the formation of erythrocytes buttons or the presence of hemagglutination.

The hemolytic activity of the above reagents was investigated according to the Singhal and Ray [8] method. According to the index recommended by Hartmann et al. [9], a percentage below 5% was interpreted as acceptable hemolysis.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Synthesis of sponges

It was possible to observe that the CS and CS-PCL sponges are homogenous, white and without phase separation solid. The solution 100PCL did not sponge, only powder was left, once this method is to obtain nanoparticles and it is in the dried form. During the lyophilization, the mechanism responsible for the formation of the pores is phase separation of water and solid polymer. After freezing, this phase forms ice crystals that undergo sublimation during the lyophilization, leaving behind a porous network in the polymeric phase [10,11].

Sarasam and Madihally [10] also produced CS-PCL scaffolds by freeze-drying methods and obtained similar porous structures to the present study, however, less stable due to the use of higher concentration of acetic acid.

3.2 Morphological characterization

Fig. 1 shows SEM images of neat and blend sponge surfaces. The addition of PCL nanoparticles in CS solution influenced their external morphology. Pure chitosan solutions formed a highly interconnected porous network with variable pore sizes (Fig. 1a-b). The interconnection of the 75CS (Fig. 1c) foam was maintained, like 100CS, even though the surfaces were rough (Fig. 1d), the pores were larger and randomly distributed. 50CS tended to have holes (Fig. 1e) and lamellar layers (Fig. 1f) in the sponge structure. 25CS showed leaf form (Fig. 1g) with few holes and increased rough attributed to the beginning of nanoparticle formation (Fig. 1h). While in 100PCL, we obtained agglomerates of PCL nanoparticle (Fig. 1i-j).

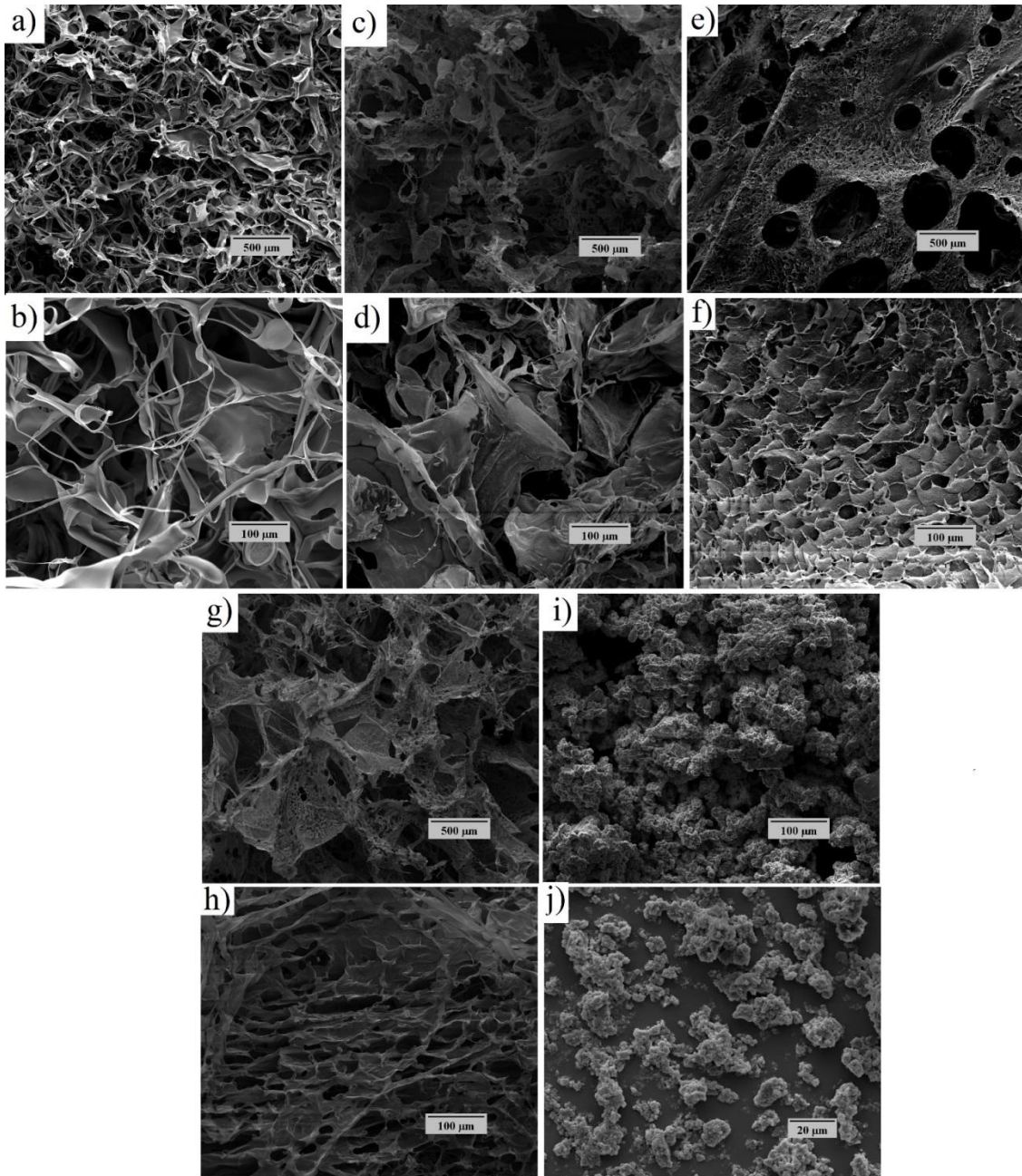


Fig. 1. SEM microphotographs of the sponge surfaces (a-b) 100CS, (c-d) 75CS, (e-f) 50CS, (g-h) 25CS and (i-j) 100PCL

This increment in roughness when PCL concentration increases also was reported by Neves et al. [12] and Malheiro [13] in their CS-PCL blends studies. Neves et al. [12] and Wang et al. [14] show that the less PCL the scaffold had, more was its organization, repetition and orientation in short

distances, but the increase in PCL concentration led to higher porosities and pore sizes in large distances. In relation to PCL particles, its size and shape are in agreement with those found by Fessi et al. [4] and Badri et al. [5].

3.3 Chemical analysis

Characteristic peaks of the blends show that 75CS and 50CS were closer to CS profile due to the two N-H vibrations, whereas 25CS represented better PCL behavior because of carbonyl (C=O) ester stretching (Fig. 2).

There was no carbonyl stretch in $1725\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ that could confirm any reaction between amine group of CS and carbonyl group of PCL to form amide bond. Then, it results that there was no detectable chemical bonding between these polymers and indicates that occurred just the physical mixture. This finding corroborate earlier studies [11, 13].

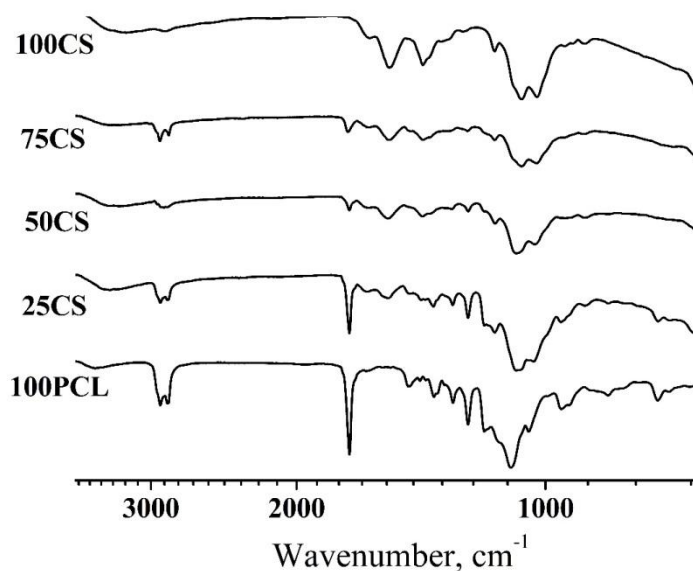


Fig. 2. FTIR spectra of the CS-PCL sponges

3.4 Hemagglutination Assay

A positive hemagglutination was interpreted as a homogeneous reddish appearance in the well bottom, as described by Lima et al. [6]. This aspect was observed in wells containing 100CS, 75CS and 50CS sponges (Fig. 3). The other samples 25CS and PCL nanoparticles (5mg/ml) diluted solution showed the precipitation of erythrocytes button in the center of the well, corresponding to the absence of hemagglutination.

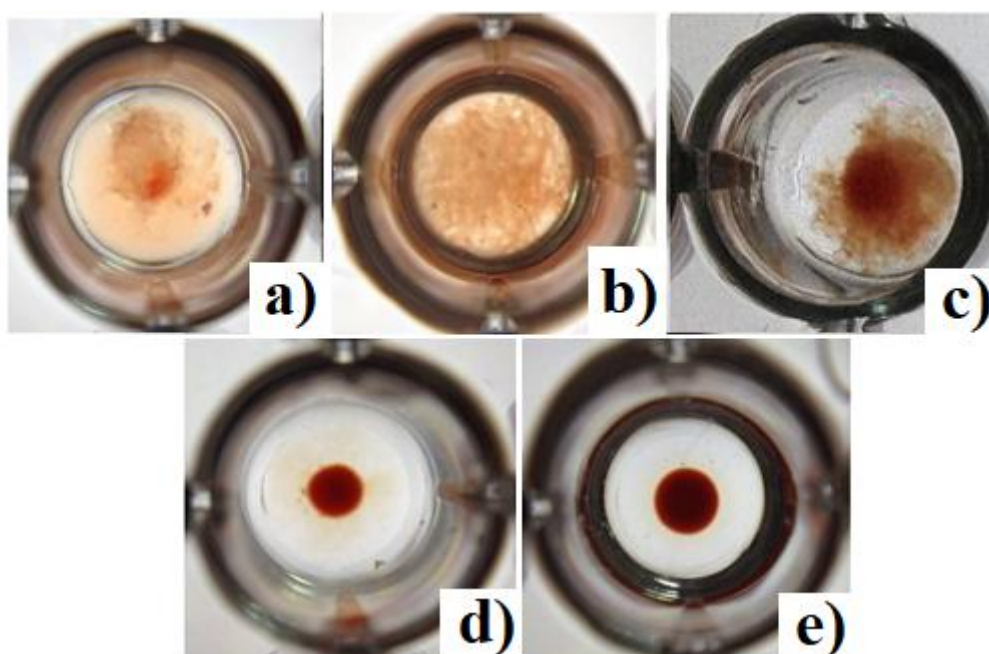


Fig. 3. Macroscopic aspect of hemagglutination test. Wells containing the samples a) 100CS, b) 75CS and c) 50CS d) 25 CS and e) 100PCL.

Several studies have analyzed the interaction of chitosan with blood cells, and even using different methodologies, their results end up agreeing with

the present study, the chitosan has hemagglutinating capacity independent of its concentration [6,15,16].

The hemolysis percentage of the samples were: 100CS=12,7%; 75CS=23,2%; 50CS=9,6%; 25CS=6,5%; 100PCL=3,5%. Only the pure PCL sample presented a value lower than 5%, however, its value was acceptable according to Hartmann et al. [9]. The increases the proportion of PCL in the samples, the percentage of hemolysis decreases, suggesting that this material interferes positively associated to chitosan in the reduction this undesired event to the living organism.

4 CONCLUSION

It was possible to form sponges from blends of CS and PCL nanoparticles using an aqueous medium and freeze-drying method. The sponges were uniform and had porous appearance. The scaffolds with 50 and 75% of CS performed similarly as CS and that with 25% CS with PCL. Sponges with up to 50% CS showed hemagglutinating capacity, demonstrating the potential use these as topical hemostatic agents.

REFERENCES

- [1] D.M. Overbey, E.L. Jones, T.N. Robinson, How Hemostatic Agents Cascade, AORN J. 100 (2014) 148–159.
- [2] C.L. Salgado, E.M.S. Sanchez, J.F. Mano, A.M. Moraes, Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application, J. Mater. Sci. 47 (2012) 659–667.

- [3] Y. Wan, B. Xiao, S. Dalai, X. Cao, Q. Wu, Development of polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 719–724.
- [4] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammouy, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.* 55 (1989) 1–4.
- [5] W. Badri, K. Miladi, Q.A. Nazari, H. Fessi, A. Elaissari, Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 516 (2017) 238–244.
- [6] J.M.D. Lima, R.R. Sarmiento, J.R.D. Souza, F.A. Brayner, A.P.S. Feitosa, R. Padilha, L.C. Alves, I.J. Porto, R.F.B.D. Batista, J.E.D. Oliveira, E.S.D. Medeiros, P.R.F. Bonan, L.R. Castellano, Evaluation of hemagglutination activity of chitosan nanoparticles using human erythrocytes, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 3–9.
- [7] N. Banerjee, S. Sengupta, A. Roy, P. Ghosh, K. Das, S. Das, Functional alteration of a dimeric insecticidal lectin to a monomeric antifungal protein correlated to its oligomeric status, *PLoS One.* 6 (2011).
- [8] J.P. Singhal, A.R. Ray, Synthesis of blood compatible polyamide block copolymers, *Biomaterials.* 23 (2002) 1139–1145.
- [9] R.C. Hartmann, D.E. Jenkins, A.B. Arnold, Diagnostic specificity of sucrose hemolysis test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Bood J.* 35 (1970) 462–475.

- [10] A. Sarasam, S. V. Madihally, Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications, *Biomaterials*. 26 (2005) 5500–5508.
- [11] A.R. Sarasam, R.K. Krishnaswamy, S. V. Madihally, Blending chitosan with polycaprolactone: Effects on physicochemical and antibacterial properties, *Biomacromolecules*. 7 (2006) 1131–1138.
- [12] S.C. Neves, L.S. Moreira Teixeira, L. Moroni, R.L. Reis, C.A. Van Blitterswijk, N.M. Alves, M. Karperien, J.F. Mano, Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair, *Biomaterials*. 32 (2011) 1068–1079.
- [13] V.N. Malheiro, S.G. Caridade, N.M. Alves, J.F. Mano, New poly(ϵ -caprolactone)/chitosan blend fibers for tissue engineering applications, *Acta Biomater*. 6 (2010) 418–428.
- [14] Y. Wan, H. Wu, X. Cao, S. Dalai, Compressive mechanical properties and biodegradability of porous poly(caprolactone)/chitosan scaffolds, *Polym. Degrad. Stab*. 93 (2008) 1736–1741.
- [15] S.B. Rao, C.P. Sharma, Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential, *J. Biomed. Mater. Res*. 34 (1997) 21–28.
- [16] Q.Z. Wang, X.G. Chen, Z.X. Li, S. Wang, C.S. Liu, X.H. Meng, C.G. Liu, Y.H. Lv, L.J. Yu, Preparation and blood coagulation evaluation of chitosan microspheres, *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 19 (2008) 1371–1377.

4. Conclusão

Neste estudo, foi possível a formação de esponjas a partir de blendas entre quitosana e policaprolactona (PCL) através do método *freeze-drying*. As esponjas apresentaram-se homogêneas e com aspecto poroso. Como se pode esperar das blendas, a mistura que ocorreu entre os polímeros foi apenas física e não interferiu nas características físico-químicas dos materiais utilizados. As esponjas com quitosana produzidas neste estudo apresentaram capacidade hemaglutinante, demonstrando o potencial uso futuro das mesmas como agentes hemostáticos tópicos para uso biomédico.

5. REFERÊNCIAS

ALLAKER, R.P.; MEMARZADEH, K. Nanoparticles and the control of oral infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.43, p. 95– 104, 2014.

CRUZ D.M.G. et al. Physical interactions in macroporous scaffolds based on poly (3-caprolactone)/chitosan semi-interpenetrating polymer networks. **Polymer**. v.50, p. 2058–2064, 2009.

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

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **J. Biotec. Biodivers**, v.4, n.3, p.184-191, Ago. 2013.

FERNANDES, M. S. **Membranas de policaprolactona e quitosano para aplicação estomatológica**. Dez. 2011. 93f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

LIMA J. M. et al. Evaluation of Hemagglutination Activity of Chitosan Nanoparticles Using Human Erythrocytes. **BioMed Research International**. P.1-6, 2015.

MALHEIRO, V.N. et al. New poly(e-caprolactone)/chitosan blend fibers for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v.6, p. 418–428, 2010.

MARTINS, J. D. S. **Membranas Compósitas de Policaprolactona/ Hidroxiapatite para Aplicação Estomatológica**. Set. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

MERCY H.P; HALIM A.S.; HUSSEIN A.R. Chitosan-derivatives as hemostatic agents: their role in tissue regeneration. **Regenerative Research**. v.1, n.1, p. 38-46, 2012.

OVERBEY, D. M; JONES, E. L.; ROBINSON, T. N. How Hemostatic Agents Interact With the Coagulation Cascade. **AORN Journal**, v.100, n.2, p.149-156, ago. 2014.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, v.4, n.6, p.1457-1464, 2003.

RAO, S.B.; SHARMA, C.P. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.34, p. 21–28. 1997.

SALGADO, C. L. et al. Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. **J Mater Sci**, v.47, p. 659–667, 2012.

SARASAM, A.; MADIHALLY, S.V. Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v.26, p.5500–5508, 2005.

SPIN-NETO, R. et al. 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, 2008.

TAVARIA, F. K. et al. Chitosan as a dental biomaterial: state of the art. **Braz. J. Biom. Eng.**, v.29, n.1, p.110-120, Mar. 2013.

WAN, Y. et al. Development of polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 20, p. 719–724, 2009.

ANEXOS

A – Normas para a Defesa da Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB

Formato alternativo.

- Capa
- Folha de rosto (primeira folha interna)
- Ficha catalográfica (verso da folha de rosto)
- Folha de aprovação
- Dedicatória (Opcional)
- Agradecimentos (Opcional)
- Epígrafe (Opcional)
- Resumo (com no máximo quinhentas palavras)
- Abstract (com no máximo quinhentas palavras)
- Lista de Abreviaturas e Siglas (Opcional)
- Sumário

1. Introdução (trata-se, como no formato tradicional, da parte inicial do texto, da formulação clara e simples do tema investigado, constando a delimitação do assunto tratado, sua justificativa e objetivos da pesquisa)

2. Capítulos (devem ser inseridas as cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem. Cada capítulo deve conter sua indicação, seguido do número (em arábico) correspondente. Ex.: Capítulo1, Capítulo 2 e assim sucessivamente)

3. Discussão ou Considerações Gerais (de caráter opcional, esta parte poderá conter argumentos para estabelecer relações entre os artigos apresentados nos capítulos)

4. Conclusão

- Referências
- Anexo (Opcional)
- Apêndices (Opcional)

B – Parecer consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Desenvolvimento de Espumas Hemostáticas Nanoestruturadas baseadas em Biopolímeros		
Pesquisador: Alessandra Gabriela Leonel Fonseca		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 45844615.6.0000.5188		
Instituição Proponente: Programa de Pós-graduação em Odontologia		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.141.855		
Data da Relatoria: 25/06/2015		
Apresentação do Projeto:		
Será verificada neste estudo a hipótese de que a partir da mistura entre os biopolímeros quitosana e PCL seja desenvolvida uma espuma hemostática para possível utilização na área odontológica.		
Objetivo da Pesquisa:		
Objetivo Primário:		
Produzir, caracterizar e verificar a atividade hemostática de espumas nanoestruturadas de quitosana/policaprolactona.		
Objetivo Secundário:		
Caracterizar as propriedades de engenharia de interesse em aplicações odontológicas das espumas obtidas. Determinar a atividade hemostática das espumas de quitosana produzidas.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Riscos:		
As punções venosas para exames laboratoriais podem, embora sejam raras, resultarem em dor no local da punção, manchas rochas transitórias chamadas de equimoses, desconforto e a possibilidade de infecção.		
Benefícios:		
Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N		
Bairro: CASTELO BRANCO		
CEP: 58.051-900		
UF: PB		
Município: JOÃO PESSOA		
Telefone: (33)3216-7791		
Fax: (33)3216-7791		
E-mail: etecoca@cca.ufpb.br		

Continuação do Parecer: 1.141.002

Com base nos resultados obtidos, espera-se que, em longo prazo, possamos desenvolver um novo material hemostático para uso odontológico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e metodologia bem fundamentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

os termos de apresentação obrigatória atendem aos requisitos formais. No entanto como recomendação é necessário que a pesquisadora insira o espaço para assinatura do participante da pesquisa nas duas vias do TCLE.

Recomendações:

Como recomendação a pesquisadora deve inserir espaço para assinatura do participante da pesquisa nas duas vias do TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou de parecer favorável a execução desta pesquisa com a recomendação de que seja inserido espaço para assinatura do participante da pesquisa nas duas vias do TCLE.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

JOAO PESSOA, 07 de Julho de 2015

Assinado por:

Ellane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N CEP: 58.051-900
Bairro: CASTELO BRANCO
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: elcacao@cca.ufpb.br