

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

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
HEMATOLÓGICAS DE NANOFIBRAS DE TITÂNIO
(TiO₂) PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE SOLUTION
BLOW SPINNING (SBS)**

Sara Brito Silva Costa Cruz

SAPIENTIA AEDIFICAT

2018

SARA BRITO SILVA COSTA CRUZ

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES HEMATOLÓGICAS DE
NANOFIBRAS DE TITÂNIO (TiO₂) PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE
SOLUTION BLOW SPINNING (SBS).**

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. Lúcio Roberto Cançado Castellano

Coorientador: Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista

João Pessoa

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C957a Cruz, Sara Brito Silva Costa.

Avaliação de Propriedades Hematológicas de Nanofibras de Titânio (TiO₂) Produzidas pelo Método de Solution Blow Spinning (SBS) / Sara Brito Silva Costa Cruz. - João Pessoa, 2018.

57 f. : il.

Orientação: Lúcio Roberto Cançado Castellano.

Coorientação: André Ulisses Dantas Batista.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

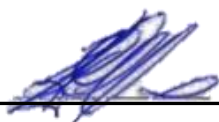
1. Nanofibras. 2. Titânio. 3. Hemostasia. 4. Hemólise. 5. Hemaglutinação. I. Castellano, Lúcio Roberto Cançado. II. Batista, André Ulisses Dantas. III. Título.

UFPB/BC

SARA BRITO SILVA COSTA CRUZ

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES HEMATOLÓGICAS DE
NANOFIBRAS DE TITÂNIO (TiO₂) PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE
SOLUTION BLOW SPINNING (SBS).**

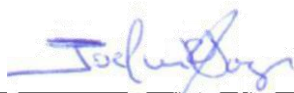
Banca Examinadora



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano
Orientador - UFPB



Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan
Examinador - UFPB



Prof. Dra. Joelma Rodrigues Souza
Examinador – UFPB

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo por ser fonte de apoio, incentivo e otimismo em todos os momentos. Fazendo com que a cada dia eu possa acreditar mais em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, que em sua infinita bondade vem sempre derramando suas graças sobre mim e me dando forças para levantar a cada dia e aceitar novos desafios.

Ao meu esposo **Ivon Filho** que ao longo dos últimos anos se tornou luz na vida e todos os dias me faz enxergar o quanto sou sortuda por tê-lo ao lado. Nada disso seria possível sem você.

Aos meus **Pais** Clidenor e Edna e meus **irmãos** (Clide, Sayonara e Ana), que mesmo distantes se fazem presentes e torcem como ninguém para que todos meus objetivos se concretizem. Obrigada por serem meu alicerce!

Aos meus **sogros** por terem se tornado meus segundos pais, se preocupando e zelando com carinho e orações por tudo aquilo que me proponho a fazer.

Aos meus **colegas de mestrado**, em especial Tereza, Ísis, Panmella, Marcel e Marília que sempre estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada, compartilhando aflições, medos e inseguranças. Mas, também multiplicando companheirismo, amizade e celebrando cada conquista. Obrigada por terem tornado as coisas mais leves e por toda ajuda e tempo que cada um desprende para mim.

A **Fabinho** por ser tão prestativo e estar sempre a postos quando precisei (mesmo que isso implicasse em várias coletas) e a **Alê** pela ajuda e dicas com o inglês. A companhia de vocês muitas vezes era uma válvula de escape no meio das turbulências. Thanks for everything!

Ao meu **orientador** Prof. Lúcio, por ter me recebido e acolhido durante esses dois anos. Sempre contribuindo com boas ideias e trazendo sua calma e expertise para que todas as coisas fluíssem da melhor maneira possível.

Ao meu **Co orientador** Prof. André Ulisses que me acompanha desde os tempos de graduação e que mais uma vez, mesmo diante de tantas obrigações, deu imensas contribuições e demonstrou uma paciência ímpar ao longo da construção desse trabalho. Obrigada por estar presente, junto com **Roberta**, ajudando a trilhar tudo aquilo que foi essencial para que chegássemos a um resultado final.

Ao professor **Romualdo Menezes** pela parceria e todo empenho da sua equipe do Laboratório de Tecnologia de Materiais da UFCG, para produzir todo material que foi usado nessa pesquisa. Agradecendo especialmente a **Hellen** por ter se tornado minha maior ponte entre Campina e João Pessoa e principalmente por ter me ajudado sempre e demais em todos os quesitos que envolviam o mundo da engenharia de materiais. Que essa ligação ainda possa render muitos frutos

À Professora **Joelma** por aceitar fazer parte da banca e ter sido uma peça fundamental para o entendimento e o desenvolvimento dos testes na área de hematologia.

Ao Professor **Paulo Bonan**, por toda ajuda e as ricas contribuições e lições de aprendizagem que tive a honra de receber.

Às técnicas **Rebecca e Patrícia** pela convivência e apoio nos ambientes de laboratório.

A **Alan** que foi meu maior achado durante essa reta final do mestrado. Obrigada por todas as coletas, todo empenho e todas as horas de bancada nas quais você estava presente contribuindo ainda mais para que tudo corresse bem. Você é meu Friend do coração.

A **Jefferson** pelo auxílio e treinamento nas metodologias adotadas.

A todos os **voluntários** que gentilmente e literalmente deram o sangue para que essa pesquisa fosse realizada e concluída.

Por fim, agradeço também as agências de fomento CAPES e CNPq pelos subsídios que permitiram minha dedicação exclusiva à produção deste trabalho.

RESUMO

Hemorragias são complicações que podem ocorrer após traumas ou procedimentos de natureza cirúrgica. Na cavidade bucal, tal fenômeno pode acontecer principalmente pela alta vascularização presente nessa região e tal fato deve levar o cirurgião dentista a adotar medidas que favoreçam uma boa hemostasia. Embora diversos tipos de agentes hemostáticos estejam disponíveis no mercado, alguns deles ainda apresentam limitações de uso e desvantagens. Nesse cenário, o potencial trombogênico e as ações no processo de coagulação vêm sendo investigados em diversos materiais, entre eles, nanofibras de titânio, que devido às suas propriedades peculiares e seu potencial biomimético, tornaram-se atraentes para numerosas aplicações. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades hematológicas e trombogênicas de três nanofibras de titânio produzidas pelo processo de Solution Blow Spinning (SBS), identificadas como HemoFiber 1, HemoFiber 2 e HemoFiber 3, trabalhadas em diferentes concentrações. Todas as fibras foram caracterizadas a partir de métodos como de análise física para determinação de molhabilidade através da mensuração do ângulo de contato, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura para imagens das superfícies. Em seguida, foram realizados testes biológicos de citotoxicidade, hemólise, hemaglutinação e aferido o tempo de coagulação através da técnica de Lee-White quando do contato das nanofibras com amostras de sangue total de voluntários saudáveis (n=10). Os materiais testados apresentaram hidrofiliidade, com ângulo de contato zero e fases cristalinas distintas. Sendo também observada boa viabilidade celular, características de hemaglutinação e capacidade de diminuição do tempo de coagulação. A viabilidade celular foi superior a cem por cento para as HemoFiber 1 e 2 e decresceu na HemoFiber 3 com o aumento das concentrações. As taxas de hemólise variaram de 0 a 18,52%, com a HemoFiber 1 apresentando os valores mais elevados. Para os tempos de coagulação os dados foram analisados a partir do teste ANOVA, considerando-se um $p < 0,05$, havendo diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos em relação ao controle (tubos secos). A HemoFiber 3 apresentou os menores tempos ($330,18 \pm 29,88$). A variação das concentrações em um mesmo grupo não foi significativa para as Hemofibers 1 e 3, enquanto a HemoFiber 2 obteve melhores tempos quando utilizada a maior concentração. Assim sendo, os resultados obtidos sugerem que

as nanofibras de TiO_2 exibem hemocompatibilidade e potencial hemostático significativo, podendo serem utilizadas como auxílio em contenção de pequenas hemorragias. No entanto, novos estudos são necessários para melhor entendimento do comportamento e das interações sanguíneas dessas nanoestruturas.

Palavras-chave: Nanofibras, Titânio, Hemocompatibilidade, Coagulação.

ABSTRACT

Hemorrhages are complications that can occur after trauma or surgical procedures. In the oral cavity, such phenomenon can happen mainly due to the high vascularization present in this region and this fact should lead the dental surgeon to adopt measures that favor good hemostasis. Although several types of hemostatic agents are available on the market, some of them still have limitations of use and disadvantages. In this scenario, the thrombogenic potential and the actions in the coagulation process have been investigated in several materials, among them, titanium nanofibers, which due to their peculiar properties and their biomimetic potential became attractive for numerous applications. Hence, this work aims to evaluate the hematological and thrombogenic properties of three titanium (TiO₂) nanofibers produced by Solution Blow Spinning (SBS) process, identified as HemoFiber 1, Hemofiber 2 and HemoFiber 3 and worked in different concentrations. All fibers were characterized using methods such as physical analysis to determine wettability by measuring the contact angle, X-ray diffraction and scanning electron microscopy for surface images. Subsequently, biological tests of cytotoxicity, hemolysis, and haemagglutination were performed. Coagulation time was measured through Lee-White technique when nanofibers were contacted with whole blood samples from healthy volunteers (n = 10). The tested materials showed high hydrophilicity, with zero contact angle and distinct crystalline phases. Good cell viability, haemagglutination characteristics and coagulation time reduction ability were also observed. Cell viability was greater than 100 percent for HemoFiber 1 and 2 and decreased on HemoFiber 3 with increasing concentrations. Hemolysis rates ranged from 0 to 18.52%, with HemoFiber 1 having the highest values. For coagulation times, the data were analyzed from the ANOVA test, considering $p < 0.05$. There was a statistically significant difference between all groups in relation to the control (dry tubes). HemoFiber 3 presented the shortest times (330.18 ± 29.88). The variation of concentrations in the same group was not significant for Hemofibers 1 and 3, while HemoFiber 2 obtained better times when used the highest concentration (C3). Thus, the obtained results suggest that TiO₂ nanofibers exhibit hemocompatibility and substantial hemostatic potential, suggesting the use in containing or controlling surgical sites minor hemorrhages. However, it is necessary

to perform new studies to better understand the behavior and blood interactions of these nanostructures.

Keywords: Nanofibers, Titanium, Hemocompatibility, Coagulation.

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI: Brain Heart Infusion

DRX: Difração de raios X

C1: Menor concentração

C2: Concentração Intermediária

C3: Maior Concentração

LABIO: Laboratório Integrado de Biomateriais

LACEC: Laboratório de Cultivo e Análise Celular

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

PBMCs: Do inglês – *Peripheral blood mononuclear cells*, podendo ser traduzido como células mononucleares do sangue periférico.

PBS: Do inglês – *Phosphate Buffer Solution*, podendo ser traduzido como solução tampão de fosfato.

SBS: Do inglês - *Solution Blow Spinning*, podendo ser traduzido como fiação por sopro em solução.

TC: Tempo de Coagulação

TiO₂: Dióxido de titânio

Ti: Titânio

θ: Ângulo de contato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Nanomateriais	03
2.2 Interações do titânio com os sistemas biológicos	04
2.3. Hemostasia	05
2.4. Agentes hemostáticos	07
3 PROPOSIÇÃO	09
3.1 Objetivo Geral	09
3.2 Objetivos Específicos	09
4 MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Delineamentos do estudo	10
4.2 Considerações éticas	11
4.3 Síntese e caracterização das nanofibras	11
4.3.1 Obtenção das nanofibras	11
4.3.2 Caracterização das nanofibras	13
4.4 Testes de contaminação e ensaios <i>in vitro</i>	13
4.4.1 Coleta de sangue periférico humano.....	14
4.4.2 Isolamento e cultivo das células mononucleares (PBMCs)	14
4.4.3 Ensaio de Citotoxicidade	15
4.4.4 Testes de hemaglutinação e hemólise	16
4.4.5 Aferição do tempo de coagulação	17
4.5 Análises de dados	18
5 RESULTADOS.....	19
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO.....	42
APÊNDICE.....	45

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas com o desenvolvimento e os progressos da nanotecnologia, permitiu-se a criação de uma área que se expande e busca o emprego desses elementos com finalidades biomédicas: a nanomedicina (BOULAIZ et al., 2011; CANCINO et al., 2014).

As nanoestruturas são comumente definidas como aquelas que possuem pelo menos uma dimensão abaixo de 100 nm. Geralmente apresentam-se na forma de nanopartículas, nanofibras ou nanotubos (CHOPRA et al., 2007; REZAEI et al., 2016).

Sempre que possível, o campo de aplicação desses materiais deve ser levado em consideração durante todas as etapas de elaboração dos mesmos. Partindo da escolha dos polímeros até o método que será usado para sua produção (MATLOCK-COLANGELO, BAEUMNER, 2014; REZAEI et al., 2016).

Durante muito tempo, nanofibras foram obtidas através da técnica de eletrofiação. No entanto, nos últimos anos a fiação através de sopro em solução (*Solution Blow Spinning*, SBS) foi estabelecida e tem se mostrado uma excelente opção para produção de estruturas poliméricas e cerâmicas. Apresentando vantagens como o fato de não necessitar de um campo elétrico para o processo, possuir um aparato mais simplificado e capacidade de gerar um maior rendimento de fibras, tal metodologia vem sendo cada vez disseminada (MEDEIROS et al., 2009; PELIPENKO; KOCBEK; KRISTL, 2015; REZAEI et al., 2016).

Devido às suas propriedades peculiares como uma elevada área superficial, alta relação comprimento/diâmetro e seu potencial biomimético, considerando a escala em que essas fibras são produzidas, as mesmas tornaram-se atraentes para numerosas aplicações. (VASITA; KATTI, 2006; REZAEI et al., 2016).

Dentro dessas possibilidades, nanomateriais à base de titânio tem sido considerados opções de escolha em inúmeros produtos biomédicos, com

destaque para a biocompatibilidade que apresentam (MAITZ et al., 2003; ROY; PAULOSE; GRIMES, 2007; SMITH et al., 2010).

Óxidos de titânio em geral são conhecidos por apresentarem boas características de hemocompatibilidade. Além disso, o titânio e suas ligas tem se estabelecido na literatura como materiais de alta capacidade trombogênica, o que pode contribuir para suas propriedades osseointegradoras e também permitir o desenvolvimento de estratégias voltadas à hemostasia (MAITZ et al., 2003; ROY; PAULOSE; GRIMES, 2007; MAHER et al., 2018; AREID et.al., 2018)

Nesse contexto, o desenvolvimento de nanofibras que possam apresentar funcionalidade e especificidade em contato com o tecido sanguíneo, deve ser avaliado e bem definido. Os testes que estimam esses comportamentos são essenciais para todas as formas de nanoestruturas com as quais se deseja trabalhar em um meio biológico para aplicações futuras (ZHANG et al., 2000; THEO; BIEHL; SCHENK, 2002; SMITH et al., 2010; BOULAIZ et al., 2011; CANCINO et al., 2014; PELIPENKO; KOCBEK; KRISTL, 2015).

Assim, com a ausência de achados na literatura a respeito do comportamento de nanofibras de TiO_2 em contato com o sangue, suas possíveis interações e respostas diante de variáveis como a coagulação sanguínea, estudos que explorem tal vertentes se tornam relevantes. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades hematológicas e trombogênicas de diferentes nanofibras de titânio (TiO_2) produzidas pelo método de *Solution Blow Spinning (SBS)*. Baseando-se nas hipóteses alternativas de que esses materiais podem apresentar diferentes comportamentos de acordo com suas propriedades de produção e serem capazes de interferirem sobre dinâmicas biológicas como, por exemplo, a coagulação sanguínea.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanomateriais

Materiais de natureza nanométrica, como nanopartículas, nanowhiskers, nanofilmes, nanotubos e nanofibras tem sido intensamente estudados, principalmente devido ao grande potencial de aplicação em múltiplas áreas (NUANSING; NINMUANG; JARERNBOON, 2006).

Diversas nanofibras de TiO_2 vem sendo produzidas e relatadas na literatura sob diferentes técnicas de fiação e temperaturas de calcinação. Cada técnica possui suas peculiaridades, e cada temperatura aplicada é capaz de originar estruturas cristalinas diferentes. Sendo importante salientar que a escolha do método e dos parâmetros utilizados influencia diretamente nas características finais da fibra que será gerada (MEDEIROS et al., 2009; DUMITRIU et.al, 2014; PELIPENKO; KOCBEK; KRISTL, 2015; REZAEI et al., 2016).

Os óxidos de titânio podem se apresentar em diferentes estados de oxidação e ainda com diferentes estruturas cristalinas. Tratando especificamente do TiO_2 os três principais polimorfos cristalinos dessa molécula são brookita, anatase e rutilo. O rutilo é considerado a fase mais abundante encontrada à pressão ambiente e assim como a anatase, possui estrutura tetragonal. Enquanto na forma de brookita a disposição dos átomos é ortorrômbica (SONG; WANG; XIAO, 2002; MAITZ et al., 2003; NUANSING; NINMUANG; JARERNBOON, 2006; YAZDANYAR; ASCHAUER; BOWEN, 2018).

Embora o dióxido de titânio possa exibir essas três estruturas, apenas anatase e rutilo são comumente produzidos comercialmente. A fase rutilo costuma ser indicada quando se deseja um material de maior compatibilidade com o sangue, enquanto a anatase é reconhecida por ser estável em nanomateriais. Ainda, diante de altas temperaturas, anatase e brookita podem transformar-se em rutilo. O processo de transformação de uma fase em outra é irreversível. Mas, ao apresentar-se como rutilo o material não alcança nenhuma outra fase se for exposto a maiores temperaturas. O que ocorrerá será apenas um aumento no grau de cristalização e no tamanho dos cristais (MAITZ et al., 2003;

LIU; CHU; DING, 2004; LINDAHL; BORCHARDT; LAUSMAA et.al 2010; SONG; CHEN; LIANG, et.al 2010)

A compatibilidade do dióxido de titânio com os tecidos e o sangue, torna-o útil para aplicações de caráter biomédicas. No entanto, propriedades físico-químicas incluindo características como fase cristalina, energia de superfície, carga e hidrofiliabilidade são capazes de alterar e/ou modificar o comportamento desse material quando em contato com sistemas biológicos. Desta maneira, esses pontos vêm sendo estudados diante de fenômenos como o da coagulação sanguínea (ERICKSSON; LAUSMAA; NYGREN, 2001; THOR et al., 2007;).

Tais preceitos fazem com que o controle da estrutura cristalina na nanoescala seja de extrema importância na finalidade de aplicação do TiO₂. No entanto, a maior parte das investigações presente na literatura foi feita com a fase rutilo, o que traz a necessidade de outros estudos que abordem os demais polimorfos (HONG; KURT; THOR, 2013; HUANG et al., 2017).

2.2 Interações do titânio com os sistemas biológicos

A superfície de um biomaterial pode desempenhar um papel importante na ação e em seu destino biológico, já que esta é o principal caminho para sua interação com o corpo. Sabe-se, por exemplo, que o contato do sangue com algumas superfícies pode ser capaz de ativar a coagulação, além de estimular respostas celulares e do sistema complemento (HANSSON et al., 2005; WEBER et al., 2018; YAZDANYAR; ASCHAUER; BOWEN, 2018).

Em implantes dentários, por exemplo, a interação da superfície do titânio com o sangue é considerada uma das chaves no sucesso da osseointegração. Isso por que, esse contato inicial pode influenciar o desenvolvimento de coágulos que passam a se formar devido a agregação plaquetária e ativação dos fatores de coagulação que acredita-se serem gerados por conta de tal relação (PARK; DAVIES, 2000; DI IORIO et al.2005; THOR et al., 2007; AREID et al., 2018).

Ao lidarmos com a interface sangue/biomateriais, os mesmos podem agir iniciando a coagulação plasmática através do contato com as suas superfícies, ou

ainda, ligarem-se a fatores de coagulação para perpetuar e/ou intensificar esse processo. Quando ativações do sistema hemostático ocorrem mediadas pela superfície de um determinado material, passamos a ter processos de adesão plaquetária, ativação e formação de trombos que podem se tornar satisfatórios quando desejamos ações coagulantes. Proteínas adsorvidas, como Fator XII e fibrinogênio também participam dessas interações. A adsorção do fator XII em superfícies negativamente carregadas, por exemplo, provoca uma mudança de conformação, culminando com sua autoativação. Acredita-se que a adsorção dessas moléculas junto às superfícies de teste seja um ponto fundamental no que diz respeito à compatibilidade com o sangue (SANCHEZ et. al, 2002; HANSSON et al., 2005;FRÖHLICH, 2016; WEBER et al., 2018).

. Por ser um componente que frequentemente pode estar em contato com superfícies ósseas, tecidos moles e consequentemente em interação com o sangue, o achado de que o titânio induz reações trombogênicas *in vitro*, pode torná-lo menos adequado para a composição de alguns dispositivos médicos. No entanto, derivados desse elemento como nanofibras, que possuam superfície capaz de ativar o sistema hemostático, levando a adesão plaquetária e formação de trombos, podem ser interessantes quando se pensa em trabalhar com hemostasia e soluções de problemas como possíveis hemorragias em sítios cirúrgicos (HONG et al., 2005; ROY; PAULOSE; GRIMES, 2007;HULANDER et al., 2009).

2.3 Hemostasia

A hemostasia pode ser caracterizada como um processo dinâmico e de constante equilíbrio entre agentes pró-coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticos. Essa interação preserva a fluidez do sangue quando os vasos sanguíneos estão intactos e desencadeia a formação de coágulos para evitar hemorragias excessivas quando os mesmos são lesados (COTRAN, 2000; SILVA, et. al, 2015; SILVERTHORN, 2017).

Os elementos do sistema hemostático incluem vasos sanguíneos, substâncias anticoagulantes naturais, plaquetas e proteínas de coagulação, além

de mecanismos de fibrinólise. O equilíbrio funcional desse processo é então garantido por uma complexa interação entre proteínas celulares, respostas celulares e regulação do fluxo sanguíneo (FRANCO, 2001).

Quando se realiza qualquer procedimento cirúrgico ou ocorrem traumas de outra natureza, os vasos e tecidos são lesados e isso gera sangramentos. Diante desse tipo de situação exige-se uma hemostasia bem sucedida e que seja capaz de satisfazer o controle hemorrágico (JÚNIOR, 2016).

A chamada cascata de coagulação é uma ação que conta com mais de vinte proteases que se ativam mútua e subsequentemente em duas vias principais que culminam com a formação de uma rede de fibrina e um coágulo estável (MAITZ et al., 2003). Embora atualmente tal conceito já venha sendo substituído por um novo modelo baseado também nas superfícies celulares, o mesmo ainda é adotado como forma de explicação mais simplificada dos processos envolvidos na coagulação (FERREIRA et al., 2010).

Um aumento da cinética coagulativa é particularmente útil em pacientes que sofrem hemorragias graves ou até mesmo durante intercorrências que se apresentem no decorrer de um atendimento odontológico (ROY; PAULOSE; GRIMES, 2007; GUPTA; MUTHUSEKHAR; KUMAR, 2018). Hemorragias pós-operatórias, por exemplo, são complicações que podem acontecer após procedimentos nos tecidos da cavidade oral, devido a influência principalmente da alta vascularização presente nessa região. Tal fato deve levar o cirurgião dentista a adotar medidas que favoreçam uma hemostasia imediata após a conclusão de um processo cirúrgico, como forma de diminuir o risco de possíveis sangramentos exacerbados (MOURÃO et.al, 2018).

Os sangramentos associados a intervenções cirúrgicas orais, além de causarem desconforto e possíveis riscos para o paciente também podem levar a um aumento do tempo clínico do profissional envolvido. Uma das formas mais comuns encontradas na prática clínica é o sangramento pós-exodontia. Para isso, existe uma ampla diversidade de técnicas sugeridas para lidar com tal situação, seja ela em pacientes saudáveis ou comprometidos. As intervenções podem ser locais e/ou sistêmicas e dentre as de caráter mais comum podemos citar a realização de compressas de gaze, suturas oclusivas e uso de agentes

hemostáticos locais (SCHREIBER; NEVELEFF, 2011; KAMOH; SWANTEK, 2012; SUMANTH; PRASHANTI; AGGARWAL, et al., 2016; GUPTA; MUTHUSEKHAR; KUMAR, 2018).

2.4. Agentes Hemostáticos

Quando nos deparamos com casos de hemorragias, a literatura expressa variados protocolos que auxiliam no tratamento e reduzem o número de episódios de sangramento (BREWER; CORREA, 2006; MANCUSO; SANTAGOSTINO, 2011; KAZANCIOĞLU et al., 2012).

Entre as medidas mais utilizadas, os cirurgiões dentistas podem fazer uso de aparatos como esponjas e géis de fibrina, esponjas de celulose, suturas, compressões locais, ou até mesmo de agentes anti fibrinolíticos como o ácido tranexâmico, estando o processo de hemostasia na cavidade oral ligado ao dinâmico equilíbrio da relação entre a formação de fibrina e plasmina. Os hemostáticos locais por sua vez, trazem benefícios promovendo um rápido controle das hemorragias, fato esse que também contribui na redução da ansiedade do paciente gerada por conta do sangramento.(BAJKIN et al., 2009; HONG et al., 2010; MORIMOTO et al., 2011; KAZANCIOĞLU et al., 2012; COSTA et al., 2013; MORIMOTO et al., 2015; ZIRK et al., 2016; ZIRK et al., 2018,).

Atualmente, diversos tipos de agentes hemostáticos tópicos estão disponíveis no mercado para o uso em cirurgias orais. Tais produtos podem atuar de maneira passiva, quando são estruturas que favorecem a adesão plaquetária para consequente formação de um coágulo, ou ativa quando interferem diretamente na cascata de coagulação. Alguns produtos disponíveis no mercado apresentam baixo pH e alcançam a hemostasia via vasoconstricção local, desnaturação das proteínas do sangue e/ou ativação mecânica da cascata de coagulação. No entanto, o ambiente ácido capaz de ser criado decorrente da aplicação desses materiais pode ser prejudicial a estruturas adjacentes aos sítios cirúrgicos. Em casos de intervenções em meio bucal, o nervo alveolar inferior, por exemplo, pode apresentar distúrbios temporários. O hemostático ideal além de possuir eficácia, deve ser acessível e principalmente seguro de usar no corpo (LOESCHER; ROBINSON, 1998; KAMOH; SWANTEK, 2012).

Nos últimos anos, a descoberta de novos materiais e seu desenvolvimento baseado em terapias, dispositivos e produtos de uso médico tem colaborado no tratamento e diagnóstico de muitos acometimentos significativos a saúde humana (PAN et al., 2016). Se tratando de agentes com capacidade hemostática, os avanços não tem sido diferente e a literatura já traz relato sobre estudos que envolvem o tema. O potencial trombogênico e as ações no processo de coagulação vêm sendo investigados em estudos com quitosana, celulose, plaquetas de poliestireno, nanopartículas de metais e óxidos diversos e múltiplas combinações de nanoestruturas e superfícies de titânio (ROY; PAULOSE; GRIMES, 2007; MALMQUIST; CLEMENS ; OIEN , et al., 2008; KAMOH; SWANTEK, 2012; LIMA et al., 2015; FRÖHLICH, 2016; VEZEAU, 2016).

Em um estudo realizado por Roy e colaboradores (2007) nanotubos de TiO_2 pareceram atuar como um suporte, facilitando a formação de fibrina. Tais autores relataram uma diminuição no tempo de coagulação quando os materiais foram usados em comparação com sangue puro, descrevendo também uma maior resistência do coágulo formado. Além disso, os mesmos sugeriram a aplicação de bandagens funcionalizadas com os materiais em questão para ajudar a conter ou parar hemorragias, o que prova que nanoestruturas à base de titânio podem ter potenciais trombogênicos e serem usadas como auxiliares nos processos hemostáticos.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

Avaliar as propriedades hematológicas e trombogênicas de nanofibras de titânio (TiO_2) produzidas através do método de *Solution Blow Spinning* (SBS).

3.2. Específicos

- ✓ Avaliar características físico-químicas das nanofibras por meio de testes como difração de raios x, análise do ângulo de contato e Microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Avaliar o comportamento biológico e a citotoxicidade de três diferentes nanofibras de titânio (TiO_2) produzidas pelo método de *Solution Blow Spinning* (SBS);
- ✓ Avaliar o potencial de hemaglutinação e taxa de hemólise de eritrócitos humanos expostos às nanofibras testadas;
- ✓ Avaliar o tempo de coagulação do sangue total quando em contato com as distintas nanofibras testadas em diferentes concentrações;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamentos do estudo

Foi realizado um estudo de natureza experimental, caráter laboratorial e *in vitro*, no qual adotou-se uma abordagem indutiva, utilizando-se de procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório (LAKATOS; MARCONI, 2010).

O desenho desse projeto contou com a síntese e caracterização de nanofibras cerâmicas de óxido de titânio, obtidas por meio da técnica de fiação por sopro em solução (SBS) seguido posteriormente, da avaliação de propriedades hematológicas e trombogênicas dos materiais obtidos. Para tanto, o mesmo foi desmembrado basicamente em 2 etapas, de acordo com o fluxograma geral apresentado na Figura 1.

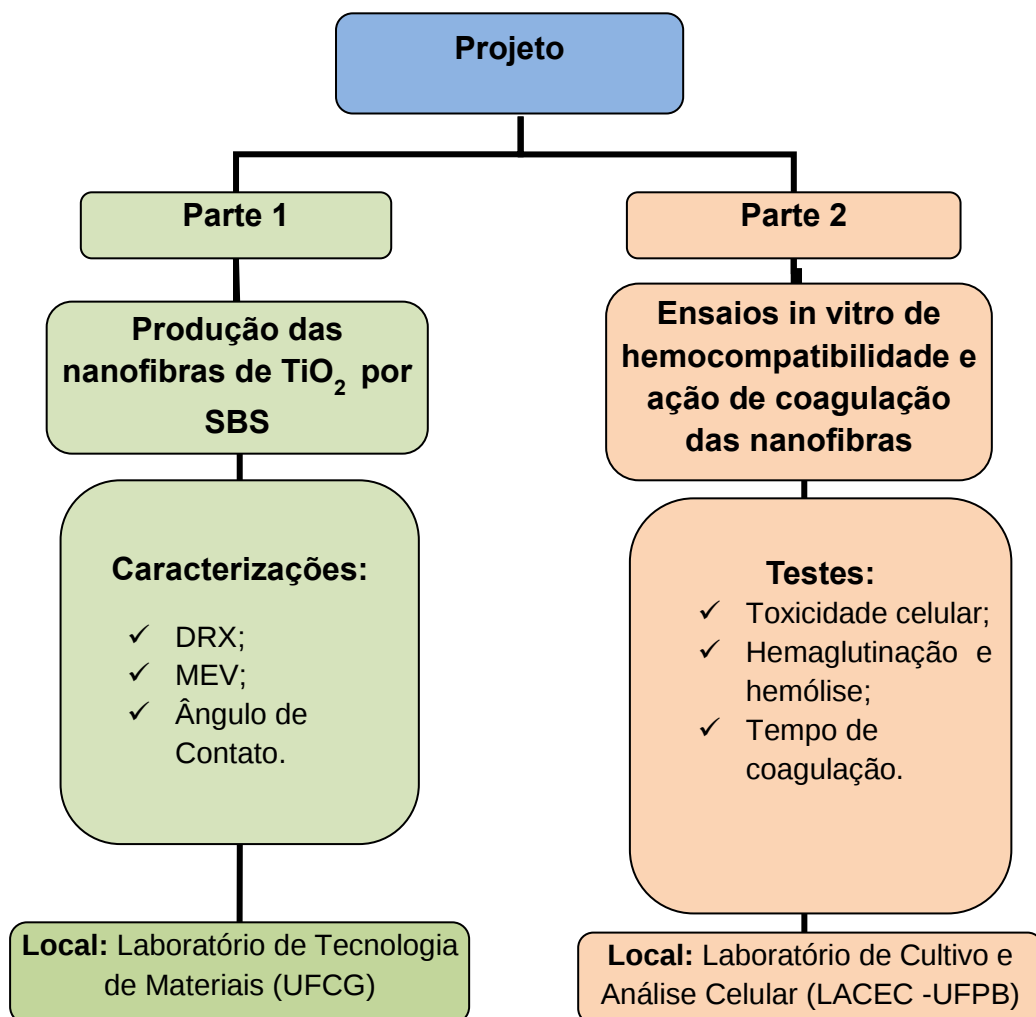


Figura 1–Fluxograma básico da organização do projeto.

4.2 Considerações éticas

Devido à necessidade de envolver a coleta de material biológico (sangue periférico) para realização dos testes propostos para as nanofibras em questão, o projeto de pesquisa se adequou aos critérios de recomendações e exigências instituídas pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

O mesmo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) sob Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAEE) 60924816.1.0000.5188 e parecer de número 1.828.476.

4.3 Síntese e caracterização das nanofibras

4.3.1 Obtenção das nanofibras

As nanofibras de dióxido de titânio (TiO_2) foram produzidas através da técnica de fiação por sopro em solução (*Solution Blow Spinning –SBS*) preconizada por MEDEIROS (2009) (Figura 2).

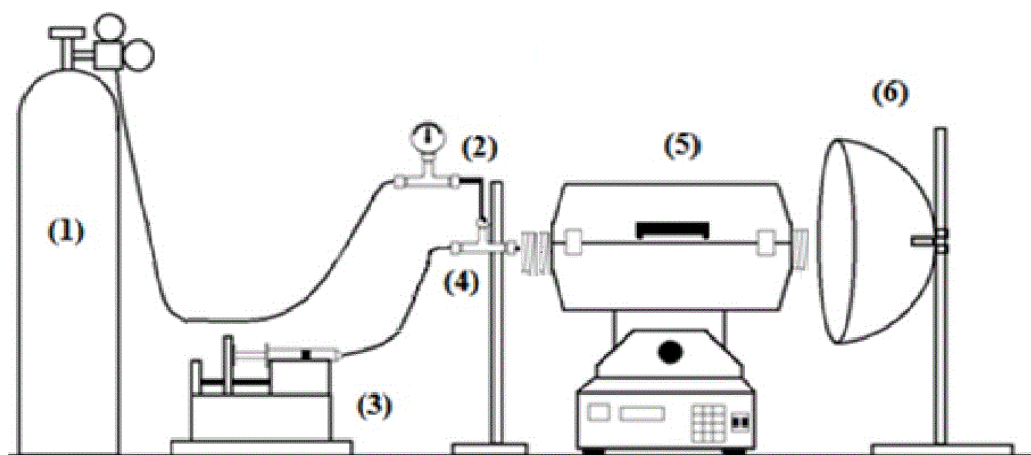


Figura 2 - Esquema do aparato utilizado na fiação por sopro em solução (SBS)

- (1) Compressor de ar; (2) manômetro para regular o fluxo do ar; (3) sistema de injeção da solução polimérica, (4) sistema de tubos concêntricos acoplados ao manômetro; (5) sistema de aquecimento (forno) e (6) coletor de nanofibras. Imagem adaptada de : Medeiros et.al, 2009.

Para tal, adotou-se a metodologia seguida por COSTA et.al (2016), utilizando-se uma fonte de titânio e um polímero para a produção da solução precursora. A fiação foi realizada em condições pré-estabelecidas, com taxa de injeção de 4,4ml/h e pressão do ar de 483 KPa até que uma manta de nanofibras fosse formada no coletor (Figura 3). Após a fiação, as mantas foram calcinadas em três temperaturas distintas a fim de obter-se diferentes fases cristalinas para o estudo.



Figura 3- Aspecto das nanofibras após a fiação por SBS

Todo processamento descrito foi realizado pela unidade acadêmica de Engenharia de Materiais no Laboratório de Tecnologia de Materiais do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Campina Grande (UFCG) e o material obtido foi caracterizado, armazenado e encaminhado em coletores estéreis para prosseguimento dos testes no Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC) da UFPB.

4.3.2 Caracterização Das Nanofibras

Todo material produzido foi caracterizado através de difração de raio X (DRX), a radiação utilizada foi Cu K α (40kV/30mA), modo de operação de tempo fixo, tempo de permanência de 0,60 segundos, varredura de 10° a 80°; passo de 0,02° (Aparelho Shimadzu, XRD6000) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SHIMADZU, SSX-550) pelo Laboratório de Tecnologia de Materiais (UFCG).

A aferição da molhabilidade através da mensuração do ângulo de contato com a água foi feita no Laboratório Integrado de Biomateriais (LABIO – UFPB). O ângulo de contato (θ) foi medido através da distribuição de uma gota (10 μ l) de água deionizada por uma pipeta de precisão (ecopipette 0,5-10 μ l, CAPP, Dinamarca) sobre a superfície dos corpos-de-prova (n=3). Fotografias padronizadas das gotículas foram obtidas através de uma câmera digital (CANON EOS REBEL T3i, lente Vivitar 100mm autofocus Macro, no modo manual, ISO 100, regulação de obturador 1/80 e diafragma f22), montada em tripé, imediatamente ao contato da gota com o corpo-de-prova e fotografias adicionais foram registradas. (BABU et al., 2014, FARIAS et al, 2015, COSTA et.al, 2016).

4.4 Testes de Contaminação e Ensaios *in vitro*.

Antes de dar início aos testes biológicos, todas as fibras foram codificadas, e passaram a receber as denominações: HemoFiber 1, HemoFiber 2 e HemoFiber 3, como serão expressas ao longo deste trabalho.

Como forma de garantir a ausência de contaminação das mesmas, realizou-se um controle de esterilidade. Nesta etapa, pequenas porções de todas as amostras recebidas (5mg/cada) foram cultivadas em 2mL de caldo Ágar Sabouroud Dextrose e BHI por 24h. Em seguida, foram semeadas em triplicata em placas de petri e mantidas em estufa por mais 24h.

A partir do momento em que se garantiu a ausência de micro organismos nas nanofibras, os estudos para verificação do comportamento biológico desses materiais em contato com sangue humano foram realizados no Laboratório de

Cultivo Celular (LACEC) da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no mínimo, em duplicata.

4.4.1. Coleta de sangue periférico humano

Voluntários do sexo masculino foram angariados e convidados a participarem do presente trabalho, mediante livre e espontânea vontade e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doação de sangue, em cumprimento com todos os critérios que se referem à ética aplicada em pesquisas que envolvem seres humanos.

Colheram-se em média 30 mL de sangue periférico dos indivíduos, que apresentavam faixa etária entre 18 e 45 anos, não possuísem nenhum histórico de doenças infectocontagiosas, crônicas e/ou alérgicas, não fossem etilistas e/ou tabagistas e que não fizessem ou estivessem em uso de antibióticos, medicamentos com caráter imunomodulador ou anticoagulantes, sendo considerados sadios e com bom estado de saúde geral.

Para todas as amostras coletadas foi realizado um teste rápido e semi quantitativo para proteína C reativa, como forma de garantir que nenhum dos voluntários apresentava processos inflamatórios ativos.

O material sanguíneo foi obtido através de punção venosa atraumática a vácuo, disposto em tubos estéreis contendo anticoagulante heparina sódica (Becton Dickinson, Vacutainer, Brasil) e também por meio de escalpes e seringas descartáveis de 10 mL onde era disposto em tubos de ensaio comerciais.

4.4.2. Isolamento e cultivo das células mononucleares (PBMCs)

Os PBMC foram isolados por meio da técnica de gradiente de Ficoll-Paque™ 1077 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) baseado no protocolo seguido por Leelatian et al. (2015).

Uma fração das amostras de material biológico coletado passou pelo processo de centrifugação seguindo parâmetros de 400g e 25°C por 30 minutos do sangue com Ficoll. Consequentemente, se formaram camadas distintas e a faixa

correspondente ao conteúdo leucocitário foi recolhida e disposta em tubos falcon de 15 mL seguido por lavagens consecutivas em três vezes com tampão de fosfato (PBS) e centrifugação a 300g por 10 minutos.

Após os procedimentos citados, a quantificação do número de células viáveis foi obtida pelo método de exclusão do azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich® St. Louis, EUA) e a contagem de células mortas coradas e íntegras não coradas, feita em um contador automático de células (Countess II FL Automated Cell Counter, Thermo Fisher Scientific).

As células consideradas viáveis foram separadamente suspendidas e tiveram um volume ajustado na concentração de 2×10^5 cel./ml em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com soro fetal bovino (5%), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 1mM HEPES.

4.4.3 Ensaio de Citotoxicidade

Alíquotas de 200 µl dos PBMCs a 2×10^5 cel/ml, estimuladas com 1 µl/ml de fitohemaglutinina (PHA-P; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram incubadas com amostras das respectivas fibras em três concentrações em poços de poliestireno preto inCorning® 96 fundo plano (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) durante 24 horas a 37°C em uma atmosfera umidificada a 5% CO₂. Depois disso, 20µl de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 0,56µM foram depositados em cada poço e aguardou-se um período de incubação de 10 horas para leitura. A fluorescência foi medida no GloMax®-Multi Microplate Reader (Promega, Madison, EUA) e a porcentagem de viabilidade calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ De citotoxicidade} = \left[\frac{\text{FI 590 das amostras teste}}{\text{FI 590 de células controles}} \times (100) \right]$$

Onde: FI 590 = Intensidade Fluorescente a uma emissão de 590 nm (excitação de 560 nm)

4.4.4. Testes de hemaglutinação e hemólise

Os testes de hemaglutinação e hemólise seguiram os mesmos passos descritos por Lima et.al. (2015).

Resumidamente, amostras de sangue periférico de três voluntários saudáveis foram colhidas em tubos heparinizados (Becton Dickinson, Vacutainer, Brasil) e em seguida, centrifugadas a 1500 rpm, durante 15 minutos. Através desse processo, o plasma resultante, plaquetas e glóbulos brancos foram descartados e os eritrócitos lavados três vezes com 15mL de solução tampão de fosfato (PBS) de pH 7,4.

No ensaio de hemaglutinação, baseado nos métodos de Banerjee et al (2011), os eritrócitos foram diluídos em PBS a 1% e 200 μ L da solução resultante foram transferidos para uma microplaca de 96 poços de fundo “U”. Além do conteúdo disposto, os poços continham três quantidades diferentes de cada fibra que estava sendo testada (HemoFiber 1, HemoFiber 2 e HemoFiber 3) com cada concentração sendo testada em triplicata..

A inoculação foi feita à temperatura ambiente durante uma hora, com posterior avaliação visual e fotográfica realizada por um pesquisador treinado para verificar a presença de hemaglutinação ou apenas a formação de botões de hemácias, seguindo os critérios adotados por Lima et.al. (2015).

A hemaglutinação foi quantificada utilizando a escala proposta por Stavitsky e Jarchow (1954):

- + + + + Aglutinação granular compacta;
- + + + Matéria homogênea na parte inferior do tubo com os bordos dobrados;
- + + Matéria suave na parte inferior do tubo com bordas irregulares;
- + Anel vermelho estreito em torno da borda da matéria homogênea;
- ± Menor área de tubo com aspecto +, e um anel vermelho mais evidente ao redor;
- Botão discreto no centro da parte inferior do tubo;

Por fim, a atividade hemolítica foi obtida, seguindo-se o método de Singhal e Ray (2002). Decorridos sessenta minutos de contato das fibras dentro dos poços com os eritrócitos, 70 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma placa de fundo plano de 96 poços. A mesma foi então levada para um leitor de

microplacas por absorbância (GloMax-Multi), no qual utilizou-se um filtro de comprimento de onda de 560 nm como parâmetro. Controles positivos e negativos foram feitos com água destilada e PBS, respectivamente.

O percentual de hemólise foi calculado através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{AA - AN}{AP - AN} \times 100$$

Onde, AA, AP e AN corresponderam à absorbância da amostra, absorbância positiva e absorbância negativa, respectivamente.

O índice de Hartmann et.al (1970) foi utilizado para interpretação dos resultados e a partir dele uma taxa menor do que 5% foi interpretada como aceitável para hemólise.

4.4.5. Aferições do Tempo de Coagulação (TC)

Para aferição do tempo de coagulação utilizou-se o método de Lee-White, seguindo o protocolo proposto por Austen e Rhymes (1975).

Resumidamente, coletou-se sangue fresco com uso de um escalpe nº23 e seringas plásticas de 10 mL, em 10 voluntários saudáveis, sem nenhum tipo de coagulopatia. O sangue coletado nas seringas foi transferido diretamente para tubos de vidro padronizados, limpos, secos, estéreis e pré-aquecidos que continham três concentrações das nanofibras testadas. Cada tubo recebeu o conteúdo de 1 mL de sangue e foi levado em banho Maria a 37° C. Após 2 minutos no banho cada tubo era examinado no intervalo de aproximadamente 15 segundos e inclinado suavemente. O conteúdo presente foi considerado coagulado quando os tubos puderam ser vertidos sem movimento significativo do sangue em seu interior. O tempo de coagulação foi registrado em segundos (s) e o ensaio realizado em duplicata para cada doador (n=10).

A partir do momento que o sangue passava para seringa de coleta, um cronômetro foi disparado e a contagem do tempo só foi encerrada quando pesquisadores treinados identificassem a formação de um coágulo.

Ao final, obtiveram-se as médias e desvios padrões para cada fibra e concentração e os resultados foram comparados a um controle negativo que era composto apenas por tubos secos que não continham nenhum tipo de material e/ou aditivo no seu interior. O teste e as avaliações foram feitos de maneira cega. Ou seja, os pesquisadores envolvidos não tinham conhecimento sobre a composição, características ou as concentrações das fibras testadas.

4.5 Análises dos dados

Os gráficos e difratogramas resultantes do DRX foram gerados no através do software Origin.

O ângulo de contato foi analisado e medido através da interface líquido/ar, pelo programa Image J.

Os testes de contaminação foram considerados positivos caso houvesse crescimento de colônias nas placas semeadas.

A hemaglutinação foi quantificada utilizando a escala proposta por Stavitsky e Jarchow (1954) com a análise sendo realizada de maneira descritiva e também através da porcentagem (%) do fenômeno que era observada em cada poço.

As taxas de hemólise e citotoxicidade foram calculadas a partir das fórmulas já apresentadas anteriormente e os resultados exibidos descritivamente na forma de porcentagem.

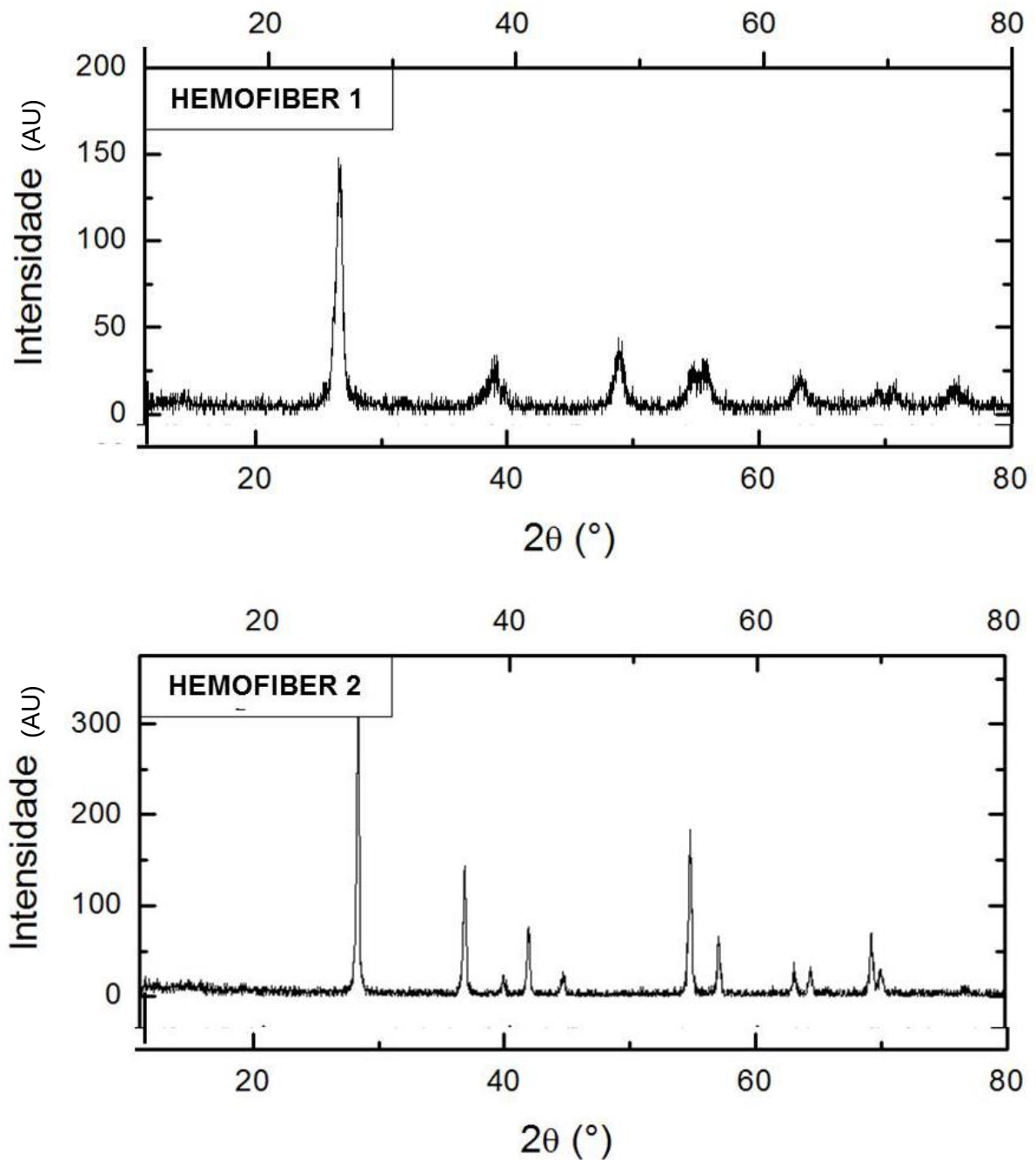
Para o tempo de coagulação, os dados foram tabulados no programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 19.0 e submetidos ao teste ANOVA, adotando-se um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterizações das nanofibras

5.1.2 DRX

Como já era esperado, devido às temperaturas distintas de calcinação, cada nanofibra apresentou uma fase cristalina dominante em sua composição, o que pôde ser observado através da leitura por difração de raios X (Figura 4).



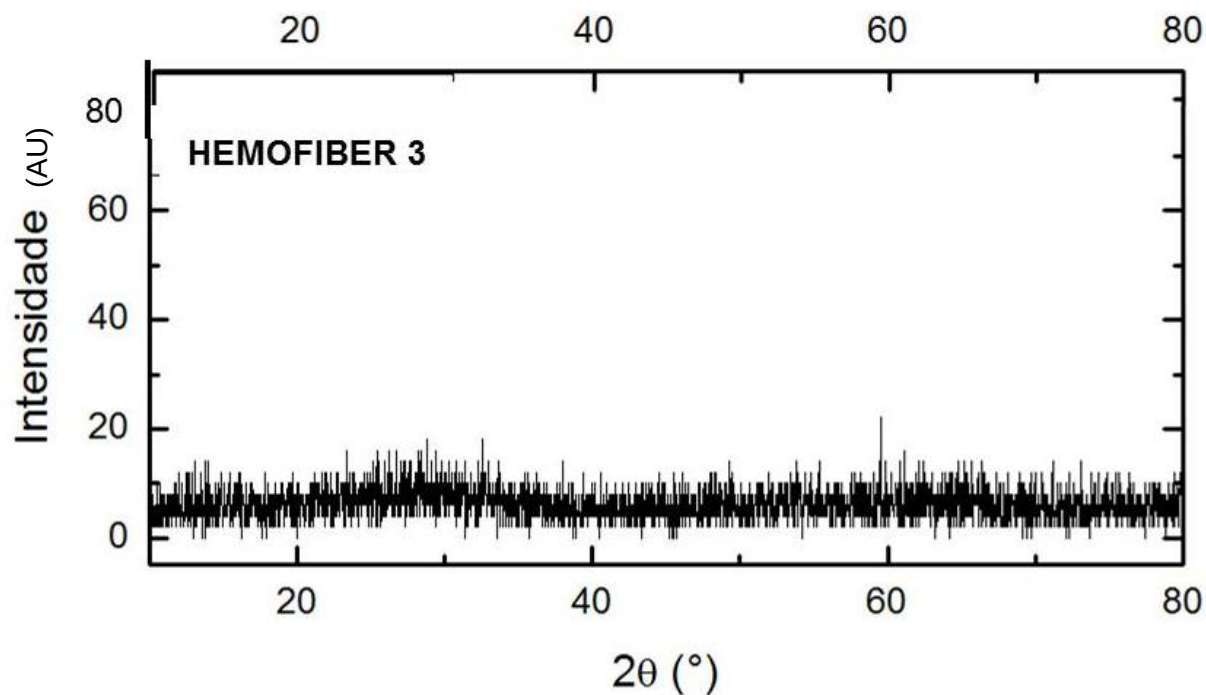


Figura 4: Difratomogramas demonstrando os diferentes padrões encontrados para os materiais produzidos. Na sequência, HemoFiber 1, 2 e 3.

5.1.3 MEV

As imagens da microscopia eletrônica de varredura evidenciaram nanofibras contínuas e bem formadas para as três temperaturas testadas. As estruturas podem ser visualizadas nas imagens seguintes (Figura 5)

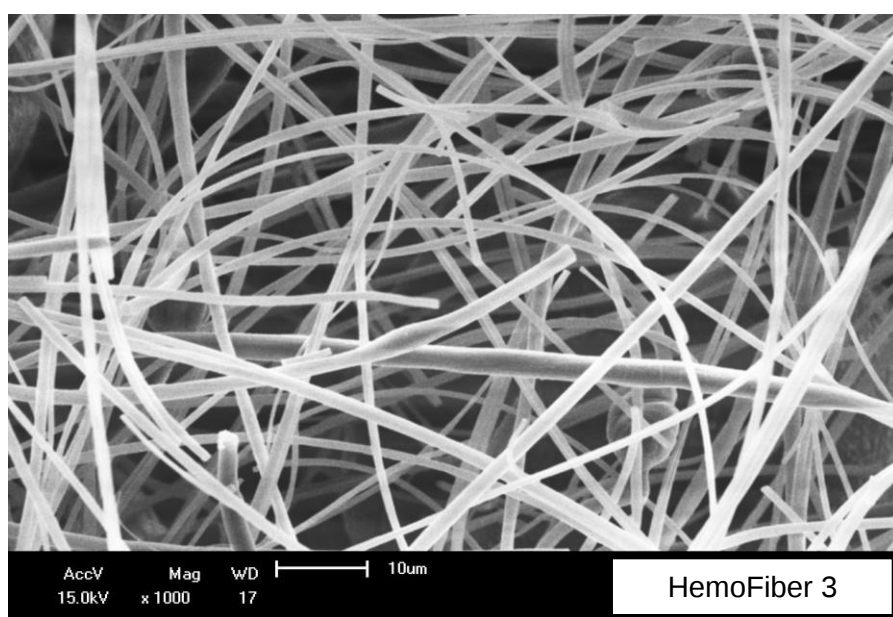
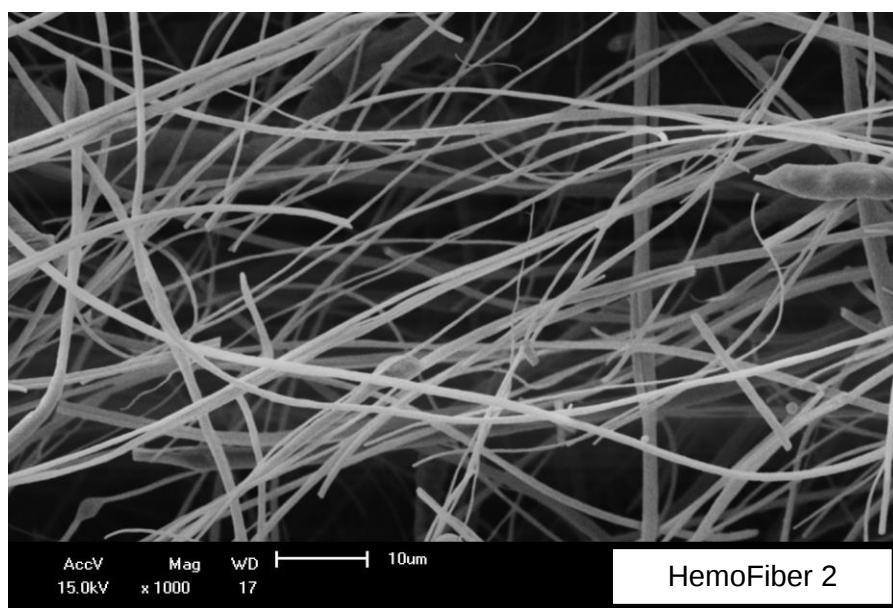
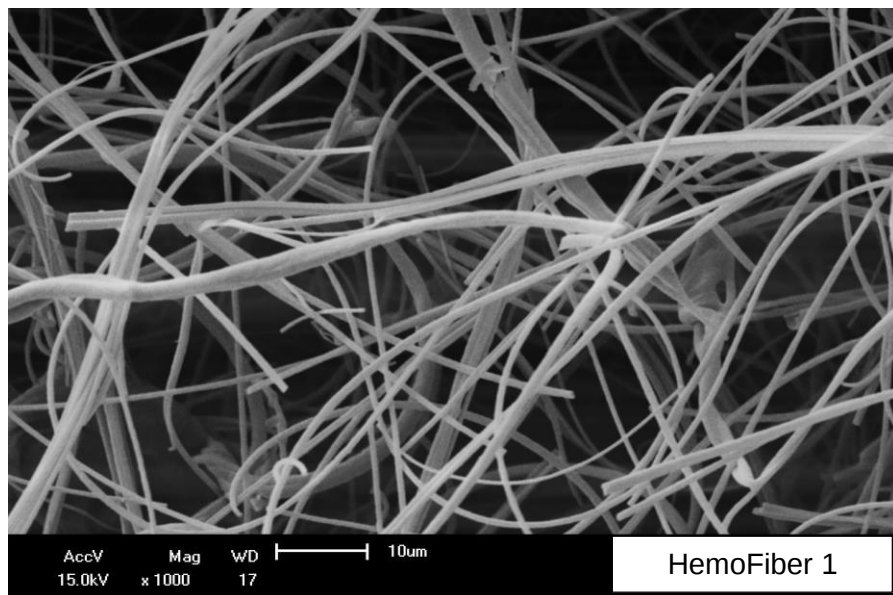


Figura 5: Imagem dos três materiais obtidos após diferentes temperaturas de calcinação.

5.1.4 Ângulo de contato

A mensuração da molhabilidade através da medição do ângulo de contato demonstrou que as três fibras em questão (HemoFiber 1, HemoFiber 2 e HemoFiber 3) são altamente hidrofílicas, tendo apresentado absorção imediata da gota dispensada sobre a superfície e θ podendo ser considerado zero. Ainda, segundo representação feita por Bacovska e colaboradores (2016), $\theta < 5^\circ$ em 0,5 segundos sugere um material de natureza superhidrofílica. Tal conclusão pode ser observada pela sequência de imagens abaixo representada pela figura 6.

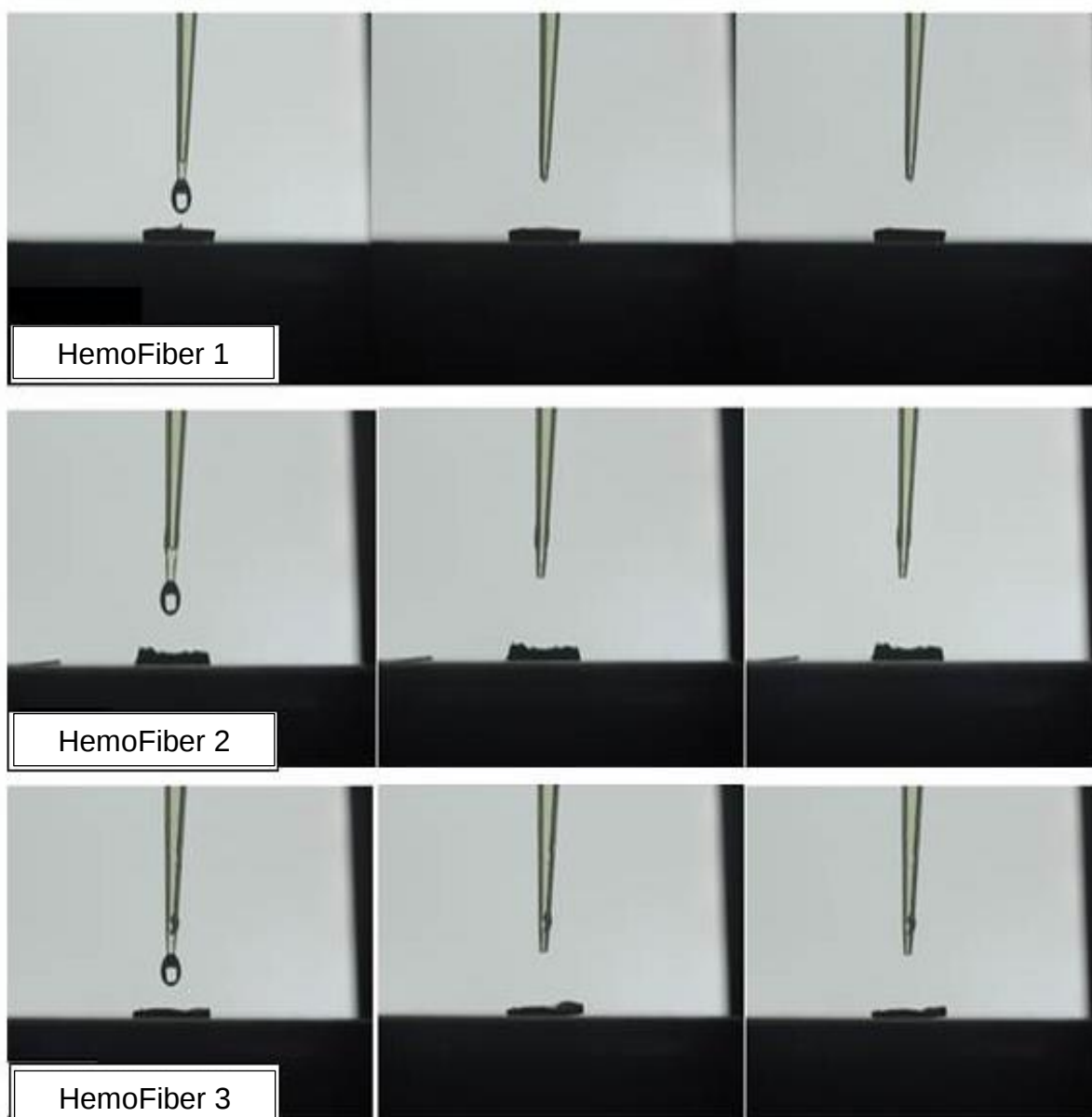


Figura 6 – Imagens realizadas para a mensuração do ângulo de contato

* Sequência de imagens representando a rápida absorção da água e praticamente a ausência da formação de um ângulo de contato em todas as superfícies.

5.2. Testes de contaminação

Após o cultivo em dois meios microbiológicos distintos (fungos e bactérias), nenhuma das amostras semeadas apresentou crescimento (Figura 7), demonstrando-se todas aptas a realização dos demais testes biológicos.

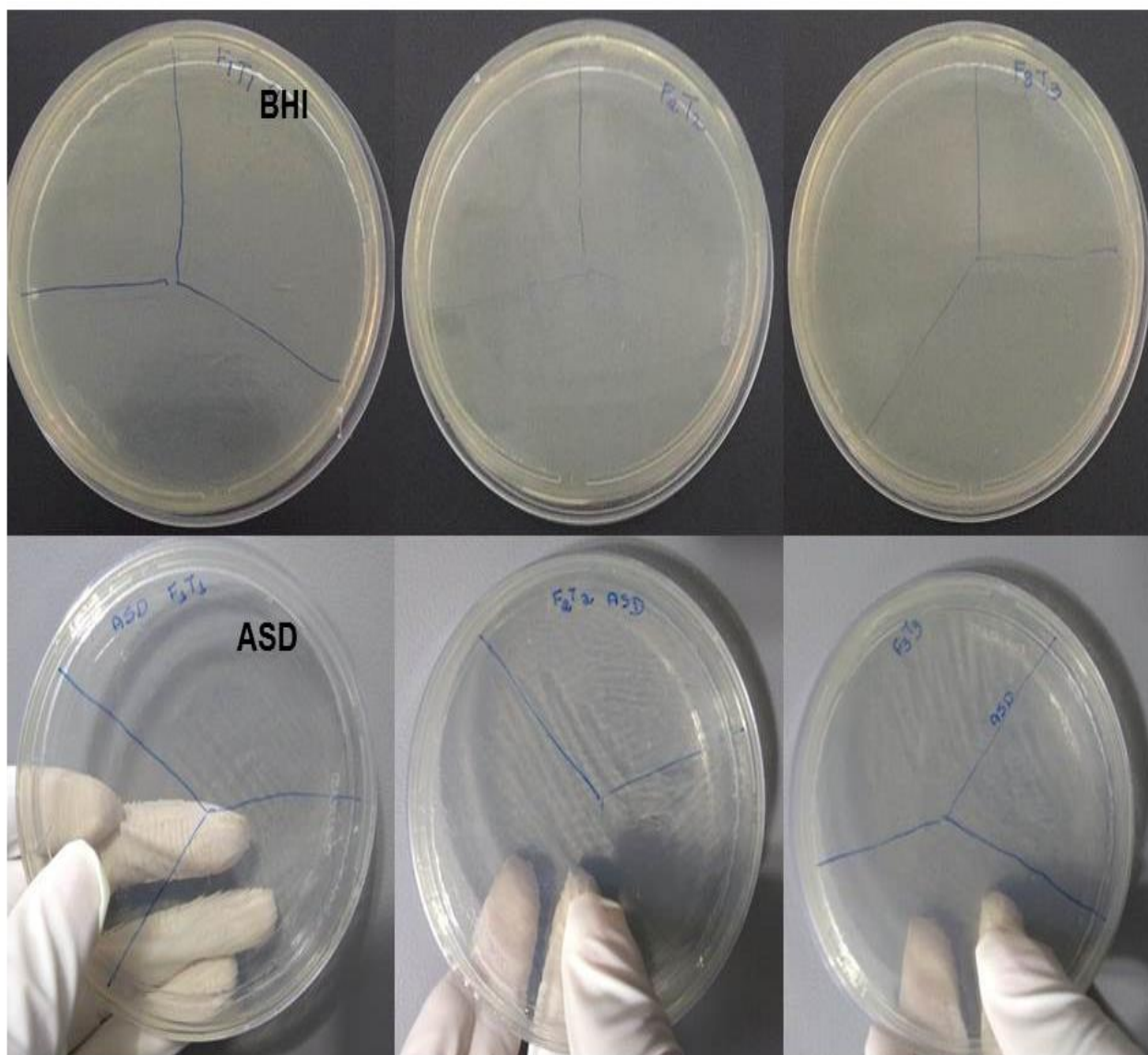


Figura 7 - Sequência de placas demonstrando a ausência de crescimento microbiológico em meios de cultura para fungos e bactérias após semeadura de todas as nanofibras testadas.

* BHI = Meio Brain Heart Infusion ASD= Meio Ágar Sabouround Dextrose

5.3 Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade (n=3) demonstraram boa compatibilidade biológica para as culturas de PBMCs quando em contato com os três tipos de fibras. Independente da concentração utilizada, a taxa de viabilidade celular não foi prejudicada, ocorrendo inclusive, um aumento da proliferação em relação ao controle no período experimental de 24h. Os valores encontrados estão expressos na figura 8.

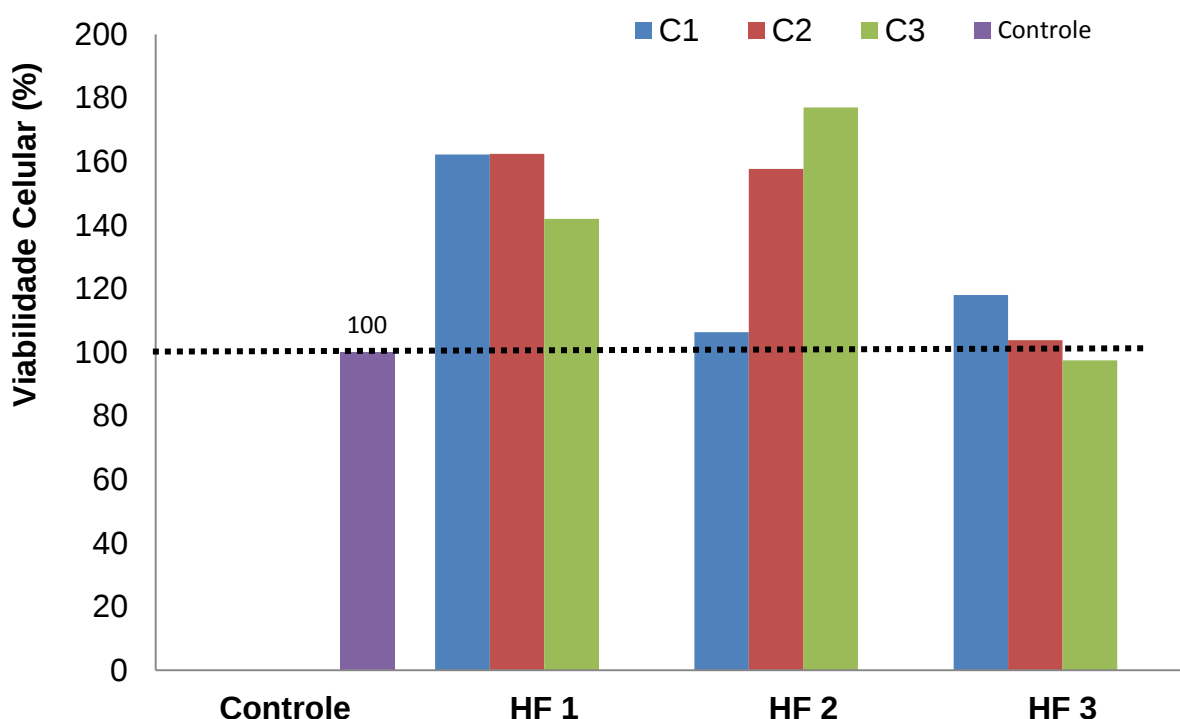


Figura 8- Gráfico ilustrativo da viabilidade celular encontrada para as diferentes nanofibras, em diferentes proporções. * HF = HemoFiber.

Embora todos os grupos tenham se mostrado compatíveis e a maioria ficado acima da referência do controle, para a HemoFiber 3 o aumento das concentrações provocou uma pequena queda nos valores de viabilidade celular.

5.4. Testes de Hemaglutinação e Hemólise

O aspecto de hemaglutinação foi analisado em todos os poços que continham as diferentes concentrações das HemoFibers 1, 2 e 3, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Percentual de reatividade hemaglutinante de eritrócitos humanos incubados com as nanofibras testadas.

Fibra (mg/mL)	Hemaglutinação (%)*					
	++++	+++	++	±	-	Indeterminado**
HemoFiber 1 (C1)	11,1	11,1	11,1	66,7	—	—
HemoFiber 1 (C2)	—	44,4	33,3	22,2	—	—
HemoFiber 1 (C3)	—	11,1	88,8	—	—	—
HemoFiber 2 (C1)	—	33,3	11,1	55,6	—	—
HemoFiber 2 (C2)	—	66,7	33,3	—	—	—
HemoFiber 2 (C3)	—	100	—	—	—	—
HemoFiber 3 (C1)	—	—	—	—	100	—
HemoFiber 3 (C2)	—	—	—	—	100	—
HemoFiber 3 (C3)	—	—	—	—	66,67	33,3

*Porcentagem dos poços compatíveis com Stavitsky (1954).

** Indica a porcentagem das amostras que apresentaram nanofibras na superfície dos poços o que distorceu a definição visual do evento hemaglutinante.

A partir dos dados acima foi possível observar que o comportamento para hemaglutinação diferiu entre as fibras. Enquanto as HemoFiber 1 e 2 apresentaram algum grau de atividade hemaglutinante, com tal fenômeno se intensificando com o aumento das concentrações, o mesmo não foi constatado

para a HemoFiber 3, independentemente da quantidade de fibra presente em cada poço.

Após a determinação ou não da hemaglutinação, os sobrenadantes resultantes foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato e submetidos à análise espectrofotométrica.

Como observado na Tabela 2, nenhuma das nanofibras nas proporções testadas apresentaram absorbância maior que o controle positivo de hemólise (água destilada).

Tabela 2: Atividade hemolítica das diferentes nanofibras em eritrócitos humanos.

Material	Densidade Óptica 560 nm	Hemólise %
Água Destilada	$0,408 \pm 0,042$	+ Controle
PBS	$0,059 \pm 0,001$	- Controle
HemoFiber 1 – C1	$0,088 \pm 0,014$	8,14
HemoFiber 1 – C2	$0,109 \pm 0,050$	14,23
HemoFiber 1 – C3	$0,124 \pm 0,036$	18,55
HemoFiber 2 – C1	$0,068 \pm 0,010$	2,49
HemoFiber 2 – C2	$0,069 \pm 0,012$	2,78
HemoFiber 2 – C3	$0,075 \pm 0,012$	4,35
HemoFiber 3 – C1	$0,057 \pm 0,006$	0
HemoFiber 3 – C2	$0,063 \pm 0,009$	0,95
HemoFiber 3 – C3	$0,075 \pm 0,002$	4,58

As taxas de hemólise variaram de 0 a 18,55%. Para esse parâmetro a HemoFiber 3 apresentou os melhores resultados enquanto a HemoFiber 1 teve os valores mais elevados na maior concentração testada, ficando acima do nível de 5% considerado como aceitável.

O comportamento hemolítico das nanofibras testadas pode ser observado através do gráfico representado pela figura 9.

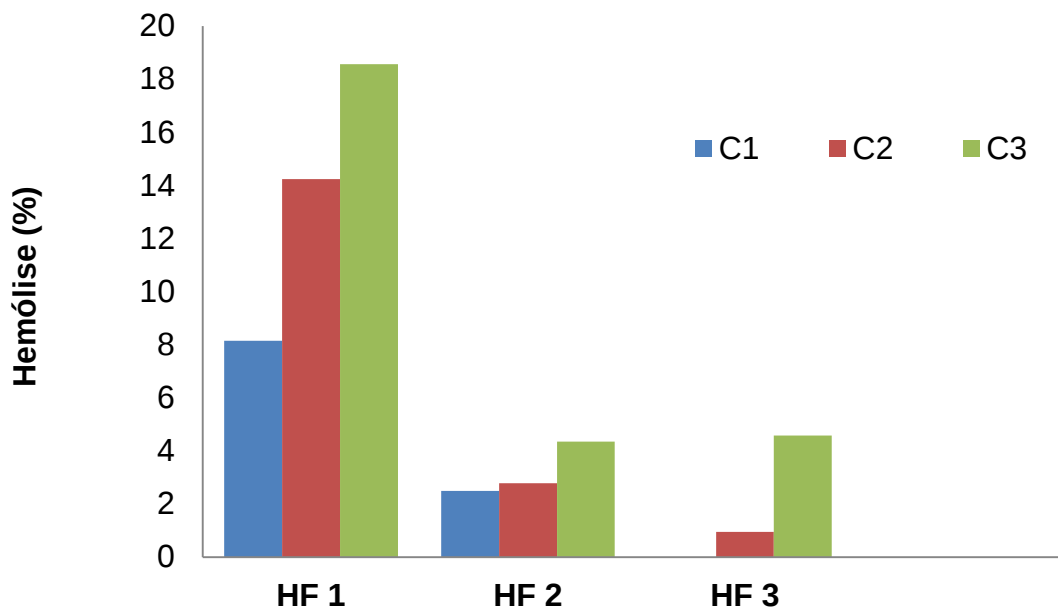


Figura 9 - Gráfico ilustrativo das taxas de hemólise encontradas para as diferentes nanofibras, em diferentes proporções.* HF = HEMOFIBER.

5.5 Aferições do Tempo de Coagulação (TC)

A tabela a seguir apresenta os dados dos valores descritivos do tempo de coagulação (médias e desvio padrão) para todos os grupos testados.

Tabela 3. Médias e desvios padrão para todos os grupos testados. Tempo de coagulação representado em segundos.

Grupos	Média (s)	n	Desvio-padrão
HemoFiber 1 – C1	356,3000	10	21,86092
HemoFiber 1 – C2	354,0000	10	13,82027
HemoFiber 1 – C3	339,3500	10	21,75374
HemoFiber 2 – C1	367,8000	10	20,70454
HemoFiber 2 – C2	367,6500	10	16,26696
HemoFiber 2 – C3	341,6000	10	28,71488
HemoFiber 3 – C1	336,8000	10	30,96790
HemoFiber 3 – C2	324,5500	10	29,13327
HemoFiber 3 – C3	329,2000	10	31,38400
Controle	407,4000	10	35,52292
Total	352,4650	100	33,93355

Comparando apenas os grupos experimentais com o controle a análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre eles. Os dados descritos podem ser observados na tabela a seguir.

Tabela 4. ANOVA (One-Way) para os Tempos de coagulação em relação apenas ao controle, sem considerar as concentrações testadas.

	Soma dos Quadrados	gl	Mean Square	F	Sig.
Entre Grupos	46560,402	3	15520,134	22,094	0,0001
Dentro de Grupos	67436,725	96	702,466		
Total	113997,127	99			

Como obtivemos um $p < 0,05$, foi realizado um Pós teste de Tukey para descobrir as interações entre os grupos. De acordo com o teste proposto todas as fibras diferiram do controle. HemoFibers 1 e 2 não diferiram entre si e a HemoFiber 3 foi diferente de todas as outras, com o menor tempo de coagulação entre todos os grupos.

Tabela 5. Pós Teste de Tukey

Grupo		N	Subconjunto		
			1	2	3
Tukey	HemoFiber 3	30	330,1833		
	HemoFiber 1	30		349,8833	
	HemoFiber 2	30		359,0167	
	Controle	10			407,4000

Para análise estatística do relacionamento dos grupos experimentais entre si, os dados de tempo de coagulação (TC) foram submetidos ao modelo estatístico da análise de variância (dois fatores), ou Two-Way ANOVA. O resultado deste está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. ANOVA (dois fatores) para os dados de TC.

Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Mean Square	F	Sig.	Eta Parcial ao Quadrado
Modelo Corrigido	20034,439 ^a	8	2504,305	4,134	,000	,290
Interceptar	10796941,736	1	10796941,736	17821,065	,000	,995
Grupo	13028,689	2	6514,344	10,752	0,0001	,210
Concentração	4545,839	2	2272,919	3,752	0,028	,085
Grupo * concentração	2459,911	4	614,978	1,015	,405	,048
Erro	49074,075	81	605,853			
Total	10866050,250	90				
Total Corrigido	69108,514	89				

a. R Squared = ,290 (Adjusted R Squared = ,220)

A ANOVA demonstrou que os dois fatores foram significativos ($p < 0,0001$) sendo assim, existiram alterações provocadas pelo fator grupo e pelo fator concentração.

5.5.1 Fator Grupo

O Pós-teste de Tukey demonstrou que a HemoFiber 3 foi diferente das demais.

Tabela 7. Resultados expressos pelos testes de Tukey

Tempo de Coagulação (s)				
Grupo		N	Subconjunto	
			1	2
Tukey HSD ^{ab}	HemoFiber 3	30	330,1833	
	HemoFiber 1	30		349,8833
	HemoFiber 2	30		359,0167
	Sig		1,000	0,327

5.5.2 Fator Concentração

Para o fator concentração, os resultados estatísticos através do teste de Tukey são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Resultados expressos pelos testes de Tukey levando-se em consideração o fator concentração.

Tempo de Coagulação (s)				
Concentração		N	Subconjunto	
			1	2
Tukey HSD ^{ab}	C3 mg/mL	30	336,7167	
	C2 mg/mL	30	348,7333	348,7333
	C1 mg/mL	30		353,6333
	Sig		,148	,722

Baseado no exposto, as análises mostraram que não houve diferença entre as concentrações de C1 e C2 nem entre C2 e C3. No entanto, a concentração de C3 mg/ml mostrou-se distinta quando comparada a de C1 mg/mL, apresentando relevância estatística.

5.5.2 Fator Concentração x Tempo

Quando se trabalhou com a intersecção das duas variáveis do estudo, os dados gerados puderam ser observados por meio da tabela 9.

Tabela 9. Comparação por pares entre o tipo de fibra e as concentrações trabalhadas.

Tempo de Coagulação (s)

Grupo	(I) Concentr.	(J) Concentr.	Mean Difference e (I-J)	Sig ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
HemoFiber 1	C1 mg/mL	C2 mg/mL	2,300	0,835	-19,602	24,202
		C3 mg/mL	16,950	0,129	-4,952	38,852
	C2 mg/mL	C1 mg/mL	- 2,300	0,835	-24,202	19,602
		C3 mg/mL	14,650	0,187	- 7,252	36552
	C3 mg/mL	C1 mg/mL	- 16950	0,128	- 38,852	4,952
		C2 mg/mL	- 14,650	0,187	- 36552	7,252
HemoFiber 2	C1 mg/mL	C2 mg/mL	0,150	0,989	-21,752	22,052
		C3 mg/mL	26,200	0,020	4,298	48,102
	C2 mg/mL	C1 mg/mL	0,150	0,989	- 22,052	21,752
		C3 mg/mL	26,050	0,020	4,148	47,952
	C3 mg/mL	C1 mg/mL	- 26,200	0,020	- 48,102	- 4,298
		C2 mg/mL	- 26,050	0,020	- 47, 952	- 4,148
HemoFiber 3	C1 mg/mL	C2 mg/mL	12,250	0,269	- 9,652	34,152
		C3 mg/mL	7,600	0,492	- 14,302	29,502
	C2 mg/mL	C1 mg/mL	-12250	0,269	- 34,152	9,652
		C3 mg/mL	- 4,650	0,674	- 26,552	17,252
	C3 mg/mL	C1 mg/mL	-7,600	0,492	- 29,502	14,302
		C2 mg/mL	4,650	0,674	- 17,252	26,552

A partir da interpretação da tabela foi possível constatar que para as HemoFibers 1 e 3 as concentrações não influenciaram nos tempos de coagulação obtidos. Já para a HemoFiber 2 o valor de C3 foi mais eficiente na redução do TC.

6 DISCUSSÃO

As características inerentes dos nanomateriais e as mudanças que podem ser feitas nesse sentido, são capazes de alterar tanto propriedades físico químicas quanto o comportamento biológico dos mesmos. Isso pode torná-los mais ou menos propícios a determinados fenômenos fisiológicos a depender de variáveis como forma de produção, composição, área superficial, topografia, hidrofiliicidade, carga, entre outros (DING et al., 2012; HONG; KURT; THOR, 2013; KOPF et al., 2015; EVERETT et al., 2016; KLINGVALL EK et al., 2017).

Tal premissa já descrita na literatura pôde ser ratificada através dos resultados encontrados no nosso estudo, onde as diferentes condições aplicadas na produção das nanofibras testadas foram capazes de gerar materiais com características distintas e consequentemente comportamentos diversos nos testes biológicos realizados.

A produção de nanofibras, nesse trabalho, se deu através da técnica de SBS. Método de fácil controle e reprodutível que proporcionou um bom rendimento. Os padrões de queima escolhidos para a calcinação dos materiais em questão almejavam a formação de nanofibras com diferentes fases cristalinas do titânio, estando de acordo com os achados de outros autores (NUANSING; NINMUANG; JARERNBOON, 2006; LI; ZHANG; PAN, 2011; COSTA et al., 2016).

Devido às interações que podem ocorrer entre superfícies de titânio com o sangue, a atividade trombogênica desse metal e seus óxidos vêm sendo estudada ao longo do tempo. Por sua vez, tentar elucidar tal propriedade tem ajudado a propor soluções e intervenções capazes de reduzi-la, quando não se deseja tal efeito. Ou ainda explorá-la quando se almeja o desenvolvimento de estratégias pró coagulantes para controles de hemorragias (ISHITOYA et al., 2002; ROY; PAULOSE; GRIMES, 2007; HUANG et al., 2017).

A escolha do titânio como material para a fabricação das nanofibras remete ao seu amplo uso biomédico. Além das importantes propriedades já relatadas para esse elemento, entre elas a biocompatibilidade (HUANG et al., 1994; ZHANG et al., 2000; DING et al., 2012;). Dentro deste conceito, os ensaios de citotoxicidade são uma das primeiras linhas de teste para avaliação do comportamento biológico

dos biomateriais. Nesse ponto, todas as nanofibras testadas apresentaram boa taxa de viabilidade celular, ficando acima dos parâmetros preconizados pela Norma ISO 10993.

O fato dos materiais terem apresentado um alto grau de hidrofiliabilidade, também contribui para explicar as interações biológicas que podem ter ocorrido. Em estudo realizado por Yahyapour (2004), a hidrofiliabilidade foi relatada como uma propriedade importante na ativação da coagulação sanguínea. Na mesma linha de informações, Hong e colaboradores (2013) chegaram à conclusão de que modificações de caráter hidrofílico parecem aumentar a capacidade trombogênica de superfícies de titânio. Durante a investigação dos autores, foi constatada uma maior adesão plaquetária e aumento significativo na cascata de coagulação quando o sangue foi colocado em contato com superfícies mais hidrofílicas.

Os efeitos dessa propriedade no que diz respeito à adesão proteica foram revisados por Wilson et al. (2005). Por fim, os autores relataram que a adsorção de proteínas é aparentemente promovida quando o sangue e outros fluidos biológicos entram em contato com superfícies dessa natureza.

Adotando-se condições bem estabelecidas, ensaios *in vitro* com o sangue humano demonstram serem instrumentos adequados quando se deseja estudar mecanismos que atuem na hemostasia. Além de gerarem inferências capazes de aperfeiçoarem a biocompatibilidade dos nanomateriais (FRÖHLICH, 2016).

Utilizando-se modelos *in vitro* diversos, várias informações em relação à hemocompatibilidade podem ser obtidas. Entre elas podemos citar: alterações de plaquetas, eritrócitos e leucócitos, geração de produtos de ativação no plasma e deposição de proteínas e células na superfície do material (WEBER et al., 2018)

A qualidade do sangue coletado é importante para permitir análises padronizadas e com menor risco de viés. Block e colaboradores (2016) demonstraram que o armazenamento estacionário de sangue durante 4 horas à temperatura ambiente afeta a função das plaquetas e atividade de leucócitos. Além disso, recomenda-se que as punções sejam o mais atraumáticas possíveis, como forma de minimizar a ativação plaquetária e o processo de coagulação ainda durante a coleta (Braune et al., 2013). Desta forma, os testes foram feitos

com sangue fresco de indivíduos saudáveis, adotando-se um n de 10 voluntários, constatando-se ausência de processos inflamatórios agudos e com os experimentos tendo início no menor espaço de tempo possível após a coleta.

Em contato com o sangue as nanofibras de TiO_2 exibiram atividade hemolítica entre 0 – 18,55%. A ocorrência de hemólise é um evento indesejado no organismo vivo, o que aponta para a necessidade de melhor entendimento dos materiais que apresentem essa reação. Os valores encontrados chegaram a ser expressivos para a HemoFiber 1, mas, entre os demais materiais as taxas ficaram abaixo de 5%, o que segundo o referencial preconizado por Hartmann et al. (1970) pode ser considerado de caráter desprezível.

A hemaglutinação observada nas HemoFibers 1 e 2 ajuda a compreender a ação pró coagulante dessas fibras. E, embora a HemoFiber 3 não tenha apresentado comportamento hemaglutinante, o fato da mesma ter obtido os menores tempos de coagulação nos leva a crer que esse material pode estar exercendo tal função atuando a nível de interações plasmáticas, adsorção de proteínas ou ainda em outras vias do sistema hemostático.

Nenhum estudo foi encontrado na literatura de forma a proporcionar uma comparação direta entre as implicações geradas nesta pesquisa. No entanto, a redução no tempo de coagulação demonstrada com o uso dos materiais avaliados, converge em parte com achados autores que analisaram e apontaram um comportamento trombogênico em nanoestruturas de TiO_2 (ROY; PAULOSE; GRIMES, 2007; HUANG et al., 2017;).

Diante do exposto, os resultados obtidos indicam que as nanofibras testadas exibem potencial hemostático significativo, e que podemos sugerir sua utilização para ajudar a conter e/ou controlar pequenas hemorragias em sítios cirúrgicos. Podendo sua aplicação desenvolver-se de várias formas, como por exemplo, por contato puro e direto com ferimentos ou ainda fazendo parte da composição de bandagens e compressas funcionais que ajudassem a debelar sangramentos com maior rapidez. No entanto, novos estudos e outras metodologias são necessários para melhor entendimento do comportamento e das interações sanguíneas dessas nanoestruturas.

7 CONCLUSÕES

Com o estudo realizado, podemos concluir que:

- ✓ As diferentes condições aplicadas na produção das nanofibras testadas foram capazes de gerar materiais com características físico-químicas distintas e consequentemente comportamentos diversos nos testes biológicos realizados;
- ✓ As nanofibras testadas não apresentaram potencial citotóxico para PBMCs humanos;
- ✓ As nanofibras HemoFiber 1 e HemoFiber 2 apresentaram uma maior ação de hemaglutinação quando em comparação com a HemoFiber 3, material no qual esse desempenho não foi observado;
- ✓ As taxas de hemólise variaram entre os materiais, com comportamentos distintos observados em cada fibra e em cada proporção.
- ✓ Todos os materiais testados foram capazes de diminuir o tempo de coagulação do sangue quando comparados ao controle.
- ✓ Ainda no teste de TC a HemoFiber 3 gerou tempos mais curtos em relação as HemoFibers 1 e 2;
- ✓ Para as HemoFibers 1 e 3 os tempos de coagulação foram independentes das concentrações testadas. Já para a HemoFiber 2 a concentração C3 mg/mL se mostrou mais eficiente do que as demais.

REFERÊNCIAS*

Areid, N; Kangasniemi, I; Söderling, E; Närhi TO. Ultraviolet photofunctionalization of nanostructured titanium surfaces enhances thrombogenicity and platelet response. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. Springer US; 2018;29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-018-6067-z>

Austen, D.E.G; Rhymes I.L. *A Laboratory Manual of Blood Coagulation*. Blackwell Scientific Publications, 1975.

Babu, K. S.; Anandkumar, M.; Tsai, T. Y.; Kao, T. H.; Inbaraj, B. S.; Chen, B. H. Cytotoxicity and antibacterial activity of gold supported cerium oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2014, 9: 5515-5531,

Báčovská, R., Wisian-Neilson, P., Alberti, M., Příhoda, J., Zárybnická, L., Voráč, Z. Phenyl-methyl phosphazene derivatives for preparation and modification of hydrophobic properties of polymeric nonwoven textiles. *Reactive and Functional Polymers*, 2016: 100: 53-63.

Bajkin BV, Popovic SL, Selakovic SD: Randomized, prospective trial comparing bridging therapy using low-molecular-weight heparin with maintenance of oral anticoagulation during extraction of teeth. *J Oral Maxillofac Surg* 2009, 67(5): 990-995.

Blok, L. J. S., Engels, G. E., and van Oeveren, W. In vitro hemocompatibility testing: the importance of fresh blood. 2016. *Biointerphases* 11:029802.

Boulaiz H, Alvarez PJ, Ramirez A, Marchal JA, Prados J, Rodrí F. Nanomedicine : Application Areas and Development Prospects. *Int J Mol Sci*. 2011;12:3303–21

Braune, S., Grunze, M., Straub, A., and Jung, F.. Are there sufficient standards for the in vitro hemocompatibility testing of biomaterials?. 2013 *Biointerphases* 8:33. doi: 10.1186/1559-4106-8-33

Brewer A, Correa MA. Guidelines for dental treatment of patients with inherited bleeding disorders. *World Federation of Hemophilia* 2006;40:1-9.

Cancino J, Marangoni VS, Física I De, Carlos DS, Paulo UDS, Sp SC. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. *Quim Nova*. 2014;37(3):521–6

Chopra N, Gavalas VG, Bachas LG, Hinds BJ, Bachas LG. Functional One - Dimensional Nanomaterials: Applications in Nanoscale Biosensors Functional One-Dimensional Nanomaterials: Applications in Nanoscale Biosensors. *Anal Lett*. 2007;40(11):2067–96

Costa D, Leite R, Neves G, Santana L, Medeiros ES, Menezes RR. Synthesis of TiO₂ and ZnO nano and submicrometric fibers by solution blow spinning. *Mater Lett* [Internet]. Elsevier; 2016;183:109–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2016.07.073>

Costa FW, Rodrigues RR, Sousa LH, Carvalho FS, Chaves FN, Fernandes CP, et al: Local hemostatic measures in anticoagulated patients undergoing oral surgery: a systematized literature review. *Acta Cir Bras* 2013;28(1): 78-83.

Di Iorio D, Traini T, Degidi M, Caputi S, Neugebauer J, Piattelli A. Quantitative evaluation of the fibrin clot extension on different implant surfaces: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;74:636–42.

Ding Y, Leng Y, Huang N, Yang P, Lu X, Ge X, et al. Effects of microtopographic patterns on platelet adhesion and activation on titanium oxide surfaces. 2012;622–32.

Dumitriu C, Bogdan A, Titorencu I, Pruna V, Jinga V V, Latonen R, et al. Electrospun TiO₂ nano fibers decorated Ti substrate for biomedical application. 2014;45:56–63.

Eriksson C, Lausmaa J, Nygren H. Interactions between human whole blood and modified TiO₂-surfaces: Influence of surface topography and oxide thickness on leukocyte adhesion and activation. *Biomaterials* 2001;22:1987–1996.

Everett W, Scurr DJ, Rammou A, Darbyshire A, Hamilton G, Mel A De. OPEN A Material Conferring Hemocompatibility. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26848>

Farias, R. M. C.; Menezes, R. R.; Oliveira, J. E.; Medeiros, E. S. Production of submicrometric fibers of mullite by solution blow spinning (SBS). 2015 *Materials Letters*, 149:47–49.

Ferreira CN, Sousa M de O, Dusse LMS, Carvalho M das G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(55 31):416–21.

Franco RF, - Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto* 2001, 34: 229-237, jul./dez.

Fröhlich E. Action of Nanoparticles on Platelet Activation and Plasmatic Coagulation. 2016; *Current Medicinal Chemistry*, **23 (5)**: 408–30.

Gupta G, Muthusekhar MR, Kumar SP. Efficacy of Hemocoagulase as a Topical Hemostatic Agent After Dental Extractions: A Systematic Review Structured question. 2018;10(3).

Hartmann, R. C.; Jenkins, D. E.; Arnold, A. B. Diagnostic specificity of sucrose hemolysis test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 1970. 35(4): 462-475.

Hansson KM, Tosatti S, Isaksson J, Wettero J, Textor M, Lindahl TL, et al. Whole blood coagulation on protein adsorption-resistant PEG and peptide functionalised PEG-coated titanium surfaces. *Biomaterials*. Netherlands; 2005 Mar;26(8):861–72.

Hong CH, Napenas JJ, Brennan MT, Furney SL, Lockhart PB: Frequency of bleeding following invasive dental procedures in patients on low-molecular-weight heparin therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(5): 975-979.

Hong J, Azens A, Ekdahl KN, Granqvist CG, Nilsson B. Material-specific thrombin generation following contact between metal surfaces and whole blood. *Biomaterials*. Netherlands; 2005 Apr;26(12):1397–403.

Hong J, Kurt S, Thor A. A hydrophilic dental implant surface exhibits thrombogenic properties in vitro. *Clin Implant Dent Relat Res*. United States; 2013 Feb;15(1):105–12.

Huang N, Chen YR, Luo JM, Yi J, Lu R, Xiao J, et al. In vitro investigation of blood compatibility of Ti with oxide layers of rutile structure. *J Biomater Appl*. England; 1994 Apr;8(4):404–12.

Huang Q, Yang Y, Zheng D, Song R, Zhang Y, Jiang P, et al. Effect of construction of TiO₂ nanotubes on platelet behaviors: Structure-property relationships. *Acta Biomater*. England; 2017 Mar;51:505–12.

Hulander M, Hong J, Andersson M, Gerven F, Ohlander M, Tengvall P, et al. Blood interactions with noble metals: coagulation and immune complement activation. *ACS Appl Mater Interfaces*. United States; 2009 May;1(5):1053–62.

Ishitoya H, Kawamura M, Linneweber J, Motomura T, Ichikawa S, Nishimura I, et al. Titania gel reduces thrombin generation. *Artif Organs*. United States; 2002 Nov;26(11):959–63.

International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009. 24p.

Junior OC. Ponderações nos procedimentos cirúrgicos odontológicos em pacientes sob terapia antitrombótica: revisão de literatura. 2016;315–9.

Kamoh A, Swantek J. Hemostasis in Oral Surgery. *Dent Clin NA* [Internet]. Elsevier Inc; 2012;56(1):17–23.

Kazancıoğlu HO, Çakır O, Ak G, Zülfiyar B. The Effectiveness of a New Hemostatic Agent (Ankaferd Blood Stopper) for the Control of Bleeding following Tooth Extraction in Hemophilia : A Controlled Clinical Trial. *Özet* : 2012;19–24.

Klingvall Ek R, Hong J, Thor A, Backstrom M, Rannar L-E. Micro- to Macroroughness of Additively Manufactured Titanium Implants in Terms of Coagulation and Contact Activation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. United States; 2017;32(3):565–74.

Kopf BS, Ruch S, Berner S, Spencer ND, Maniura-weber K. The role of nanostructures and hydrophilicity in osseointegration : In-vitro protein-adsorption and blood-interaction studies. 2015;2661–72.

Lakatos, E. M.; Marconi, M. A. Fundamentos da Metodologia Científica. 6.ed. São Paulo: Atlas, 2009.

Leelatian N, Diggins KE, Irish JM. Characterizing phenotypes and signaling networks of human cells by mass cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 2015.

Li H, Zhang W, Pan W. Enhanced Photocatalytic Activity of Electrospun TiO₂ Nanofibers with Optimal Anatase/Rutile Ratio. 2011;3187:3184–7.

Liu, X; Chu, P. K; Ding, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* December 2004: 47 (24): 49-121

Loescher AR, Robinson PP. The effect of surgical medicaments on peripheral nerve function. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998;36(5):327–32.

Maher S, Mazinani A, Barati MR, Losic D, Maher S, Mazinani A, et al. Expert Opinion on Drug Delivery Engineered titanium implants for localized drug delivery : recent advances and perspectives of Titania nanotubes arrays. *Taylor & Francis*; 2018;15(10):1021–37.

Maitz MF, Pham M-T, Wieser E, Tsyganov I. Blood compatibility of titanium oxides with various crystal structure and element doping. *J Biomater Appl. England*; 2003 Apr;17(4):303–19.

Malmquist JP, Clemens SC, Oien HJ, et al. Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon dental dressing. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(5):1177–83.

Mancuso ME, Santagostino E. Dental surgery in inherited bleeding disorders with minimal factor support: commentary. *Hemophilia* 2011;17:183-184.

Matlock-Colangelo L, Baeumner AJ. Biologically inspired nanofibers for use in translational bioanalytical systems. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2014;7:23-42.

Medeiros, ES; Klamczynski, A; Glenn, GM; Klamczynski, AP; Orts, WJ. Solution Blow Spinning : A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. *J Appl Polym Sci*. 2009;113(May 2014):2322–30

Morimoto Y, Niwa H, Minematsu K, et al. Risk factors affecting postoperative hemorrhage after tooth extraction in patients receiving oral antithrombotic therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69(6):1550–6.

Morimoto Y, Nakatani T, Yokoe C, Kudo C, Hanamoto H, Niwa H: Haemostatic management for oral surgery in patients supported with left ventricular assist device a preliminary retrospective study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 53(10): 991 - 995, 2015.

Mourão, CFAB, Alves, MDCM; Machado, RCM, Resende., RFB. The use of platelet-rich fibrin as a hemostatic material in oral soft tissues. *Oral Maxillofac Surg. Oral and Maxillofacial Surgery*; 2018;22:329–33.

Nuansing W, Ninmuang S, Jarernboon W. Structural characterization and

morphology of electrospun TiO₂ nanofibers. 2006;131:147–55.

Pan C-J, Pang L-Q, Gao F, Wang Y-N, Liu T, Ye W, et al. Anticoagulation and endothelial cell behaviors of heparin-loaded graphene oxide coating on titanium surface. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. Netherlands; 2016 Jun;63:333–40.

Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. Clin Oral Implants Res. 2000;11:530–9.

Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. Int J Pharm [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;484(1–2):57–74.

Rezaei B, Ghani M, Mousavi A, Rabiee M. Biosensors and Bioelectronics Electrochemical biosensors based on nanofibers for cardiac biomarker detection: A comprehensive review. Biosens Bioelectron. 2016;78:513–23.

Roy SC, Paulose M, Grimes CA. The effect of TiO₂ nanotubes in the enhancement of blood clotting for the control of hemorrhage. Biomaterials. 2007;28:4667–72.

Sanchez, J., Lundquist, P.B., Elgueb, G., Larsson, R. and Olsson, P.(2002). Measuring the Degree of Plasma Contact Activation Induced by Artificial Materials, Thromb. Res., 105: 407–412.

Silva, PA; Alves, HB, Comar, SR; Henneberg, R; Merlin, JC; Stinghen, ST. Hematologia Laboratorial. Artmed, 2015.

Silverthorn, Dee Unglaub. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

Singhal, J. P.; Ray, A. R. Synthesis of blood compatible polyamide block copolymers. 2002.Biomaterials, 23(4) : 1139-1145.

Sumanth KN, Prashanti E, Aggarwal H, et al.: Interventions for treating postextraction bleeding. Cochrane Database Syst Rev. 2016, 10:011930.

Smith BS, Yoriya S, Grissom L, Grimes CA, Popat KC. Hemocompatibility of titania nanotube arrays. J Biomed Mater Res. 2010;95A(2):350–60.

Stavitsky, A. B.; Jarchow, C. C. Micromethods for the study of proteins and antibodies I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. The journal of immunology, 1954 72(5): 360-367.

Theo U, Biehl V, Schenk J. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. 2002;19:3–8.

Thor A, Rasmusson L, Wennerberg A, Thomsen P, Hirsch J-M, Nilsson B, et al. The role of whole blood in thrombin generation in contact with various titanium surfaces. Biomaterials. Netherlands; 2007 Feb;28(6):966–74.

Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(1):15–30.

Vezeau, P. J. Topical Hemostatic Agents What the Oral and Maxillofacial Surgeon Needs to Know, *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am* 28 (2016) 523–532

Weber M, Steinle H, Golombek S, Hann L, Schlensak C, Wendel HP, et al. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. 2018;6(July).

Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Eng*. 2005;11:1–18.

Yazdanyar A, Aschauer U, Bowen P. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Interaction of biologically relevant ions and organic molecules with titanium oxide (rutile) surfaces: A review on molecular dynamics studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. Elsevier B.V.; 2018;161:563–77.

Yahyapour N, Eriksson C, Malmberg P, Nygren H. Thrombin, kallikrein and complement C5b-9 adsorption on hydrophilic and hydrophobic titanium and glass after short time exposure to whole blood. *Biomaterials* 2004; 25:3171–3176.

Zhang F, Li C, Wang X, Zheng Z, Liu X. [Study on the mechanism of hemocompatibility of titanium oxide films]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. China; 2000 Jun;17(2):146–50.

Zirk M, Fienitz T, Edel R, Kreppel M, Dreiseidler T, Rothamel D: Prevention of postoperative bleeding in hemostatic compromised patients using native porcine collagen fleeces-retrospective study of a consecutive case series. *Oral Maxillofac Surg* 2016, 20(3): 249-254.

Zirk M, Zinser M, Buller J, Bilinsky V, Dreiseidler T, Kreppel M, et al. Supportive topical tranexamic acid application for hemostasis in oral bleeding events e Retrospective cohort study of 542 patients. 2018;46:932–6.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

ANEXO

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Síntese, caracterização, citotoxicidade e imunomodulação de scaffolds cerâmicos puros e dopados em leucócitos humanos

Pesquisador: ANDRÉ ULISSES DANTAS BATISTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60924816.1.0000.5188

Instituição Proponente: Universidade Federal da Paraíba

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.828.476

Apresentação do Projeto:

Pesquisa experimental, laboratorial e caráter ex vivo, que objetiva caracterizar e avaliar citotoxicidade e atividade imunomoduladora de scaffolds cerâmicos puros e dopados com íons frente a leucócitos humanos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Sintetizar, caracterizar e avaliar citotoxicidade e atividade imunomoduladora de scaffolds cerâmicos puros e dopados com íons em leucócitos humanos.

Objetivo Secundário:

• Sintetizar e caracterizar a microestrutura dos scaffolds cerâmicos puros e dopados com íons estrôncio e prata; • Avaliar o perfil de liberação dos íons prata e estrôncio nos scaffolds produzidas; • Avaliar o perfil de liberação de citocinas dos linfócitos humanos expostos aos scaffolds por técnica de Imunoensaio enzimático e citometria de fluxo; • Avaliar a indução de proliferação de monócitos humanos expostos aos scaffolds por técnica de citometria; • Avaliar de espécies reativas de oxigênio ROS em neutrófilos humanos expostos aos scaffolds por técnica de citometria; • Avaliar a capacidade de ativação e modulação de receptores de superfície celular em

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.061-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: etica@ccs.ufpb.br

Continuação do Parecer: 1.028.478

linfócitos expostos aos scaffolds por técnica de citometria de fluxo;* Avaliar a expressão de RNA mensageiro de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e de proliferação celular em linfócitos e neutrófilos humanos expostos aos scaffolds por técnicas de biologia molecular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue através de punções venosas para exames laboratoriais com seringas e agulhas descartáveis e estéreis podem, embora sejam raros, resultarem em dor no local da punção, manchas rochas transitórias chamadas de equimoses, desconforto e a possibilidade de infecção.

Benefícios:

Elucidar a citotoxicidade e atividade imunomoduladora de scaffolds cerâmicos, potenciais materiais para uso na engenharia de tecidos objetivando a regeneração óssea.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante com metodologia bem fundamentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória atendem aos requisitos formais do CEP.

Recomendações:

Não há recomendações, uma vez que o pesquisador atendeu a recomendação do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou de parecer favorável a execução dessa pesquisa, salvo melhor juízo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_797260.pdf	25/10/2016 00:42:52		Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_ao_CEP.pdf	25/10/2016 00:42:36	ANDRÉ ULISSES DANTAS BATISTA	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	25/10/2016 00:42:18	ANDRÉ ULISSES DANTAS BATISTA	Acelto
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	25/09/2016 22:52:18	Roberta Ferreti Bonan Dantas Batista	Acelto
Outros	autorizacao.pdf	25/09/2016	Roberta Ferreti	Acelto

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: etica@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 1.826.476

Outros	autorizacao.pdf	22:51:33	Bonan Dantas Batista	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	21/09/2016 00:12:23	Roberta Ferreti Bonan Dantas Batista	Aceito
Outros	Certidao.jpg	21/09/2016 00:09:55	Roberta Ferreti Bonan Dantas Batista	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 21 de Novembro de 2016

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

APÊNDICE



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre a hemocompatibilidade e trombogenicidade de **nanofibras cerâmicas de óxido de titânio (TiO₂)** e está sendo desenvolvida por Sara Brito da Silva, mestranda em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal da Paraíba, com orientação dos Professores Drs. Lúcio Roberto Cançado Castellano e André Ulisses Dantas Batista.

A finalidade deste trabalho é contribuir para o esclarecimento acerca dos efeitos das nanofibras cerâmicas sobre as células do sangue humano. Se você concordar em participar deste estudo será coletado 1 amostra de 12 mls do seu sangue que será submetida a exames laboratoriais exclusivamente destinados a este estudo. A partir desta amostra serão realizados testes (exames com o sangue) para determinação da toxicidade das nanofibras. A coleta será realizada por um profissional habilitado e os tubos serão codificados, de modo a garantir sigilo sobre a identidade do participante.

As coletas de sangue através de punções venosas para exames laboratoriais com seringas e agulhas descartáveis e estéreis podem, embora seja raro, resultar em dor no local da punção, manchas rochas transitórias chamadas de equimoses, desconforto e a possibilidade de infecção. Em caso de danos decorrentes de sua participação no estudo, haverá assistência integral e gratuita.

Os resultados deste estudo serão apresentados em eventos da área de saúde e publicados em revista científica. Por ocasião da publicação dos dados, será mantido o sigilo sobre todos participantes.

Sua participação é voluntária e, portanto, não há obrigação de fornecimento de informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador. Caso decida não fazer parte da pesquisa, ou resolver a qualquer momento desistir da mesma, não ocorrerá nenhum dano, nem modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Haverá ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo.

Os pesquisadores estarão à disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer momento da pesquisa. Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor contatar os pesquisadores: Sara Brito da Silva, Lúcio Roberto Cançado Castellano ou André Ulisses Dantas Batista. Endereço (Setor de Trabalho): Universidade Federal da Paraíba – Campus I / Cidade Universitária - João Pessoa - PB – Brasil, Telefone (83) 3216-7189 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba Campus I - Cidade Universitária - 1º Andar – CEP 58051-900 – João Pessoa/PB. Telefone: (83) 3216-7791 – E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com.

Dados os devidos esclarecidos e, caso haja consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados, favor assinar no campo a baixo.

_____	____ / ____ / ____
Assinatura do Participante	dia mês ano

_____	____ / ____ / ____
Assinatura de Testemunha, se necessário	dia mês ano

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante

Este termo é impresso em duas vias. Uma será entregue ao participante e a outra ficará de posse do pesquisador.

Obs.: O sujeito da pesquisa ou seu representante e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do TCLE e colocar suas assinaturas na última página do referido Termo.