ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO F
TESE DEFENDIDA POR JUAN CARLOS V.
SERRA E APROVA
COMISSÃO JULGADORA EM 10 / 05 / 2002
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

Obtenção e Caracterização de Revestimentos não Trombogênicos, em Tubos de PVC Utilizados na Circulação Extracorpórea

Autor: **Juan Carlos Valdés Serra**
Orientador: **Prof. Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda**
Co-Orientador: **Dr. Waldyr Parolari Novello**

20/2002

UNICAMP
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DOS MATERIAIS

Obtenção e Caracterização de Revestimentos não Trombogênicos, em Tubos de PVC Utilizados na Circulação Extracorpórea

Autor: **Juan Carlos Valdés Serra**
Orientador: **Prof. Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda**
Co-Orientador: **Dr Waldyr Parolari Novello**

Curso: Engenharia Mecânica
Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Tese de Doutorado apresentada à comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2002
São Paulo – Brasil

2002904

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
V233o
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 50398
PROC 16-837/02
C ____ DX ____
PREÇO R$ 11,00
DATA 16-08-02
Nº CPD ____

CM00172539-2

BIB ID 255824

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

V233o

Valdés Serra, Juan Carlos
Obtenção e caracterização de revestimentos não trombogênicos, em tubos de PVC utilizados na circulação extracorpórea / Juan Carlos Valdés Serra. --Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadores: Antonio Celso Fonseca de Arruda e Waldyr Parolari Novello.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Cloreto de polivinila. 2. Heparina. 3. Superfícies (Tecnologia). 4. Revestimentos. 5. Plasma de baixa temperatura. I. Arruda, Antonio Celso Fonseca. II. Novello, Waldyr Parolari. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DOS MATERIAIS

TESE DE DOUTORADO

Obtenção e Caracterização de Revestimentos não Trombogênicos, em Tubos de PVC Utilizados na Circulação Extracorpórea

Autor: **Juan Carlos Valdés Serra**
Orientador: **Antonio Celso Fonseca de Arruda**
Co-Orientador: **Waldyr Parolari Novello**

Prof. Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda
DEP/FEM/UNICAMP

Profa Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
DEMA/FEM/UNICAMP

Profa Dra. Maria Helena Andrade Santana
DPB/FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. César Costapinto Santana
DPB/FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. José Francisco Biscegli
CTPE/Inst. Dante P. Cardiologia/Sec. Saude-SP

Campinas, 10 de maio de 2002

Agradecimentos

Aos Professores: Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda (orientador) e Dr. Waldyr Parolari Novello (co-orientador), pela orientação e força no desenvolver deste trabalho.

Ao corpo técnico e colegas da Faculdade de Engenharia Mecânica, especialmente do DEMA e LABIOMEC, pelo apoio no desenvolvimento experimental do trabalho.

À professora Dra Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, por tornar possível a realização de alguns ensaios e sempre me estimulando profissionalmente.

Ao Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, pela realização do ensaio de hemocompatibilidade *in vitro*, especialmente à Dra. Margaret e à Perfusionista Tânia.

Ao Laboratório de Plasmas e Aplicações do Departamento de Física e Química da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (UNESP), especificamente ao Professor Nilson C. Cruz e ao Professor Rogério, por tornar possível o tratamento com plasma e medidas do ângulo de contato das amostras.

À Empresa Esterilizadora de Material Medico Hospitalar-ACECIL/Campinas-SP, pela colaboração desinteressada e ajuda na parte de esterilização do material analisado.

Ao Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX – FINEP) pelo suporte financeiro dado ao presente trabalho.

À Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP, pela oportunidade e apoio.

Ao Centro Universitário Luterano de Palmas-TO, em especial à coordenação de Engenharia Agrícola, pelo apoio durante este tempo.

A todos aqueles que através de discussões, críticas e sugestões ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

CAPÍTULO 1. 1
Introdução e Objetivos 1
1.1. Introdução 1
1.2 Objetivo Geral do Trabalho 7
CAPÍTULO 2. 8
Revisão de Literatura 8
2.1. Introdução aos Biomateriais. Definição e Aplicações 8
2.1.1.Polímeros Biomédicos 10
2.1.2. Poli(Cloreto de Vinila) – PVC. 11
2.1.3. Histórico do PVC de grau medico 12
2.1.4. Vantagens do PVC 13
2.1.5. Propriedades Físico-Químicas do PVC 14
2.2.Circulação Extracorpórea do Sangue (CEC) 16
2.2.1. Fisiologia do sangue 18
2.2.2 Hemostasia e Coagulação 18
2.2.3 Sistema de Coagulação 19
2.2.4 Coagulação e Trombogênese 19
2.3.2. Anticoagulação 23
2.2.1. Heparina 24
2.3.2.2. Características Químicas da Heparina 26
2.3.2.3. Mecanismo de Ação da Heparina 27
2.3.2.4. Cloreto de Benzalcônio 29
2.3.3. Resposta do Organismo Humano à Circulação Extracorpórea 31

2.4. Superficies, Propriedades e Caracterização 32
2.4.1.Métodos de Caracterização Físico-Quimicas da Superfície de um Biomaterial 35
2.4.2. Revestimentos com Heparina 36
2.4.2.1. Importância dos Revestimentos com Heparina na Circulação Extracorpórea 38
2.4.3. Revestimento de Superfícies através de Plasma 40
CAPÍTULO 3. 42
Procedimento Experimental 42
3.1. Materiais Utilizados 42
3.1.1 Tubos de PVC 43
3.1.1.1 Discos de PVC 44
3.1.1.2 Segmentos de tubos de PVC 44
3.1.1.3 Placas de PVC 44
3.1.2 Solução de Heparina-Cloreto de Benzalcônio 45
3.2. Métodos de Obtenção dos Revestimentos 45
3.2.1 Limpeza dos substratos 46
3.2.2 Método I (Revestimento com Heparina) 46
3.2.3 Método II (Revestimento com Plasma) 46
3.3. Planejamento Experimental 48
3.4. Caracterização Física dos Revestimentos 52
3.4.1 Caracterização superficial 52
3.4.1.1 Microscopia Óptica (MO) 53
3.4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 53
3.4.2 Rugosidade Superficial 54
3.4.3 Medidas de Ângulo de Contato 59
3.4.4 Espectroscopia de Infravermelho com Refexão Interna Multipla (MIR) 61
3.5 Avaliação da Hemocompatibilidade (in-vitro) 65
3.5.1 Tempo de Protrombina (TP) 66
3.5.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) 67
3.5.3 Tempo de Trombina (TT) 68
3.5.4 Fibrinogênio 69
3.5.5 Contagem de Plaquetas 70

3.6 Avaliação do Envelhecimento no Revestimento 71
CAPÍTULO 4. 73
4.2 Caracterização Física dos Revestimentos 74
4.2.1 Caracterização Superficial 74
4.2.1.1 Microscopia Óptica (MO) 74
4.2.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 78
4.2.2 Rugosidade Superficial 91
4.2.3 Medidas de Ângulo de Contato 100
4.2.4 Espectroscopia de infravermelho com refexão interna multipla (MIR) 109
4.3 Avaliação da Hemocompatibilidade (*in-vitro*) 112
4.4 Avaliação do Envelhecimento no Revestimento 117
4.5 Discussões finais 120
CAPÍTULO 5. 122
Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros 122
Conclusões 122
Sugestões para Trabalhos Futuros 125
Referências Bibliográficas 126
Bibliografia Adicional Consultada 135

Resumo

VALDÉS SERRA, Juan Carlos, *Obtenção e Caracterização de Revestimentos não Trombogênicos, em Tubos de PVC, Utilizados na Circulação Extracorpórea*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 138 p. Tese (Doutorado).

As cirurgias cardiopulmonares são freqüentemente associadas a procedimentos de circulação extracorpórea (CEC), os quais necessitam de conectores, tubos, reservatórios, etc. O contato entre o sangue e superfícies artificiais na CEC provoca alterações adversas como, por exemplo, a adesão e destruição de glóbulos vermelhos, a adesão e agregação plaquetária e a ativação da coagulação sanguínea. Este trabalho compreende o desenvolvimento e caracterização de revestimentos superficiais não trombogênicos para utilização na superfície interna de tubos de poli(cloreto de vinila) (PVC), muito utilizados em procedimentos de circulação extracorpórea. Foram avaliados: tubos não revestidos, tubos revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio e tubos revestidos com plasma de baixa energia *(GlowDischarge)*. Os métodos para caracterização foram: microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), determinação da rugosidade superficial, medidas de ângulo de contato, espectroscopia de infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR) e avaliação do envelhecimento no revestimento. Também foi analisado o comportamento da hemocompatibilidade através da determinação de alguns parâmetros da coagulação: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de trombina (TT), fibrinogênio e número de plaquetas. As análises por MO mostram ranhuras no material, o que é atribuído ao processo de fabricação dos tubos (extrusão), observando-se que para aumentos analisados não existe diferença entre os substratos revestidos e não revestidos. Já nos resultados via MEV com aumentos maiores, observa-se os revestimentos com topografias superficiais diferentes em comparação ao substrato, dependendo do método de revestimento. Foi determinada a espessura do revestimento com heparina, apresentando uma distribuição homogênea oscilando por volta de 1 μm. O ensaio de rugosidade superficial para substratos não revestidos mostra, que o calibre mais rugoso foi o de 1/2" (12,7 mm), sendo o mais trombogênico. O ângulo de contato mostra que o componente polar para todos os revestimentos é menor que o componente dispersivo de energia superficial, demonstrando características de materiais hidrofóbicos em todos os revestimentos superficiais obtidos. No teste de infravermelho, conclui-se que as modificações causadas pelos revestimentos são muito superficiais, permitindo que a radiação fosse absorvida pelo substrato de PVC, demonstrando que o teste não é o adequado para avaliar estas modificações superficiais. O comportamento dos revestimentos quanto à hemocompatibilidade demonstrou que tubos revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio retardam os parâmetros da coagulação. Para revestimentos com plasma destaca-se o revestimento com SF_6, que não provoca mudanças significativas nos parâmetros medidos, mantendo valores muitos parecidos com a amostra inicial, para um tempo de exposição *in vitro* de 2,5 horas.

Palavras Chaves
Revestimentos não Trombogênicos, Heparina-Cloreto de Benzalcônio, Poli(cloreto de vinila), Circulação Extracorpórea, Hemocompatibilidade, Caracterização superficial, tubos de PVC.

Abstract

VALDÉS SERRA, Juan Carlos, *Obtention and Characterization of non-thrombogenic coating, in PVC tubes, used in extracorporeal circulation*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 138 p. Tese (Doutorado)

Cardiopulmonary surgeries are frequently associated to procedures of extracorporal circulation (ECC), which need connectors, tubes, reservoirs, etc. Contact between the artificial blood and surfaces in the ECC improve adverse alterations such as, for example, red globule adhesion and destruction, adhesion and aggregation platelet and the activation of blood coagulation. This work is based on the development and characterization of non-thrombogenic superficial coating for use in the internal surface of poly(vinyl chloride) (PVC) tubes, many used in extracorporeal circulation procedures. The following were evaluated: non-coated tubes, heparin- benzalkonium chloride coated tubes and plasma (Glow Discharge) coated tubes. The methods for characterization were: optic microscopy (OM), scanning electronic microscopy (SEM), determination of superficial roughness, measurement of contact angle, infra-red ray spectroscopy (IRM) and aging evaluation the coating. Also the behavior of the hemocompatibilidade through the determination of some coagulation parameters was analyzed: time of prothrombin (TP), time of activated partial thromboplastin (TAPT), trombin time (TT), fibrin and number of platelets. The OM analyses show grooves in the material, which is attributed to the manufacture process of the tubes (route), observing that for analyzed increases there is no difference between coated and non-coated substrate. Coating with different superficial topography in relation to the substratum, depending on the coating method, were observed in the results with higher SEM increases observes. The thickness of the coating with heparin was determined, presenting a homogeneous distribution oscillating around 1 μm. The assay of superficial roughness for the non-coated substrate sample, that the bore roughest caliber was ½", (12.7 mm), which was the most thrombogenic. The contact angle showed that the polar component for all treatment was less than the dispersive component of superficial energy, demonstrating hydrophobic materials characteristics in all the superficial treatment obtained. In the infra-red ray test it was concluded that the modifications caused by the coatings were very superficial, allowing the radiation to be absorbed by the PVC substratum, which demonstrated that the test is not adequate for these superficial modifications. The behavior of coatings in term of hemocompatibility demonstrated that tubes coated with heparin- benzalkonium chloride delay the coagulation parameters. For coatings with plasma, the coating with SF6 stands out, as it does not provoke significant changes in the measured parameters, maintaining many values similar to the initial sample, for a display time in vitro of 2.5 hours.

Key Words

Non-Thrombogenic Coating, Heparin-Benzalkonium Chloride Poly(vinyl chloride), Extracorporeal Circulation, Hemocompatibility, Superficial Characterization, PVC tubes.

Lista de Figuras

Figura 2.1 Estrutura do PVC obtida do monômero Cloreto de Vinila. 15
Figura 2.2 Esquema geral do circuito da Circulação Extracorpórea com oxigenador de bolhas. (A) linha arterial; (B) linha venosa; (C) linhas aspiradoras; (D) linha de cardiotomia; (E) linha de gás; (F) linhas de água do permutador de calor (Adaptado de Souza e Elias, 1995) 16
Figura 2.3 Representação esquemática da Circulação Extracorpórea: VCS - veia cava superior / VCI – veia cava inferior (Adaptado de Souza e Elias, 1995). 17
Figura 2.4 Esquema da cascata de coagulação (Adaptado de VERRASTRO et al., 1996) 22
Figura 2.5 Estrutura da Heparina 27
Figura 2.6 Mecanismo de ação da Heparina 28
Figura 2.7 Estrutura geral do Cloreto de Benzalcônio (Adaptado Thomas e Kakkar, 1976). 30
Figura 2.8 Principais métodos de ligação da heparina sobre superfícies poliméricas (Adaptado CBAS, 2000). 38
Figura 2.9 Processo de revestimento por plasma de baixa energia *(Glow Discharge)* (Adaptado Gala, 2001). 41
Figura 3.1 Calibres de tubos de PVC para uso médico mais utilizados em procedimentos de CEC. A) tubo 3/16" (4,75mm); B). tubo ¼" (6,35mm); C) tubo 3/8" (9,52mm); D) tubo ½" (12,7mm). 43
Figura 3.2 Esquema do reator de Plasma *(Glow Discharge)*. (Adaptado PEMM, 2001) 47
Figura 3.3- Fluxograma das etapas envolvidas no planejamento experimental. 49
Figura 3.4 Esquema de funcionamento de um rugosímetro 54
Figura 3.5 Exemplo de medição de rugosidade para uma chapa de aço galvanizado. 56
Figura 3.6 Determinação da Rugosidade Média (Ra) 57

Figura 3.7 Determinação da Rugosidade Máxima (Rmax) 57
Figura 3.8 Determinação da Rugosidade Total (Rt) 58
Figura 3.9 Determinação da Rugosidade Média Aritmética (Rz) 58
Figura 3.10 Determinação da Rugosidade Média do terceiro pico e vale (R_{3Z}) 59
Figura 3.11 - Diagrama do ângulo de contato. 61
Figura 3.12 Espectro MIR de um poli(cloreto) de vinila (PVC) típico 64
Figura 3.13 Coagulometro TROMBOLIZER-COMPACT XR, do centro HEMOCAMP / UNICAMP 66
Figura 4.1.Micrografias superficiais dos tubos de PVC não revestidos de calibres diferentes. 75
Figura 4.1. Micrografias superficiais dos tubos de PVC não revestidos de calibres diferentes. (continuação) 76
Figura 4.2 Micrografias superficiais MO do calibre PVC 3/8" (9,52 mm): A) PVC não revestido; B) PVC revestido com heparina-cloreto de Benzalcônio. 77
Figura 4.3 Micrografias superficiais MEV, do substrato de PVC: A) PVC não revestido; B) PVC revestido 79
Figura 4.4 Micrografia do substrato revestido de PVC via MEV, com os pontos do microanálise.1) Fenda --; 2) Matriz. 80
Figura 4.5 Corte transversal do tubo de PVC revestidos, em que mostra a espessura do revestimento de heparina, aproximadamente 1μm. 81
Figura 4.6 Micrografias realizadas pelo MEV da superfície tratada com plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre) 83
Figura 4.7 Microestruturas obtidas pelo MEV dos tubos de PVC em várias regiões não revestidos (coluna da esquerda) e tubos revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio (coluna da direita), depois do contato com sangue por 2,5 horas. 85
Figura 4.7 (continuação) Micrografias obtidas pelo MEV dos tubos de PVC em várias regiões não revestidas (coluna da esquerda) e tubos revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio (coluna da direita), depois do contato com sangue por 2,5 horas. 86
Figura 4.8 Micrografias obtidas pelo MEV dos tubos de PVC não revestidos, depois do contato com sangue por 2,5 horas. Características da neo-íntima. 87

Figura 4.9 Micrografia obtida pelo MEV do revestimento com plasma de SF_6 sobre substratos de PVC, depois de 2,5 horas em contato com sangue humano. Tubos não revestidos (coluna da esquerda) e tubos revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio (coluna da direita)..... 88

Figura 4.10 Micrografias (MEV) dos diferentes grupos de superfícies analisados sem estar em contato com o sangue..... 90

Figura 4.11 Representação do Rmax (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC..... 93

Figura 4.12 Representação do Rmax (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC..... 93

Figura 4.13 Representação do Rz (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC..... 94

Figura 4.14 Representação do Rz (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC..... 95

Figura 4.15 Representação do R_{3Z} (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC..... 96

Figura 4.16 Representação do R_{3Z} (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC..... 96

Figura 4.17 Representação do Ra (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC..... 97

Figura 4.18 Representação do Ra (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC..... 98

Figura 4.19 Representação do Rt (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC..... 99

Figura 4.20 Representação do Rt (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC..... 99

Figura 4.21 Comportamento do ângulo de contato para os diferentes revestimentos do tubo de PVC..... 107

Figura 4.22 Comportamento da energia de superfície harmônica para os diferentes revestimentos do tubo de PVC..... 108

Figura 4.23 Espectros de ATR das superficies internas do PVC modificadas: A) PVC não revestido; B) PVC revestido com solução de Heparina-cloreto de Benzalcônio; C) PVC revestido com Plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre)..... 110

Figura 4.23 (continuação) Espectros de ATR das superficies internas do PVC modificadas: A) PVC não revestido; B) PVC revestido com solução de Heparina-cloreto de Benzalcônio; C) PVC revestido com Plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre)..... 111

Figura 4.24 Comportamento do fibrinogenio nos diferentes calibres de tubos revestidos e não revestidos. 114

Figura 4.25 Amostras de tubos de PVC, revestidas, esterilizadas e emabaladas pela empresa ACECIL..... 117

Figura 4.26 Micrografias obtidas pelo MEV das amostras de tubos de diferentes calibres envelhecidas por 8 meses. A) PVC 3/16" (4,75mm); B) PVC ¼" (6,35mm); C) PVC 3/8" (9,52mm) e D) PVC ½" (12,7mm). 118

Figura 4.26 (continuação) Micrografias obtidas pelo MEV das amostras de tubos de diferentes calibres envelhecidas por 8 meses. A) PVC 3/16" (4,75mm); B) PVC ¼" (6,35mm); C) PVC 3/8" (9,52mm) e; D) PVC ½" (12,7mm). 119

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Técnicas de caracterização de superfície e suas abreviações (Adaptado Lelah e Cooper, 1986). 35

Tabela 4.1 Resultados da microanálise feita no revestimento Heparina – Cloreto de Benzalcônio 81

Tabela 4.2 Resultados dos parâmetros de rugosidades para o Tubo 3/16" (4,75 mm) 91

Tabela 4.3 Resultados dos parâmetros de rugosidades para o Tubo 1/4" (6,35 mm) 92

Tabela 4.4 Resultados dos parâmetros de rugosidades para o Tubo 3/8" (9,52 mm) 92

Tabela 4.5 Resultados dos parâmetros de rugosidades para o Tubo 1/2" (12,7 mm) 92

Tabela 4.6 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para os diferentes revestimentos superficiais do PVC. 106

Tabela 4.7 Resultados dos testes de hemocompatibilidade, para os diferentes calibres revestidos do PVC. 113

Tabela 4.8 Resultados dos testes de hemocompatibilidade, para os diferentes revestimentos superficiais do PVC. 115

Nomenclatura

Letras Latinas

A_S – Área superficial dos discos

d – diâmetro dos tubos de PVC

E_e - Energia eletrônica

E_r - Energia rotacional

E_T - Energia térmica da molécula

E_t - Energia translacional

E_V - Energia vibracional

K - Kelvins

L_e – Comprimento de amostragem

L_t – Comprimento Total

L_m – Comprimento da medição

N_c - Número de réplicas

R_{3Z} - Rugosidade Média do Terceiro Pico e Vale

Ra - Rugosidade Média

Rmax - Rugosidade Máxima

Rt - Rugosidade Total

Rz - Rugosidade Média aritmética

S - Desvio padrão

S - Desvio padrão

t - *t* de Student

T_g – temperatura de transição vítrea

T_m – temperatura de fusão cristalina

y_i - Componente dos resultados da amostra

$\bar{y}$ - Média resultante dos componentes da amostra

Letras Gregas

δ - Intervalo de confiança

α - tolerância

γ_{LV} - Energia livre superficial do líquido.

γ_{SL} - Energia livre interfacial entre o sólido e o líquido.

γ_{SV} - Energia livre superficial do sólido.

θ - Ângulo de contato

μm - mícron

Abreviações

ADP - Adenosina difosfato

ATR - Espectroscopia de reflexão interna múltipla Atenuada

CE - Células endoteliais

CEC – Circulação Extracorpórea

DNA – ácido desoxi-ribonucleico

ESCA - Espectroscopia Eletrônica para Análises Químicas

Fator I – Fibrinogênio

Fator II - Protrombina

Fator III – Tromboplastina

Fator IV – Cálcio

Fator IX - Fator anti-hemofílico B

Fator V - Fator Lábil

Fator VII - Fator Estável

Fator VIII C - Fator anti-hemofílico A

Fator VIII vW - Fator von Willebrand

Fator X - Fator Stuart-Prower

Fator XI - Fator anti-hemofílico C

Fator XII - Fator de contato

Fator XIII - Fator estabilizador da fibrina

HCB - Heparina-Cloreto de Benzalcônio

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

MO - Microscópio Óptico

PE - Polietileno

PEG - Poli(etileno glicol)

PMMA - Poli(metil metacrilato)

PVC - Poli(cloreto de vinila)

PVDF - Poli(fluoreto de vinilideno)

SIMS - Espectroscopia de Massa de Íon Secundário

TC - Tempo de coagulação

TCA - Tempo de coagulação ativado

TIH - Trombocitopenia induzida pela Heparina

TP - Tempo de Protrombina

TPT - Tempo parcial de tromboplastina

TT - Tempo de Trombina

TTPA - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

U. V. - Luz ultravioleta

UI - Unidades Internacionais

VCI – Veia cava inferior

VCS - Veia cava superior

Símbolos Químicos

Ar – Argônio

C - Carbono

Cl - Cloro

H – Hidrogênio

K – Potássio

O_2 - Oxigênio

SF_6 - Hexafluoreto de Enxofre

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivos

1.1. Introdução

Desde que o homem surgiu na Terra, o mesmo tem executado trabalhos de engenharia, utilizando materiais para garantir sua sobrevivência e conforto. A necessidade de alimentação, moradia, vestimentas, veículos de transporte, armas, etc., fez com que o ser humano recorresse aos mais diferentes tipos de materiais ao longo de sua existência. No início foram utilizados os materiais disponíveis, que se limitavam aos recursos que a natureza oferecia, tais como: ossos, madeira, pedra, barro, etc.

Mas a curiosidade e a inteligência humana possibilitaram a transformação de matérias primas naturais em materiais compostos ou conjugados, que passaram a suprir mudanças de hábitos e suas conseqüentes necessidades. O primeiro material de engenharia usado pelo homem foi a madeira, seguindo-se a pedra, depois os metais, a cerâmica, o vidro e, finalmente, os polímeros.

No início do século XX, aconteceu um fato que marcou a história da humanidade. Ficou provado que alguns materiais produzidos pela Química incipiente do final do século e que até então eram considerados como colóides, consistiam na verdade de moléculas gigantescas, que podiam resultar do encadeamento de 10 000 ou mais átomos de carbono. Esses produtos de

síntese apresentavam repetição de pequenas unidades estruturais em sua longa cadeia principal, e assim foram denominados polímeros, que provêm do grego "muitas partes". Um polímero resumidamente é uma grande molécula, freqüentemente contendo vários milhares de pequenas moléculas ligadas quimicamente entre si formando uma macromolécula gigante. Os termos "macromolécula" e "polímero" são sinônimos, mas a palavra "polímero" é mais utilizada. Alguns exemplos de produtos encontrados na natureza que possuem na sua estrutura imensas moléculas são: a madeira, a borracha, a lã, o DNA, entre outros (MANO, 2000).

Os polímeros são materiais muito utilizados no campo da medicina e estão substituindo com vantagens outros materiais. A diversidade das aplicações dos polímeros é devido à variedade de propriedades físicas e mecânicas que esses materiais oferecem, satisfazendo as necessidades especificas dessa área.

A variedade de polímeros utilizados na área médica vem crescendo, entre alguns dos mais utilizados temos, por exemplo, o poli(cloreto de vinila), chamado comercialmente como PVC, o poliuretano, o silicone, que são conhecidos como os mais biocompatíveis, seguidos por poliestireno, polietileno (PE), polipropileno, epóxi, politetrafluoroetileno (Teflon) e outros (BRUCK, 1982).

Dentre os polímeros termoplásticos, o poli(cloreto de vinila) (PVC) forma uma classe de materiais muito especiais, sendo muito utilizado na confecção de bolsas para armazenamento de sangue (sendo o material de armazenamento do sangue que melhor atende as exigências do processo de refrigeração), tubos para condução de sangue (cânulas, cateteres, etc), próteses, dispositivos extracorpóreos, artigos cirúrgicos, embalagens para medicamentos, pisos de salas onde é indispensável o alto índice de higiene e luvas (INSTITUTO PVC, 2000; CHAPMAN, 1993).

Muitos estudos têm sido feitos analisando a biocompatibilidade do PVC com o sangue e de outros polímeros e, apesar dos inúmeros avanços alcançados, um dos maiores problemas encontrados refere-se à formação de trombos na interface sangue-polímero, ou seja, a coagulação

do sangue se apresenta na forma de trombos e êmbolos (PARK et al., 1992). A indução da formação de trombos envolve uma série de eventos iniciados pela deposição de uma camada protéica na interface sangue - polímero, seguida da adesão de plaquetas, fibrina e, possivelmente, leucócitos (YOUNG et al., 1988).

O mecanismo de coagulação ocorre primeiramente quando o sangue entra em contato com o biomaterial, inicia-se com a adsorção de algumas proteínas do plasma na superfície do biomaterial, como, por exemplo, o fibrinogênio, a fibronectina, as γ-globulinas, a trombospondina e o fator de von Willebrand, na interface sangue-polímero. Essa adsorção protéica é usualmente seguida por adesão e ativação plaquetária, ocorrendo uma modificação na morfologia das plaquetas e liberação de alguns agentes como, por exemplo, o difosfato de adenosina (ADP). Após este evento, as plaquetas iniciam um processo de maior interação com a superfície do material e assim causam a ativação das plaquetas ainda não ativadas. Eventos subseqüentes são a polimerização da fibrina e a formação do trombo ou coágulo (PITT et al., 1986).

Nos procedimentos que envolvem circulação extracorpórea (CEC), em que o sangue circula no interior de tubos fabricados principalmente de PVC, podem ocorrer e desenvolverem-se trombos, os quais podem estar incrustados nas paredes internas dos tubos, podendo ocasionar bloqueio total ou parcial do tubo. Também podem estar flutuando, devido a um desprendimento dos trombos da superfície, funcionando como êmbolo, provocando bloqueios nos capilares de órgãos vitais e impedem ao mesmo tempo a irrigação sanguínea daqueles tecidos. Isso resulta em pequenos danos aos tecidos, enfartes ou até a morte do paciente (YOUNG et al., 1988).

São conhecidas as agressões por que passa o sangue quando entra em contato com uma superfície diferente à parte interna dos vasos sanguíneos, ou seja, o endotélio, que causa sérios danos à saúde do paciente, tais como coagulopatias, aumento da permeabilidade capilar pulmonar, desordens neurológicas, reações anafiláticas, disfunção do rim e outros órgãos. Por isso resultam de extrema importância a obtenção e preparação de biomateriais que sejam cada vez mais hemocompatíveis.

A única superfície não-trombogênica conhecida é o endotélio, o qual possui mecanismos antitrombóticos pela liberação de substâncias que interagem ativamente com o sangue em resposta a mudanças nas condições hemostáticas. A reprodução da atividade não-trombogênica do endotélio é um desafio para os pesquisadores de biomateriais. Neste sentido, foram incorporadas a várias superfícies sintéticas substâncias biologicamente ativas, tais como heparina e prostaciclina.

Nas últimas quatro décadas, muitos pesquisadores da área trabalharam incessantemente na obtenção de biomateriais não-trombogênicos e com isso surgiram diversas correntes de pesquisa, segundo CHAPMAN e CHARLES (1992). Uma das correntes estudou as cargas superficiais, sugerindo a obtenção de um material com superfície carregada negativamente. Outra linha de pesquisa sugere a existência de uma energia livre interfacial apropriada, ou uma superfície hidrofóbica, ou ainda o recobrimento da superfície do material como albumina. Uma pré-absorção de compostos não-trombogênicos como, por exemplo, a heparina (um anti-coagulante que posteriormente se descreve) na superfície do material conduziu a bons resultados. Entretanto, muitas vezes, ocorre erosão gradual do material depositado ou a dessorção do grupo não-trombogênico, ou ainda, no caso da heparina, a hemólise e a forte interação das plaquetas com a interface modificada.

Na prática atual, o revestimento das superfícies de um biomaterial com compostos não-trombogênicos pode ser realizado de forma covalente ou não. Revestimentos com ligações covalentes requerem procedimentos mais complexos de que revestimentos não covalentes. Entretanto, a escolha do método dependerá da função do biomaterial e do seu tempo de exposição ao ambiente biológico. Em casos em que o biomaterial estará em contacto com o sangue por longos intervalos de tempo, portanto, da ordem de dias, meses ou anos, há exigência de uma estabilidade maior por parte da superfície e, assim, ligações covalentes são mais adequadas. Caso o contato material-sangue for de pequena duração (na ordem de horas), ligações não covalentes podem ser utilizadas com sucesso.

CHAPMAN et al. (1985) e VALÊNCIA (1987) tentaram solucionar o problema da hemocompatibilidade obtendo materiais *in vitro* que imitem as interfaces biologicamente inertes ao sangue, como a superfície externa de glóbulos vermelhos e plaquetas, em que o fator comum é o tipo de lipídeo presente na membrana biológica, ou seja, os materiais foram recobertos por fosfolipídios, a fim de se imitar as superfícies lipídicas dos glóbulos vermelhos e plaquetas. Os autores constataram que a camada citoplasmática interna das membranas dessas células apresenta alta atividade pró-coagulante (trombogênica) causada principalmente pela presença de fosfolipídios que contêm o grupo fosforilserina (OS), enquanto que a camada externa não indicou resultado positivo para os testes realizados (tromborresistente). Assim, tenta-se mimetizar a camada externa dos eritrócitos e plaquetas, que possuem uma grande quantidade de fosfolipídeos neutros (contendo os grupos polares esfingomielina, fosforilcolina e fosforiletanolamina), a fim de se obter um material hemocompatível. Na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp foi realizado um estudo específico sobre revestimento do PVC com fosfatidilcolinas, demonstrando que o PVC pode ser revestido com fosfolipídios e apresenta aumento do tempo de coagulação com uma grande dependência do método empregado na deposição do filme sobre a superfície do PVC (MARRECO, 1999 e ALVES, 1999).

A pesquisa aborda o revestimento de tubos PVC, utilizados em procedimentos de operações cardíacas, que utilizem circulação extracorpórea (CEC).Optou-se por revestir tubos de PVC por estes serem muito utilizados em várias aplicações na área médica e terem superfícies de contato direto com o sangue.

A incorporação de substâncias biologicamente ativas em toda a estrutura do material pode causar alterações nas propriedades físicas e inativar as substâncias, além de, na maioria dos casos, aumentar demasiadamente o custo do material. Como alternativa a esses problemas, pode-se revestir somente as superfícies que terão contato direto com o sangue.

A descoberta da capacidade da heparina de prevenir a formação de coágulos e de ser neutralizada pela protamina foi um fator fundamental para a realização de procedimentos de CEC. A heparina é um cofator catalítico que acelera acentuadamente a ação da antitrombina III na

inativação de várias proteases séricas do sistema de coagulação sangüíneo (SOUZA e ELIAS, 1995).

A obtenção e caracterização de revestimentos não-trombogênicos abrem um caminho ainda pouco explorado pelos pesquisadores nacionais da área.

O desenvolvimento de uma superfície sintética não trombogênica seria revolucionária; tornaria possível a substituição de válvulas cardíacas do próprio coração, veias e artérias, sem os riscos de trombo-embolismo ou de hemorragias produzidas por anticoagulantes. As hemorragias associadas à circulação extracorpórea de qualquer duração não existiriam e estaria aberto o caminho para a construção de órgãos artificiais implantáveis. A célula endotelial é a única superfície não trombogênica conhecida. Tal atributo é conseqüência de processos metabólicos especiais, impossíveis de serem reproduzidos por qualquer material inerte (EDMUNDS, 1985).

Uma nova tendência para reduzir a trombogenicidade nas superfícies dos biomateriais é o tratamento ou revestimento com plasma de baixa energia (*Glow Discharge)*. Este método trata ou reveste superfícies utilizando-se gases ou uma mistura desses altamente ionizados (plasma), incrementando assim a hemocompatibilidade do biomaterial por meio das mudanças da tensão superficial, grupos funcionais superficiais e outras propriedades das superfícies (KLAGES, 1999).

1.2 Objetivo Geral do Trabalho

Levando em conta a importância crescente de obter superfícies não-trombogênicas, o presente trabalho tem por objetivo geral contribuir no desenvolvimento de revestimentos em polímeros biomédicos, especificamente o PVC, estudando a obtenção e caracterização de revestimentos a base de heparina e com revestimentos por plasma em tubos usados na circulaçaõ extracorpórea. Os pontos fundamentais dentro do objetivo geral são:

- ⇨ Produzir revestimentos não-trombogênicos, homogêneos e atóxicos para serem aplicados em tubos de PVC utilizados na Circulação Extracorpórea do sangue (CEC).
- ⇨ Analisar e caracterizar os revestimentos nos substratos de PVC revestidos com Heparina-Cloreto de Benzalcônio, tubos de PVC revestidos por plasma e tubos não revestidos.
- ⇨ Estudar a hemocompatibilidade dos revestimentos nos substratos de PVC, verificando a interferência desses recobrimentos nas reações e processos envolvidos com a coagulação.

CAPÍTULO 2

Revisão de Literatura

2.1. Introdução aos Biomateriais. Definição e Aplicações

A grande maioria dos termos científicos tem sua origem na língua inglesa e o mesmo ocorre com os biomateriais. O termo *Biomaterials* é usado para definir um material sintético utilizado para substituir partes de um sistema vivo ou estar em contacto íntimo com um tecido biológico vivo.

No Brasil, em princípio, o termo mais adequado e aceito para traduzir *biomaterials* é Biomateriais; o termo leva a uma abrangência muito ampla de materiais, sendo utilizado dentro dos padrões técnico-científicos.

Muitos profissionais durante anos definem ou modificam o conceito de biomateriais, dependendo dos resultados das pesquisas e dos novos biomateriais que surgem a cada dia. Por isso é que a definição de biomateriais é um pouco complexa e vem sofrendo mudanças em função do avanço das pesquisas na área.

A definição adotada em 1982 na NIH *Consensus Development Conference* define biomaterial como: "qualquer substância ou combinação de substâncias, que não drogas, de natureza sintética ou natural, que podem ser usadas por qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema, para aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo".

A definição adotada na *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, mais simplificada, define biomaterial como: "todo material não vivo, usado em dispositivo médico ou biomédico, objetivando interação com o sistema biológico" (WILLIANS, 1987).

Outra definição de biomaterial dada pela junta Consultiva de Biomateriais da Universidade de Clemson- Estados Unidos define Biomaterial como: "uma substância sistematicamente e farmacologicamente inerte desenhada para ser implantada, dentro ou incorporada a um sistema vivo" (PARK et. al., 1992).

O conceito de biocompatibilidade se resume na habilidade de um material para induzir no hospedeiro uma resposta adequada a uma aplicação específica (WILLIANS, 1987). A biocompatibilidade inclui também outros fenômenos biológicos, tais como a resposta imunológica, carcinogenicidade e trombogenicidade (VERT et al., 1992).

A utilização dos biomateriais se tornou efetiva após o conhecimento de técnicas cirúrgicas assépticas, desenvolvidas por Lister nos anos 1860 (PARK et al., 1992). Em procedimentos cirúrgicos mais adiantados, os biomateriais geralmente eram mal sucedidos em conseqüência da infecção. A infecção tende a ser agravada na presença dos biomateriais, desde que o implante possa fornecer uma região inacessível às células competentes do sistema imunológico do corpo.

Outras definições de termos referentes a Biomateriais que serão mencionadas durante o trabalho foram traduzidas de "Definições em Biomateriais" da Conferência de Consenso da Sociedade Européia de Biomateriais, Chester, Inglaterra, 03 a 05 de março de 1986. Os termos a serem definidos são:

- Material Bioativo *(Bioactive Material)*: Um material que foi desenvolvido para induzir uma atividade biológica específica.
- Bioadesão *(Bioadhesion)*: Adesão de células e/ou tecido à superfície de um material.
- Biofixação *(Bioattachment)*: A fixação de células e/ou tecido à superfície de um material, incluindo acoplamento mecânico.

- Biocompatibilidade *(Biocompatibility):* A capacidade de um material de funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica.
- Dispositivo Médico *(Medical Device):* Um instrumento, aparelho, implemento, máquina, dispositivo, reagente *"in vitro"*, ou outro artigo similar ou relacionado, incluindo qualquer componente, parte ou acessório, que é planejado para uso no diagnóstico de doença ou outras condições, ou na cura, alívio, tratamento ou prevenção de doença humana.
- Trombogenicidade *(Thrombogenicity):* A propriedade de um material que induz e/ou promove a formação de um trombo (*).
- Enxerto *(Graft):* Um pedaço de tecido viável ou coleção de células viáveis transferidas de um sítio (local) doador para um sítio (local) receptor com propósito de reconstrução deste último local.
- Dispositivo Percutâneo *(Percutaneous Device):* Um dispositivo médico que passa através da pele, permanecendo naquela posição por um período significante de tempo.
- Trombogenicidade *(Thrombogenicity)* (*):

  Trombogenicidade Inerente *(Inherent Thrombogenicity):* Trombogenicidade da superfície de um material, controlada por reação.

  Trombogenicidade Geral *(General Thrombogenicity):* Trombogenicidade de um sistema sangue-material.
- Não-Trombogenicidade *(Non-Thrombogenicity):* A característica de um material que leva a uma trombogenicidade mínima.

Nota: (*)- Definições Provisórias

2.1.1.Polímeros Biomédicos

Hoje em dia um dos grandes desafios da ciência dedicada ao estudo de materiais é desenvolver novas gerações de biomateriais para uso médico. A indústria de polímeros sintéticos teve uma grande expansão nos últimos anos e diversos polímeros com diferentes propriedades já

se encontram disponíveis. Alguns desses polímeros têm propriedades mecânicas semelhantes às dos tecidos naturais, o que propicia aplicações biomédicas, segundo HOBERTT (1993).

Os polímeros da área médica e cirúrgica são extensivamente utilizados em aplicações intra e extracorpóreas. Como exemplos de materiais intracorpóreos têm-se: suturas, adesivos, válvulas cardíacas, segmentos de uretra e segmentos gastrointestinais, pâncreas artificial para sistema de aplicação de insulina, lentes de contacto, entre outros. No caso de materiais extracorpóreos temos: cateteres, bolsas para armazenamento de sangue, seringas, tubos médicos flexíveis, tubos para bombas peristálticas, tubos para condução de sangue, tubos estomacais, componentes de transfusão sangüínea e de instalações de diálise, membrana de diálise e plasmaferese, instrumentos cirúrgicos, entre outros (VALENCIA, 1987 e DUMITRUI, 1993).

Para que um biomaterial polimérico seja utilizado como dispositivo na área médica, o requisito mais importante é sua biocompatibilidade, isto é, como já foi definido anteriormente, a habilidade de um material de continuar exercendo sua função por um período de tempo tão longo quanto for necessário. No caso de biomateriais expostos aos componentes sangüíneos, as maiores limitações dizem respeito à adesão e adsorção de proteínas e/ou células em sua superfície e à hemólise. A capacidade de um material exposto ao sangue não promover reações adversas entre sua superfície e os componentes sangüíneos, minimizando assim o acúmulo de células em sua superfície, que poderia comprometer sua função é chamada de hemocompatibilidade.

2.1.2. Poli(Cloreto de Vinila) – PVC.

O Poli(Cloreto de Vinila) (PVC) é um polímero termoplástico convencional sintetizado a partir do monômero cloreto de vinila. O PVC é o único material plástico que não é 100% originário do petróleo, contém em peso 57% de cloro (derivado do cloreto de sódio - sal de cozinha) e 43% de eteno (derivado do petróleo) (INSTITUTO DO PVC, 2001).

Observa-se que o PVC pode ser rígido ou flexível, opaco ou transparente, brilhante ou fosco, colorido ou não. Essas características são obtidas com a utilização de plastificantes,

estabilizantes, pigmentos, entre outros aditivos, usados na formulação do PVC. Após formulado, o PVC é utilizado na fabricação de uma série de produtos, tais como: Produtos médico-hospitalares: embalagens para medicamentos, bolsas de sangue (sendo o material de armazenamento do sangue que melhor atende as exigências do processo de refrigeração), tubos para transfusão e hemodiálise, artigos cirúrgicos, além de pisos de salas onde é indispensável o alto índice de higiene; janelas que oferecem excelente resistência às mudanças de clima e à passagem dos anos, mesmo em ambientes corrosivos (beira-mar); revestimentos de paredes e pisos que são decorativos, resistentes e laváveis; brinquedos e artigos infláveis como bolas, bóias, colchões e barcos; artigos escolares, pela facilidade de moldagem, variedade de aspectos (cor, brilho, transparência) e baixo custo; embalagens usadas para acondicionar alimentos, protegendo-os contra umidade e bactérias - essas embalagens são impermeáveis ao oxigênio e ao vapor, dispensando, assim, o uso de conservantes, preservando o aroma; tecidos espalmados decorativos e técnicos que são usados principalmente para móveis, vestuários, malas e bolsas; garrafas para água mineral; estruturas de computadores, assim como peças técnicas destinadas à indústria eletrônica; revestimento do interior de veículos, devido à sua facilidade de moldagem e de manutenção; tubos e conexões utilizados na canalização de água e esgotos, pois são resistentes e facilmente transportados e manipulados graças ao seu baixo peso; mangueiras, que são flexíveis, transparentes e coloridas; laminados utilizados para embelezar e melhorar painéis de madeira e metal - resistem bem ao tempo, aos raios UV, à corrosão e à abrasão; laminados impermeáveis, utilizados em piscinas, túneis, tetos, etc; frascos para acondicionar cosméticos e produtos domésticos por sua impermeabilidade e resistência a produtos químicos; móveis de jardim, que precisam ser resistentes às variações climáticas e devem ser de fácil manutenção.

2.1.3. Histórico do PVC de grau médico

Os diversos produtos e artigos médicos feitos à base do plástico PVC, apesar de sua grande utilidade e de estarem consagrados devido ao seu uso, passam quase despercebidos na rotina dos profissionais de saúde.

Desde os anos 1940 o PVC foi utilizado na área médica, introduzindo os materiais descartáveis e diminuindo as infecções em ambientes hospitalares. O vidro, o aço e outros materiais começam a dar lugar ao PVC na fabricação de seringas, recipientes para soro e sangue, equipos, entre outros. Já com início das cirurgias cardíacas, nos anos 1950, novas tecnologias foram desenvolvidas para atender as necessidades da medicina, mesma época em que o PVC foi introduzido em larga escala, com a chegada dos materiais descartáveis.

Na década de 60 surgiram os cateteres de termodiluição à base de PVC para monitoramento hemodinâmico, permitindo a obtenção de informações mais precisas de pacientes com problemas cardíacos ou em estado grave. Também nesta década são introduzidas as bolsas de sangue em PVC, que facilitam o acondicionamento durante a coleta, o processamento durante a centrifugação e aumentam a resistência a baixas temperaturas, evitando inconvenientes como microrrachaduras. No início da década de 1970, o FDA – *(Food and Drug Administration)*, rigorosa agência norte-americana de controle para alimentos e medicamentos, aprovou definitivamente a utilização de PVC na produção de recipientes para soluções intravenosas.

Na década de 1980 foram introduzidos os reservatórios de PVC de sangue venoso do sistema fechado de oxigenação artificial para o sistema de circulação extracorpórea, ainda hoje utilizado nos EUA e Europa, reduzindo as ocorrências de infecção nos centros cirúrgicos. Por último, dos anos 90 até hoje em dia, avançam os estudos para o desenvolvimento do "coração artificial total", em que o sistema de conexões e o revestimento das câmaras são fabricados em PVC em função de suas propriedades (INSTITUTO DO PVC, 2001).

2.1.4. Vantagens do PVC

Muitos instrumentos utilizados hoje em exames, cirurgias e recuperação de pacientes utilizam produtos à base de PVC: bolsas de sangue, tubos endotraqueais, bolsas de soro, cateteres cardiovasculares, tubos que saem do coração do paciente e levam o sangue até a máquina de

circulação extracorpórea, sondas e equipamentos de alimentação enteral, cânulas de perfusão e ponteiras para micropipetadores e equipos para soro.

A existência do PVC, associando alta tecnologia e baixo custo, proporcionou a criação de produtos descartáveis, encontrando uma solução definitiva para as infecções causadas pela reutilização de artigos médicos. E também permitiu a criação e desenvolvimento de órgãos artificiais, como próteses.

Por suas múltiplas aplicações, o PVC pode se adaptar às exigências específicas do uso a que se destina, como, por exemplo, às características de proteção a medicamentos delicados (impermeabilidade a odores e proteção contra oxidação, maleabilidade, entre outras). Por estas e outras vantagens do PVC, ele é considerado versátil, confiável, seguro, prático, resistente, leve e pode ser fabricado em todas as cores, o que facilita a identificação de produtos, sejam eles dutos, embalagens ou qualquer outro.

No mundo, o PVC tem crescido a taxas anuais de 3,8% nos últimos cinco anos, atingindo uma produção de 25 milhões de toneladas em 1998. Na Alemanha, país extremamente rigoroso em questões ambientais, o consumo de PVC cresceu 10% somente em 1998. No Brasil, o crescimento do mercado de PVC foi de 8,3% ao ano nos últimos cinco anos, e em 2001 foram consumidas aproximadamente 731 mil toneladas de PVC.

2.1.5. Propriedades Físico-Químicas do PVC

O poli(cloreto de vinila) (PVC), como mencionado anteriormente, é um polímero termoplástico convencional sintetizado a partir do monômero cloreto de vinila, como observa-se na figura 2.1.

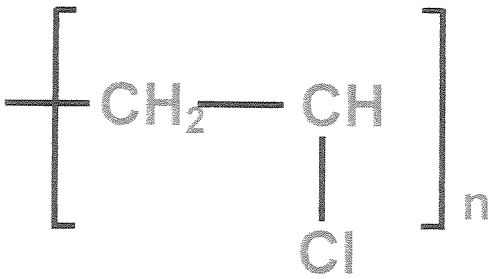


Figura 2.1 Estrutura do PVC obtida do monômero Cloreto de Vinila.

Monômero representa a matéria prima para formar um polímero, sendo moléculas simples bifuncionais, que em condições adequadas dão origem à unidade de repetição (mero) das muitas cadeias poliméricas que formam o polímero, em que, cada uma das cadeias poliméricas são macromoléculas formadas pela união de meros, ligados por covalência (AGNELLI, 2001).

Características do PVC:

- Peso molecular: 50 000 – 100 000 Dalton
- Densidade: 1,22 - 1,39 g/cm^3
- Índice de refração: 1,53 – 1,56
- T_m: 273 °C
- T_g: 81 °C
- Cristalinidade: 5-15 %
- Termoplástico, incolor, transparente

Outras propriedades que distinguem o PVC são: alta resistência à chama, formação de peças tanto rígidas quanto muito flexíveis, com adição de plastificantes também apresentam uma aparência parecida com o couro e são materiais baratos em comparação a outros que realizam uma função similar (MANO, 2000).

2.2.Circulação Extracorpórea do Sangue (CEC)

A circulação extracorpórea (CEC) compreende o conjunto de máquinas, aparelhos, circuitos e técnicas, mediante as quais se substituem, temporariamente, as funções do coração e dos pulmões. As funções de bombeamento do coração são desempenhadas por uma bomba mecânica e as funções dos pulmões são substituídas por um aparelho capaz de realizar as trocas gasosas com o sangue. Tubos de PVC unem os diversos componentes desse sistema entre si e ao paciente, constituindo a porção extracorpórea da circulação. A oxigenação do sangue, o seu bombeamento e circulação fazem-se externamente ao organismo do indivíduo (CONCEIÇÃO, 1973). A figura 2.2 apresenta um esquema geral do circuito da CEC, as linhas contínuas e pontilhadas seriam os diferentes calibres de tubos de PVC utilizados nesses procedimentos.

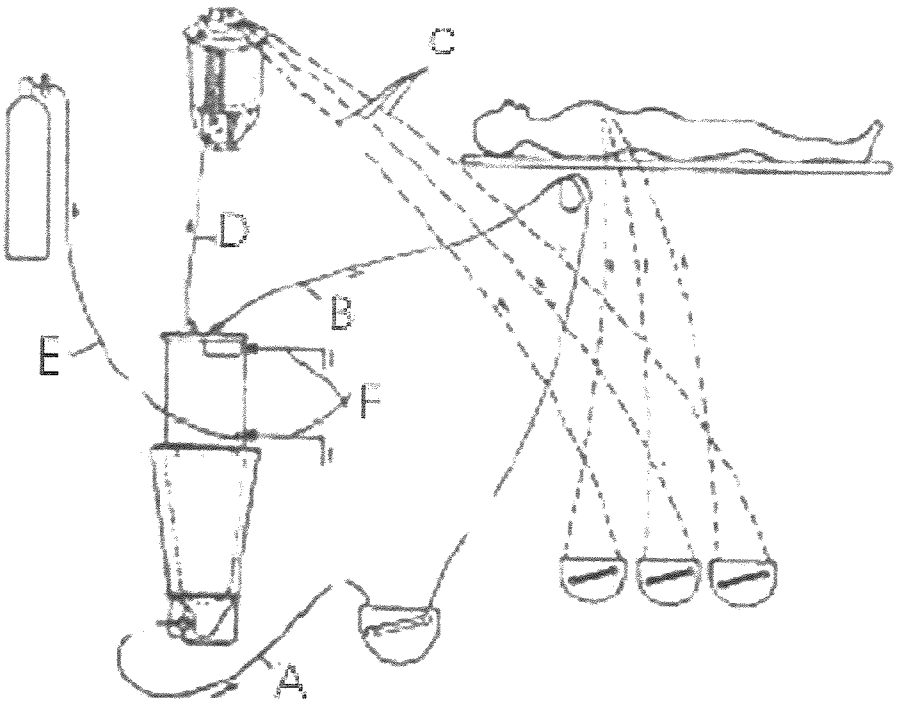


Figura 2.2 Esquema geral do circuito da Circulação Extracorpórea com oxigenador de bolhas. (A) linha arterial; (B) linha venosa; (C) linhas aspiradoras; (D) linha de cardiotomia; (E) linha de gás; (F) linhas de água do permutador de calor (Adaptado de Souza e Elias, 1995)

Na CEC, o sangue é desviado do coração e dos pulmões ao chegar ao átrio direito do paciente, através de cânulas colocadas nas veias cava superior e inferior. Daí, por uma linha comum, o sangue venoso é levado ao oxigenador, onde, através de um percurso por câmaras especiais, recebe oxigênio e elimina gás carbônico e, em seguida, é coletado para ser reinfundido ao paciente. Do oxigenador, e já arterializado, o sangue é bombeado para um ponto do sistema arterial do paciente, geralmente a aorta ascendente, de onde percorre o sistema arterial e é distribuído a todos os órgãos, cedendo oxigênio aos tecidos para a realização dos processos vitais e recolhendo o dióxido de carbono neles produzido. Após circular pelo sistema capilar dos tecidos, o sangue volta ao sistema das veias cava superior e inferior, onde é continuamente recolhido, para ser levado ao oxigenador. Na figura 2.3 apresenta-se uma representação esquemática da CEC.

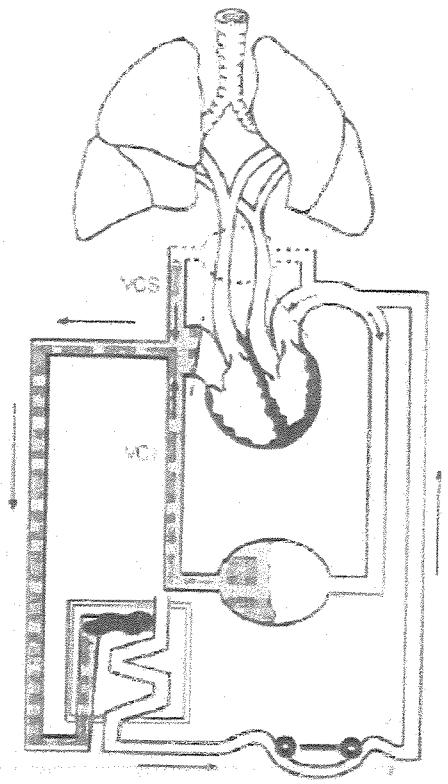


Figura 2.3 Representação esquemática da Circulação Extracorpórea: VCS - veia cava superior / VCI – veia cava inferior (Adaptado de Souza e Elias, 1995).

Esse processo é mantido pelo tempo necessário à correção da lesão cardíaca e dele depende a preservação da integridade morfológica e funcional de todos os órgãos do paciente (SOUZA e ELIAS, 1995).

2.2.1. Fisiologia do sangue

O sangue é classificado como tecido; este contém uma fase sólida, que compreende os elementos celulares (glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas), e uma fase líquida complexa, chamada plasma, constituída por água, sais minerais, vitaminas, proteínas, glicídios e lipídios. O sangue circula na forma líquida pelo sistema circulatório entre os diversos órgãos, transportando nutrientes, hormônios, eletrólitos, água, resíduos do metabolismo celular e diversas outras substâncias. Quando fora do organismo, passa fisiologicamente do estado líquido para o estado de gel, com a formação do coágulo. Este libera uma parte líquida chamada soro. O soro difere do plasma porque não contém os fatores da coagulação consumidos na formação do coágulo como o fibrinogênio, porém possui alguns fatores ativados durante o mecanismo da gelificação, como o fator VII (VERRASTO, 1996).

2.2.2 Hemostasia e Coagulação

Normalmente o sangue flui no organismo em contato com o endotélio vascular. A fluidez do sangue depende, além da integridade do endotélio, da velocidade do fluxo sanguíneo, do número de células sanguíneas circulantes e, possivelmente, da presença de heparina como anticoagulante natural, produzido pelos mastócitos.

Quando o sangue sai do interior dos vasos, perde a fluidez, torna-se viscoso e em pouco tempo forma um coágulo que, posteriormente se retrái, organizando-se ou dissolvendo-se. Este é o fenômeno normal da hemostasia, que consiste de um conjunto de fenômenos que visam interromper a perda continuada de sangue. Existem três mecanismos principais, que se destinam a interromper a perda de sangue através de um vaso lesado, e que constituem os alicerces da hemostasia. Esses mecanismos são: resposta vascular, atividade plaquetária e coagulação do sangue.

2.2.3 Sistema de Coagulação

A heparina exerce o seu efeito anticoagulante, bloqueando a fase final da cascata da coagulação do sangue. O fator Hageman ativado, contudo, excita as fases iniciais da cascata da coagulação e, embora não se formem coágulos, alguns fatores são consumidos e seu teor no sangue se reduz. O fibrinogênio pode ser ativado, a partir do fibrinopeptídeo A. Em conseqüência, podem se formar monômeros da fibrina e a trombina pode penetrar na microcirculação, contribuindo para a produção da reação inflamatória. Outras anormalidades do sistema de coagulação podem ser produzidas pela hemodiluição dos fatores de coagulação, pela sua desnaturação e pela adsorção do fibrinogênio nas superfícies internas do circuito.

A hemodiluição reduz todos os fatores da coagulação; o uso prolongado de um oxigenador de bolhas e dos aspiradores contribui para aumentar as alterações de determinados fatores de coagulação; a adsorção de fibrinogênio e outras proteínas na superfície interna dos tubos, e a deposição de plaquetas nessa camada de revestimento protéico contribuem na geração de distúrbios na coagulação. Dependendo da temperatura, certos processos enzimáticos podem determinar a ativação seqüencial de alguns fatores da coagulação. A formação da fibrina também se altera com variações da temperatura.

2.2.4 Coagulação e Trombogênese

Agressões que produzam alteração ou perda das células endoteliais levam a dois fenômenos simultâneos: a ativação de plaquetas e a da coagulação, que são sinérgicos na formação do trombo. A célula endotelial lesada perde a capacidade de produzir os fatores que impedem a adesão de plaquetas, como o óxido nítrico ou *"endothelial derived relaxing factor"* (ENDO ou EDRF) e a prostaciclina (PGI3), além de permitir a exposição de estruturas subendoteliais, especialmente o colágeno. Com a exposição de estruturas subendoteliais, as plaquetas ligam-se ao colágeno por meio de sítios específicos, o complexo formado pelas glicoproteínas Ib e IX (GP IbIX), que também se liga ao fator plasmático, o fator de von Willebrand, formando uma ponte entre as plaquetas e o

subendotélio. Outros agentes agregantes plaquetários atuam por meio de receptores específicos: trombina, o principal ativador em condições fisiológicas, adenosina difosfato (ADP), tromboxane A2, serotonina, prostaglandinas. Essa interação com receptores da superfície plaquetária aciona os gatilhos para sua ativação, por meio de sinal transmitido para o interior da célula. O sinal gerado pela interação entre o ligante e o receptor faz a mediação da transformação de compostos altamente fosforilados em mensageiros intracitoplasmáticos (BENNET, 1992).

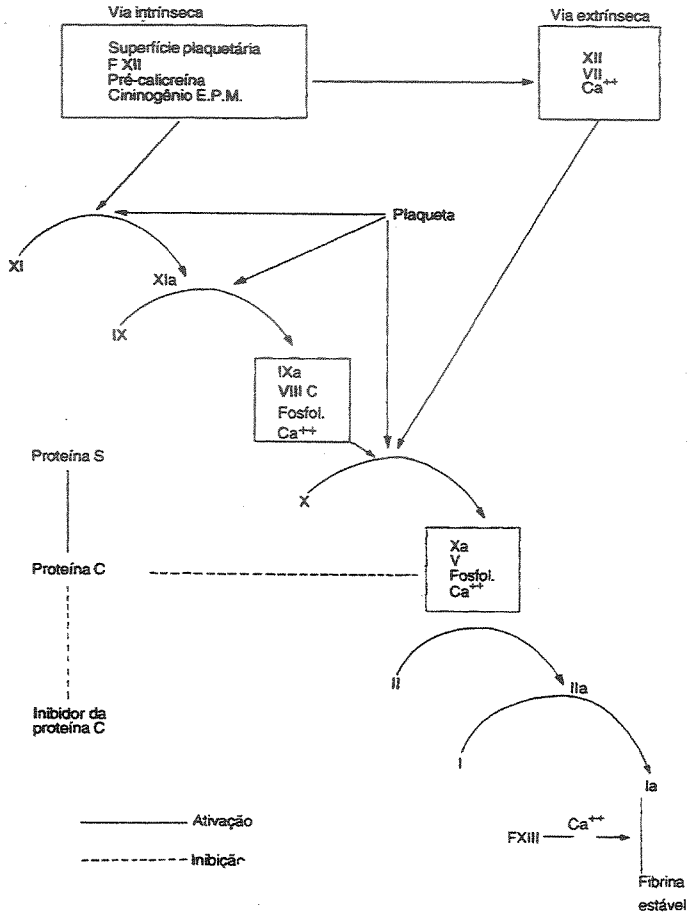
A ativação dos fatores da coagulação acontece simultaneamente à ativação das plaquetas, que, junto com as células endoteliais (CE), fornecem uma superfície catalítica onde se desenrolam as reações enzimáticas, que culminam com a geração de trombina e a formação de fibrina, principal constituinte do trombo. Esquematicamente, a cascata da coagulação pode ser dividida em três vias: a intrínseca, a extrínseca e a comum. Pela via intrínseca começam as reações iniciadas pela interação do colágeno e do fator XII, que leva à ativação seqüencial do fator XI e do fator IX. A via extrínseca ocorre pelo fator tecidual, que ativa o fator VII. Essas duas vias chegam ao ponto comum, que é a ativação do fator X. Por muito tempo considerou-se que a ativação da chamada via intrínseca fosse a principal via de ativação da coagulação. Entretanto, evidências bioquímicas e clínicas demonstram que o mais importante em condições fisiológicas é o fator tecidual, iniciador da chamada via extrínseca. Dessa forma, a divisão entre essas duas vias não é mais adequada, sendo útil apenas na interpretação dos testes de avaliação da hemostasia, onde as reações ocorrem "in vitro" (RAPAPORT e RAO, 1995). Vários estímulos levam a célula endotelial a expressar o fator tecidual (FT) em sua superfície. Ele então forma um complexo com o fator VII, e esse complexo pode ativar tanto o fator X como o fator IX. Os fatores IX, X, VII e II são proteínas cuja síntese hepática é dependente da vitamina K, e por isso contêm resíduos de ácido glutâmico gama carboxilados, responsáveis por sua ligação a fosfolipídios de membrana pelos íons cálcio. Essa ligação ocorre a fosfolipídios expostos na membrana da plaqueta somente após sua ativação. Esse fenômeno favorece a ocorrência da formação de trombina no local exato onde acontece a lesão e a formação do trombo. O fator IX forma um complexo com o fator VIII e fosfolipídios, denominado complexo Tenase, que ativa então o fator X. O fator VIII não tem propriedades proteolíticas, mas acelera a ação do fator IXa sobre o fator X. O fator Xa forma complexo com o fator V, também sem atividade proteolítica, e

íons cálcio, além do fosfolipídio da membrana plaquetária, formando o chamado complexo protrombinase. Este vai clivar a molécula da protrombina ou fator II, produzindo dois resíduos: um fragmento amino-terminal denominado fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), que contém resíduos carboxiglutâmicos, e outro fragmento carboxiterminal, que contém o sítio ativo e denominado protrombina 2. Este último fragmento sofre ainda uma clivagem pelo Xa e transforma-se na trombina propriamente dita. A trombina formada faz um "feed-back" positivo, ativando os cofatores V e VIII por meio de proteólise limitada, transformando-os em fatores Va e VIIIa, com maior poder catalítico que as formas inativas (DAVIE, 1995).

O substrato da trombina é o fibrinogênio, uma molécula dimérica composta por três pares de cadeias peptídicas: alfa, beta e gama. A trombina quebra inicialmente a ligação arginina-glicina na porção aminoterminal de cada cadeia alfa, liberando um pequeno peptídio chamado fibrinopeptídio A (FpA). Logo em seguida, a trombina cliva ambas as cadeias beta da mesma forma, liberando dois pequenos fibrinopeptídios B. A retirada desses pequenos fragmentos da molécula de fibrinogênio expõe partes da molécula que reagem de modo complementar com o outro monômero de fibrina, estabelecendo ligações hidrofóbicas, de modo que esses monômeros polimerizam-se. Inicialmente são ainda solúveis, mas quando se tornam muito grandes, acabam por precipitar, e esse gel de fibrina constitui o esqueleto do trombo em formação (NIEUWENHUISEN, 1995).

O F1+2 e o FpA são estáveis no plasma e podem ser medidos imunologicamente: o primeiro reflete a ação do fator Xa sobre a protrombina; e o segundo, da trombina sobre o fibrinogênio, sendo usados como marcadores moleculares da ativação da coagulação "in vivo", especialmente na caracterização de estados pré-trombóticos. O fibrinogênio tem papel central na formação do trombo, pois, além de ser seu principal constituinte, promove a aproximação das plaquetas ao se ligar à GP IIb/IIIa das plaquetas ativadas, incorporando-as ao trombo. Além disso, é o fator da coagulação presente em maior concentração no plasma (2 g/l a 4 g/l), sendo um dos principais fatores determinantes da viscosidade sanguínea, junto ao hematócrito. O fibrinogênio comporta-se como uma proteína de fase aguda e sua síntese hepática estão aumentadas em várias

situações clínicas, estimulada pela interleucina 6 e pelo fator de necrose tumoral. A hiperfibrinogenemia é importante fator de risco para trombose arterial e venosa (KOENIG, 1995).



FATOR	NOMENCLATURA
I	Fibrinogênio
II	Protrombina
III	Tromboplastina
IV	Cálcio
V	Fator Lábil
VII	Fator Estável
VIII C	Fator anti-hemofílico A
VIII vW	Fator von Willebrand
IX	Fator anti-hemofílico B
X	Fator Stuart-Prower
XI	Fator anti-hemofílico C
XII	Fator de contato
XIII	Fator estabilizador da fibrina
Precalicreína	Fator Fletcher
Cininogênio	Fator Fitzgerald-Williams
Proteína C	-
Proteína S	-

Figura 2.4 Esquema da cascata de coagulação (Adaptado de VERRASTRO et al., 1996)

É na polimerização dos monômeros de fibrina que participa o último fator de coagulação da cascata, o fator XIII. É o precursor da transglutaminase, que promove ligações covalentes entre os monômeros da fibrina polimerizada e precipitada no plasma. Promove a ligação de resíduos lisina de um monômero à glutamina de outro, fazendo o chamado "cross linking", que torna o trombo estável e menos sensível à ação da plasmina. O fator XIII circula no plasma como um zimogênio e é ativado pela trombina(DAVIE, 1995). A figura 2.4 mostra um esquema simplificado do sistema de coagulação sanguínea.

Cabe lembrar que a trombina é um importante agente agregante plaquetário e que sua formação contribui para a ativação de plaquetas que se adicionam ao trombo em formação. Quando as plaquetas são ativadas, a protrombina é trazida para a proximidade do complexo Va-Xa na superfície plaquetária, de modo que quantidades significantes de trombina são formadas, o que pode gradualmente ultrapassar os mecanismos naturais de proteção anticoagulante.

2.3.2. Anticoagulação

É essencial que a coagulação do sangue seja inibida para impedir a formação de trombos durante os procedimentos com circulação extracorpórea (CEC). O sangue permanece na forma líquida, enquanto estiver em contato com as superfícies internas do coração (endocárdio) e dos vasos sanguíneos (endotélio), graças a um equilíbrio físico-químico complexo, onde se anulam forças que, por um lado favorecem a coagulação e forças que, por outro lado, favorecem a anticoagulação. Quando, em contato com qualquer outro tipo de superfície, biológica ou de outra natureza, aquele equilíbrio se altera, o sangue tende a coagular. Durante a CEC, o sangue circula através de aparelhos e tubos, em cuja construção são utilizados diversos materiais que, apesar de relativamente biocompatíveis, são, na realidade, superfícies estranhas, que estimulam processos de coagulação.

Quando o sangue entra em contato com qualquer superfície não revestida pelo endotélio, ocorre um conjunto de alterações que resultam na conversão de uma proteína, o fibrinogênio, em um complexo de proteínas insolúveis, a fibrina, que é a matriz do coágulo, etapa final dos fenômenos da coagulação.

Para se inibir a coagulação do sangue, nos procedimentos com CEC, usa-se uma substância anticoagulante, a heparina. A heparina é a droga escolhida para essa finalidade porque é específica, tem poucos efeitos colaterais, é bem tolerada pelo organismo, pode ser usada, sem inconvenientes, por longos períodos e possui um antídoto específico disponível. Ao final da perfusão, neutraliza-se o efeito anticoagulante da heparina, com uma outra substância, o antídoto

específico, a protamina. Estas duas substâncias são usadas em todos os procedimentos de CEC e devem ser administradas com precisão e cautela; o efeito de ambas é indispensável; e a segunda, a protamina, pode desencadear reações colaterais importantes no organismo.

2.2.1. Heparina

A Heparina foi descoberta acidentalmente, em 1916, por um estudante de medicina, Jay McLean, que na época investigava extratos de tecidos do coração e do fígado, buscando substâncias tromboplásticas, diferentes da cefalina, existentes nos extratos de cérebro. Naquelas investigações foi encontrado um extrato de tecido hepático capaz de retardar a coagulação do plasma. A substância responsável por aquele efeito foi denominada hepar-fosfatide, em virtude de ter sido encontrada no fígado, e posteriormente batizada como heparina pela mesma razão (MCLEAN, 1959).

A purificação da heparina foi efetuada em 1920 e uma preparação rudimentar de heparina foi utilizada pela primeira vez como anticoagulante de sangue para transfusão em 1924. Reações pirogênicas ocorreram e somente 12 anos após foram obtidas preparações de heparina seguras para admistração intravenosa. Durante este intervalo, descobriu-se que a heparina podia ser obtida de forma mais econômica de pulmões bovinos do que fígados bovinos. Em 1935 foram iniciadas avaliações clínicas em problemas trombóticos evidenciando que a heparina poderia prevenir a formação de coágulos, embora possuísse mínima habilidade para dissolver coágulos já existentes. Em 1937, Chargaff e Olson descobriram que um peptídeo, a protamina, neutralizava os efeitos anticoagulantes da heparina.Gibbson, em 1939, apresentou seu primeiro trabalho experimental, testando a viabilidade da circulação extracorpórea, em que usava a heparina como anticoagulante. Na primeira operação em seres humanos, a heparina e a protamina foram utilizadas para o manuseio da coagulação.

Sob o ponto de vista químico, a heparina é um mucopolissacarídeo sulfatado com grande quantidade de cargas elétricas negativas; constitui-se no ácido macromolecular mais forte

existente no organismo. Pode ser distinguida de outros polissacarídeos pela sua extrema acidez, decorrente da grande quantidade de radicais sulfatados na sua molécula.

A heparina está presente nos pulmões, no fígado e, principalmente, nos mastócitos do sistema retículo-endotelial. A heparina para uso clínico é extraída do pulmão de bovinos ou da mucosa intestinal de porcinos. Algumas propriedades, bem como o grau de pureza da heparina, varia com o tecido do qual ela é extraída e com o método de extração e preparo, mais do que com a espécie animal usada para a extração. A heparina extraída da mucosa intestinal tem um peso molecular mais baixo e seu método de preparo é mais barato que a heparina extraída dos pulmões.

Em virtude das variações das seqüências e do comprimento das cadeias e do comprimento das cadeias de hidratos de carbono nos mucopolissacarídeos, a heparina não é uma substância pura, única, e sim uma mistura de diversas substâncias afins com pesos moleculares que variam de 3000 a 40000 Dalton. A atividade anticoagulante da heparina se deve às moléculas de maior peso molecular; as moléculas menores não têm efeito anticoagulante.

Existem algumas diferenças entre a heparina extraída da mucosa intestinal porcina e a heparina extraída do pulmão bovino. A heparina da mucosa intestinal porcina é mais barata, sua molécula tem o peso molecular na faixa entre 3000 e 25000 Dalton, é menos efetiva na inibição da trombina, produz mais sangramento pós-operatório e é neutralizada por doses menores de protamina.

A heparina do pulmão bovino é mais cara, tem o peso molecular na faixa entre 5000 e 40000 Dalton, é mais eficaz inibidor da trombina e tem um risco pouco mais elevado de produzir trombocitopenia tardia. Como resultado dessa variabilidade, cada preparação comercial da heparina representa, na realidade, um conjunto de substâncias e sua potência pode variar entre os diferentes lotes produzidos por um mesmo fabricante. A heparina extraída do pulmão bovino, com maior grau de pureza e maior proporção de macro-moléculas, é a mais recomendada para uso na circulação extracorpórea.

As heparinas extraídas da mucosa intestinal ou do pulmão apresentam características e propriedades químicas farmacocinéticas e farmacodinâmicas semelhantes; ambas provêm anticoagulação e prevenção de trombose, embora alguns estudos demonstrem que o uso da heparina da mucosa intestinal pode gerar um sangramento maior no pós-operatório.

As funções da heparina normalmente existentes no organismo ainda não estão bem esclarecidas; acredita-se que ela não seja responsável pela manutenção da fluidez do sangue circulante, supondo-se que a inibição da trombina na circulação seja desempenhada por uma outra substância assemelhada, com menor quantidade de radicais sulfurados, chamada heparan. Admite-se que a heparina do organismo funcionaria nos mecanismos de defesa imunológica contra infecções bacterianas, como auxiliar na geração de neocapilares e no metabolismo dos lipídeos (KAKKAR e THOMAS, 1976).

2.3.2.2. Características Químicas da Heparina

A heparina, mais especificamente descrita como um "glicosaminoglicam", é um polissacarídeo que reside quase exclusivamente em células "mast". Claramente, a heparina endógena não tem papel significativamente importante na manutenção da fluidez da circulação sangüínea.

O peso molecular da heparina da mucosa intestinal porcina, como mencionado anteriormente, encontra-se na faixa de 3000 a 25 000 Dalton, como é representado na figura 2.5, tendo como constituintes: Glucosamina - 6 – sulfato; ácido glucurônico – 2 sulfato; e ácido idurônico.

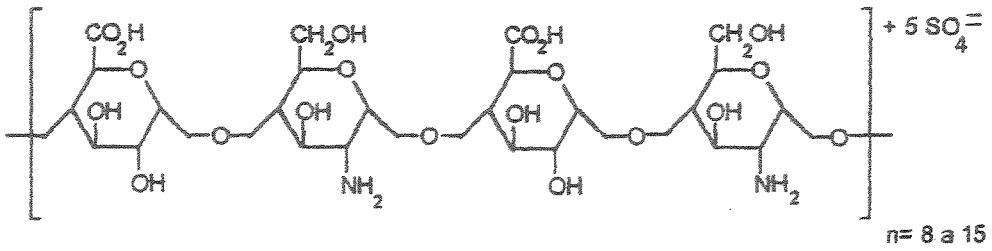


Figura 2.5 Estrutura da Heparina

A heparina pode ser distinguida de outros polissacarídeos pela sua natureza fortemente ácida, devido aos grupos ácidos carboxílico e sulfato. Sulfamidas e ésteres sulfatados se formam nas posições 2 e 6, respectivamente, da glucosamina e um éster sulfatado também é encontrado no grupo 2- OH do ácido idurônico. Ela é o ácido macromolecular mais forte do corpo humano, uma característica que deriva da sulfatação abundante de suas unidades sacarídeas.

2.3.2.3. Mecanismo de Ação da Heparina

A formação do coágulo de fibrina é iniciada por estímulos de diversas naturezas, que culminam na ativação seqüencial de um conjunto de treze fatores protéicos do plasma, os fatores da coagulação, que podem ainda ser acelerados ou inibidos em suas ações, por outras substâncias ou co-fatores. Os mecanismos da cascata da coagulação são múltiplos, intimamente relacionados e de grande complexidade, havendo a atuação simultânea dos diversos fatores e co-fatores em cada uma das fases do fenômeno.

A heparina administrada a um indivíduo interfere nas etapas finais da cascata da coagulação, isto é na conversão da protrombina (fator II) em trombina que, por sua vez, promove a conversão do fibrinogênio (fator I) em fibrina, originando o coágulo. A heparina impede a

transformação da protrombina em trombina; dessa forma, a conversão do fibrinogênio em fibrina não ocorre, conforme representado na Figura 2.6.

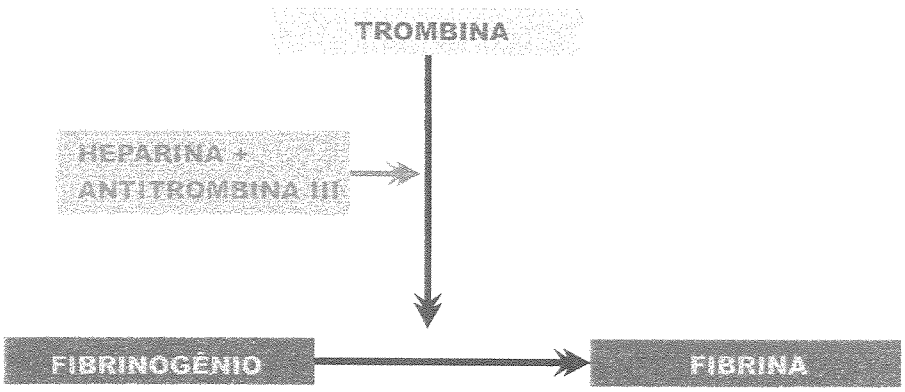


Figura 2.6 Mecanismo de ação da Heparina

A trombina (fator II ativado), por ação enzimática, converte o fibrinogênio em fibrina, além de ativar os co-fatores V e VIII, o que acentua a velocidade da formação do coágulo de fibrina através das vias intrínseca e comum da coagulação. A ação enzimática da trombina é impedida por uma glicoproteina do plasma, a antitrombina III. A heparina se une à antitrombina III, tornando a sua molécula muito mais ativa em relação à inibição da trombina, o que impede a conversão do fibrinogênio. A heparina aumenta a potência inibitória da antitrombina III em cerca de 1000 vezes. A antitrombina III é também um inibidor dos produtos ativados dos fatores IX, X, XI e XII e, por estes mecanismos, a heparina também impede a ação daqueles fatores, nos mecanismos da coagulação. As moléculas de maior peso molecular da heparina inibem a trombina mais efetivamente que as moléculas menores. A heparina também se liga à protrombina (fator II) inativando-a, por um mecanismo independente da ação da antitrombina III.

Apesar da grande eficiência da heparina em impedir a coagulação do sangue, cerca de dois terços das moléculas de heparina presentes em qualquer preparação comercial não têm efeito anticoagulante.

O padrão mais usado para quantificar a heparina é o da farmacopéia internacional (Unidades Internacionais). Na prática, considera-se que 1 miligrama da solução de heparina corresponde à atividade de 100 U.I..

O efeito anticoagulante da heparina é monitorado através de teste de coagulação, como: tempo de coagulação (TC), tempo de coagulação ativado (TCA) ou o tempo parcial de tromboplastina (TPT). A anticoagulação eficaz corresponde ao tempo de coagulação 2 a 3 vezes o valor normal.

2.3.2.4. Cloreto de Benzalcônio

O Cloreto de Benzalcônio é um composto de amônio quaternário catiônico.Os compostos de amônio quaternário são agentes de superfície, usados como umectantes, detergentes, emulsificadores e germicidas.

- Umectante: substância capaz de umedecer uma superfície, ao se diluir.
- Detergente: substância capaz de limpar ou purificar uma superfície. Podem ser iônicos ou não e caracterizam-se por um equilíbrio hidrofóbico/hidrófilo.
- Emulsificador: substância capaz de diminuir a tensão superficial entre duas fases líquidas de uma emulsão, tornando-a estável.
- Germicida: agente que destrói microrganismos. Pode ser: bactericida, fungicida, virucida e amebicida.

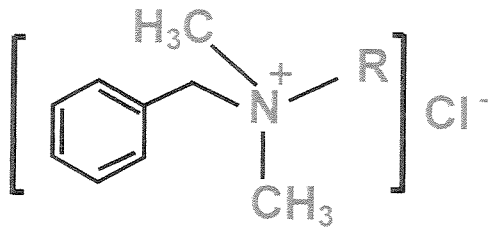
Os agentes de superfície são aqueles cujos efeitos esperados limitam-se ao local de aplicação. Os compostos de amônio quaternário são usados como germicidas por sua capacidade de destruir microrganismos e desnaturar proteínas. Os agentes de superfície podem ser aniônicos ou catiônicos. Os agentes aniônicos são antagonistas dos catiônicos, ou seja, neutralizam os seus efeitos. Sabões e outros agentes aniônicos (constituintes tissulares e pus) podem reduzir ou

neutralizar o efeito de germicidas catiônicos. O etanol (álcool) intensifica o efeito germicida dos compostos de amônio quaternário, por isso as tinturas são mais eficazes que as soluções aquosas.

O cloreto de benzalcônio é um líquido combustível, com ponto de fulgor igual a 40.5° C, podendo formar misturas explosivas com o ar. Os vapores são mais pesados que o ar. Não há limite de tolerância à exposição ocupacional, pela NR-15 ou pela ACGIH. Aparece na composição de diversos produtos de uso doméstico, industrial e em medicamentos, por exemplo:

- Conservante, em soluções de cloreto de sódio, em fluidificantes nasais (0.1 mg de cloreto de benzalcônio / 9 mg de cloreto de sódio) ("RINOSORO");
- Anti-séptico, em compressas de "curativos" ("BAND-AID");
- Anti-séptico, em colutórios ("COLUBIAZOL");
- Desodorantes de uso pessoal;
- Desinfetantes domésticos.

A estrutura geral do cloreto de Benzalcônio mostra-se na figura 2.7.



(R = C8H17 a C18H37)

Figura 2.7 Estrutura geral do Cloreto de Benzalcônio (Adaptado Thomas e Kakkar, 1976).

Nos anos 60, quando se começou a realizar revestimentos com heparina, o cloreto de benzalcônio era utilizado para ligar heparina eletrostaticamente através dos grupos aniônicos do cloreto de benzalcônio, que seria absorvida por uma base previamente grafitada na superfície do polímero (PARK e LAKES, 1992).

2.3.3. Resposta do Organismo Humano à Circulação Extracorpórea

Uma das reações mais importantes do organismo, desencadeadas pela circulação extracorpórea, é a resposta inflamatória sistêmica ou generalizada que, em linhas gerais, corresponde ao antigo conceito de "síndrome pósperfusão". Muitos autores têm estudado o assunto em profundidade. Logo após o início da perfusão, quando o sangue entra em contato com as superfícies estranhas do circuito e dos oxigenadores, ocorre um processo de ativação de determinados sistemas de proteínas do plasma, que tem relação com o tempo de duração do procedimento. Esses sistemas são parte de um sistema humoral mais amplo, o chamado sistema humoral amplificado, que reage aos estímulos locais, perpetua a sua reação e exacerba a resposta do organismo.A ação das diversas proteínas ativadas desencadeia no organismo uma resposta inflamatória, caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, formação de edema, leucocitose, febre, vasoconstrição periférica, hemólise e maior suscetibilidade às infecções, disfunção pulmonar e renal. Alguns dos elementos da síndrome pós-perfusão, como os distúrbios hemorrágicos e a insuficiência renal, podem ser aparentes logo ao final da perfusão, enquanto outros podem ser manifestos apenas no pós-operatório imediato.

A maioria dos pacientes submetidos à circulação extracorpórea apresenta pequenas evidências da resposta inflamatória generalizada, produzida pela ativação dos sistemas protéicos específicos. Uns poucos pacientes, contudo, apresentam uma reação exacerbada, exteriorizando todos os sinais clínicos da síndrome, especialmente as crianças de baixo peso.

Os principais sistemas protéicos do plasma sanguíneo, envolvido naquela reação inflamatória, são o sistema da calicreina ou das cininas, o sistema de coagulação, o sistema da

fibrinólise e o sistema do complemento. Além desses quatro sistemas principais, admite-se o comprometimento de outros sistemas protéicos específicos, cuja participação, contudo, ainda não é bem conhecida (SOUZA e ELIAS, 1995).

2.4. Superfícies, Propriedades e Caracterização

Nas análises superficiais se estudam as interfaces formada entre dois sistemas. Como se sabe, a interface entre duas fases é uma descontinuidade em que uma fase termina e outra começa, existindo, segundo a literatura, cinco tipos de interfaces diferentes. Mas nos sistemas biológicos as mais importantes são sólido-gás, sólido-líquido e líquido-gás.

Alguns autores como, por exemplo, ANDRADE (1973), comentam que a região interfacial para interações biológicas seja dividida em quatro níveis: 1° o nível molecular, de 3-15 Å da superfície, em que os efeitos da água, íons e moléculas pequenas ocorrem; 2° o nível macromolecular, de 10 a algumas centenas de ângstrons da superfície, em que podem ocorrer interações entre o material e proteínas, polissacarídeos o micelas; 3° o nível celular, na faixa de 2 μm em que se encontram as plaquetas, até 20 μm onde estão as células grandes; e 4° o nível de tecido, a partir de 0,1 mm. As moléculas da superfície polimérica, provavelmente, não interagem diretamente com o ambiente biológico a esses níveis, mas podem desencadear, indiretamente, eventos como trombose, que ocorrem na interface sanguínea.

Segundo ADAMSON (1976), a região superficial está constantemente mudando. Esse caráter dinâmico é resultante do movimento Browniano devido aos gradientes locais de temperatura e densidade e leva à questão da estabilidade interfacial. O pré-requisito geral para a existência de uma interface estável entre duas fases é que a energia livre de formação da interface seja negativa, sendo que se essa quantidade termodinâmica for positiva, o efeito das flutuações poderá levar à completa dispersão de uma material no outro. Esta última condição ocorre entre dois gases ou líquidos miscíveis. A espessura da interface e a natureza da superfície também são dependentes da fase de contato, isto é, o meio no qual o polímero está colocado. As interações

das moléculas com ambientes diferentes irão provocar orientações diversas, levando a propriedades interfaciais serem diferentes.

As propriedades que matem o contato com fluidos corporais são de grande importância no estudo da interação polímero-proteínas. A compatibilidade de dispositivos médicos não depende somente das propriedades físicos-químicas dos biomateriais, mas de diversos fatores, como a fabricação, o projeto do dispositivo, o estado do paciente e as condições de uso. Em muitos casos só são possíveis métodos para aumentar a biocompatibilidade através de mudanças nas propriedades físico-químicas dos biomateriais, tais como: composição da superfície (polar/apolar, ácido/base, ponte de hidrogênio, cargas iônicas, biomoléculas imobilizadas); movimentos moleculares de superfície (extremidades de cadeias poliméricas, anéis e sua flexibilidade); topografia da superfície (aspereza, porosidade, imperfeições e microbolhas de gás); domínios (distribuições e tamanhos); tendência à biodegradação, erosão ou corrosão; e estrutura cristalina/amorfa da superfície (SEVASTINOV, 1991).

Alguns estudos tratam que as propriedades físico-químicas dos biomateriais podem afetar os parâmetros energéticos da superfície. Existem muitas hipóteses que analisam a influência das características de energia da superfície e a hemocompatibilidade. Nesse sentido, alguns pesquisadores permitem estabelecer critérios diversos com relação a hidrofobia e hidrofilia das superfícies. VAN STRAATEN e PEPPAS (1991), no estudo da adsorção de BSA (albumina bovina) em poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), poli(metil metacrilato) (PMMA) e poli(etileno glicol) (PEG) demonstram que a natureza hidrofóbica do PVC e do PVDF favoreceu a adsorção da proteína, enquanto que o PEG, de natureza hidrofílica, não tornou propícia a adsorção. Este fato foi verificado para vários outros polímeros com relação à adsorção de fibrinogênio (LU e PARK, 1991) e γ-globulina (KONDO, 1991).

Alguns pesquisadores dão suporte à teoria hidrofóbica. ZISMAN (1964) considera que o material com tensão superficial crítica mínima será biocompatível. NYILAS (1975) comentam que a trombogenicidade aumenta com o aumento da contribuição polar da energia livre (γ^p) de superfície. Também KAELBLE (1977) concluíram que um material com alto componente

dispersivo de energia de superfície e um baixo componente polar, que é o caso de materiais hidrofóbicos, são mais compatíveis que aqueles com um baixo componente dispersivo de energia de superfície e um alto componente polar. Esses grupos de pesquisadores consideram que a hemocompatibilidade do material está conectada à alta afinidade da superfície pela proteína, o que seria um efeito de passivação (SEVASTINOV, 1991).

A adsorção de proteínas presentes no plasma, incluindo as proteínas da coagulação, é o primeiro evento observado nas interações superfície-sangue, segundo LYMAN e ROWLAND (1989). O mecanismo de adsorção é considerado de extrema importância e seu entendimento ajudaria muito na obtenção de materiais que não causem a formação de trombo. Após a adsorção protéica, elementos celulares presentes no sangue são adsorvidos na superfície do material, como, por exemplo, eritrócitos, plaquetas e leucócitos.

Existe outro grupo de pesquisadores que apóia a teoria hidrofílica da hemocompatibilidade. LYMAN (1965) considera que a biocompatibilidade do material aumenta com o aumento da energia de superfície. Andrade considera que um material biocompatível deve apresentar energia livre interfacial mínima (ANDRADE, 1973). Também IKADA (1981), RUCKENSTEIN e GOURISANKAR (1984) estabelecem que superfícies com energia livre interfacial mínima serão biocompatíveis se os componentes dispersivo e polar de energia livre de superfície do biomaterial e do sangue forem respectivamente iguais. Estes pesquisadores oferecem ênfase a minimização da adsorção de proteínas durante a interação de biomateriais com o sangue, isto é, idealmente materiais biocompatíveis não devem adsorver proteínas, segundo SEVASTINOV (1991). Estudos na FEQ/Unicamp revelam que Poliuretanos revestidos com heparina utilizando o poli(óxido de etileno) PEO como espaçador demonstraram um aumento da hidrofilicidade da superfície, contribuindo para a diminuição do número de plaquetas aderidas em relação à amostra padrão, segundo GARCIA (1995).

Resumindo, existem muitas variáveis que afetam a adsorção de proteínas na superfície de polímeros e os estudos relativos a este fenômeno são algumas vezes contraditórios, fazendo-se necessária a contínua busca de condições ótimas para a biocompatibilidade dos biomateriais.

Apesar de que a consideração do efeito de passivação para o aumento da hemocompatibilidade é mais adequada do que a consideração de que nenhum tipo de proteína deve ser adsorvida para que o biomaterial seja biocompatível.

2.4.1.Métodos de Caracterização Físico-Químicas da Superfície de um Biomaterial

A determinação das propriedades superficiais usando métodos externos é muito importante na caracterização das superfícies, além das dificuldades relativas intrínsecas das interfaces, cada técnica atinge profundidades diferentes. Na tabela 2.1 apresentam-se algumas técnicas de caracterização de superfície.

Tabela 2.1 Técnicas de caracterização de superfície e suas abreviações (Adaptado Lelah e Cooper, 1986).

ABREVIAÇÃO	NOME
MO	Microscópio Óptico
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MIR	Espectroscopia de infravermelho com reflexão interna múltipla
-	Ângulo de Contacto
ESCA	Espectroscopia Eletrônica para Análises Químicas
ISS	Espectroscopia de Espalhamento de Íon
SIMS	Espectroscopia de Massa de Íon Secundário

Atualmente existem mais técnicas de análise de superfícies, aproximadamente mais de 25 técnicas. Antes de se fazer a seleção do método de análise, deve-se conhecer as capacidades de cada técnica e suas limitações para que seja possível a extração das informações requeridas de maneira rápida e econômica.

Nesse trabalho foram utilizados os seguintes métodos para a caracterização físico-química da superfície do PVC:

a) Microscópio Óptico (MO)
b) Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)
c) Espectroscopia de infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR)
d) Ângulo de Contacto
e) Rugosidade superficial
f) Envelhecimento Natural

No capítulo 3, estes mencionados anteriormente são explicados mais detalhadamente.

2.4.2. Revestimentos com Heparina

O primeiro artigo sobre revestimento a base de heparina foi publicado por Gott, Whiffen e Datton em 1963, na revista *Science*. Inicialmente, a heparina foi anexa à superfície tratada com grafite, processo GBH (grafite/Benzalcônio/ Heparina). Este revestimento, porém, só se aplicava a plásticos rígidos (PARK e LAKES, 1992).

Em 1964 Leininger e colaboradores ligaram heparina a diversas superfícies poliméricas através da formação de sítios amônios quaternários (LENINGER et al., 1966).

Mais tarde, STERWARD e WILKOV (1976) realizaram uma heparinização mais simples, estudaram superfícies com heparina ligada ionicamente através da exposição do polímero a uma solução de um sal amônio quaternário TDMAC (cloreto de tridodecilmetillamônio). A porção hidrocarboneto do sal é solúvel no polímero e o sal se mantém alocado na posição após a remoção do solvente. Os grupos quaternários serviriam como sítios complexantes quando a superfície era colocada em contato com a solução de heparina. Os materiais resultantes se mostraram eficientes enquanto liberavam a heparina ligada ionicamente na corrente sanguínea. Durante a liberação, a concentração de heparina perto da superfície era suficientemente alta para

prevenir a formação de trombos. Depois de algum tempo, porém, o tratamento tornava-se ineficaz.

Para solucionar este problema, LARSSON et al. (1977) trataram a superfície de polietileno com glutaraldeído para estabilizar a heparina através de ligações cruzadas. Os autores afirmam que as superfícies tratadas se tornaram estáveis com perda inicial de 12% de heparina e nenhuma perda posterior sob condições *in vivo* por 7 dias. Também LABARRE et al. (1977) prepararam um copolimero de heparina-poli(metilmetacrilato) através da polimerização do metilmetacrilato iniciada por um radical heparina, proveniente da reação entre íons cério IV e heparina em solução nítrica aquosa.

Outros tratamentos paralelamente aos anteriores mencionados estavam sendo realizados, SCHMER (1972) ligaram covalentemente a heparina através da ativação da agarose com brometo de cianogênio, da ativação dos aminosubstituintes com tiofosgênio e da ativação dos ácidos carboxílicos substituintes com carbodimida. Os resultados mostraram um aumento no tempo de coagulação em relação ao padrão.

CHOLAKIS e SEFTON (1984) prepararam um hidrogel de PVAl (álcool polivinilico)-heparina através de uma reação de ligação cruzada da hidrólise do álcool polivinílico com glutaraldeído, produzindo uma ponte acetal. O material resultante apresenta compatibilidade com o sangue *in vitro,* sem perda significante da heparina.

Hoje em dia, os processos de heparinização vêm incluindo o uso de espaçadores a fim de aumentar a mobilidade da heparina e, conseqüentemente, sua atividade. Larm e colaboradores em 1980 descobrem um método novo que até hoje em dia é utilizado por um único fabricante no mundo, a MEDTRONIC, mas a patente é do fabricante Carmeda-Suecia. O método é chamado de *"End Point Attachment"* e consiste em permitir que a molécula de heparina se ligue covalentemente pelos grupos aldeídos aos grupos amino primários depositados na superfície do biomaterial, assim um aldeído de cada grupo da heparina está limitado a uma superfície do

material especifica, o que resta de cada molécula da heparina, inclusive os locais obrigatórios ativos, encontram-se livres. Resultando em uma ligação covalente estável (CBAS, 2000).

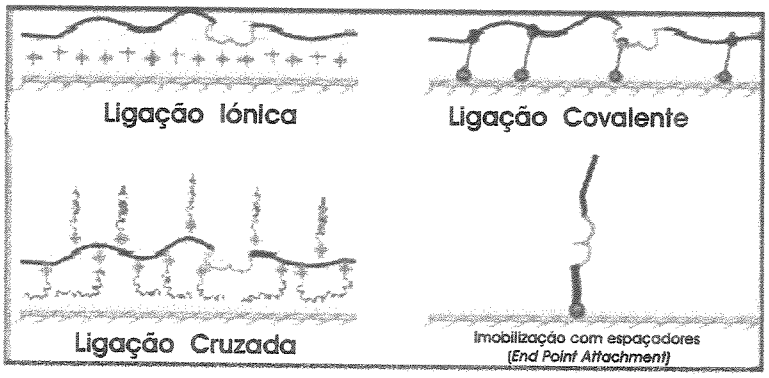


Figura 2.8 Principais métodos de ligação da heparina sobre superfícies poliméricas (Adaptado CBAS, 2000).

A figura 2.8 mostra um resumo dos diferentes métodos de ligação da heparina sobre as superfícies poliméricas, segundo CBAS (2000).

2.4.2.1. Importância dos Revestimentos com Heparina na Circulação Extracorpórea

A literatura revela os grandes benefícios a partir da introdução dos revestimentos a base de heparina na circulação extracorpórea (CEC). Muitos são os autores que realizaram comparações entre circuitos revestidos com heparina e não revestidos; outros compararam marcas diferentes de tubos comercializados no mercado em que alguns são revestidos, como a análise realizada por HARMAND e BRIQUET (1999). Os tubos revestidos com heparina diminuíram significativamente os trombos formados na superfície em comparação com três tubos não revestidos. Entre eles se encontrava o PVC sem revestir.

Um trabalho publicado pelo Departamento de Cirurgia Cardíaca do *Boston Medical Center* Massachusetts-USA evidencia a importância dos circuitos revestidos, neste caso com heparina.

Na continuação se relata o trabalho publicado titulado "Circuitos Pré-heparinizados na Trombocitopenia Induzida pela Heparina" (SHAPIRA et al. 1999):

"A anticoagulação durante a cirurgia com circulação extracorpórea, nos pacientes com trombocitopenia induzida pela Heparina (TIH), representa um risco acentuado. A resposta imunológica à heparina não fracionada pode resultar em hemorragias ou tromboses fatais.

Os autores relatam um caso em que um circuito inteiramente pré-heparinizado foi usado com sucesso, em um paciente portador de TIH.

Um homem de 82 anos de idade foi internado com angina instável. Havia história prévia de infarto do miocárdio, cardiomiopatia isquêmica, flutter atrial, hipertensão arterial e insuficiência renal crônica. Foi iniciado um tratamento com a infusão venosa de heparina e nitroglicerina.

O cateterismo cardíaco evidenciou uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo de 25% e lesões importantes do tronco da coronária esquerda e dos três vasos coronarianos principais. A contagem de plaquetas inicialmente era de 182 000/mm^3, mas em 24 horas caiu para 77 000/ mm^3. Suspeitou-se da presença de trombocitopenia induzida pela heparina e a droga foi suspensa. Como não houve melhora do quadro cardiológico, a heparina teve que ser reiniciada e o paciente foi encaminhado para tratamento cirúrgico (4 pontes) com as plaquetas em 60 000/mm^3. Não havia sinais de coagulopatias.

Todos os componentes do circuito extracorpóreo eram revestidos com heparina: reservatório venoso rígido, reservatório de cardiotomia, oxigenador de membranas, bomba centrífuga, filtro arterial, linhas arterial e venosa, linhas de cardioplegia e cânulas.

O paciente recebeu um total de 3000 UI de heparina bovina que elevou o seu TCA de 125 para 194 segundos. O TCA foi monitorizado a cada 20-30 minutos e manteve-se entre 234 e 284 segundos. Ao final da cirurgia as plaquetas estavam em 38000/mm^3.

O paciente precisou apenas de uma unidade de concentrado de hemácias; sua evolução foi sem complicações e sua alta hospitalar ocorreu no quinto dia de pós-operatório".

O presente caso ilustra a eficiência dos circuitos pré-heparinizados na perfusão de pacientes portadores de TIH que não podem receber anticoagulação plena com a heparina. Também demonstra-se uma vez mais que tubos revestidos com heparina podem reduzir agressões no organismo, tempos pós-operatórios e custo das cirurgias de maneira geral.

2.4.3. Revestimento de Superfícies através de Plasma

O nome mais comum que se encontra na literatura das aplicações do plasma na ciência e na indústria é "Tecnologia do Plasma", sendo um dos mais poderosos e versáteis meios de se obter altas temperaturas. Os equipamentos que fazem uso da tecnologia de plasma chegam a obter temperaturas na faixa de 5000 a 50 000 K, e possuem muitos usos práticos como, por exemplo, a deposição de filmes finos, produção de pós metálicos, análise de elementos químicos, dentre muitas outras, sendo que, atualmente, as questões ambientais têm ganho cada vez mais relevância (EDDY et al. 1995).

A formação do plasma propriamente dito em um equipamento gerador de plasma pode ocorrer de várias maneiras diferentes, dentre elas temos: radiofreqüência, microondas, sendo a mais comum, como o resultado da passagem de uma corrente elétrica através de um meio gasoso ionizado. Este meio gasoso ionizado é apropriadamente chamado de plasma, o quarto estado da matéria. Este termo foi introduzido na física de descargas gasosas por um físico chamado Irving Langmuir no ano 1928.

Nos tempos atuais, esta tecnologia vem despertando grande interesse científico e tecnológico, e na área de biomateriais já tem grande utilidade na deposição de revestimentos biocompatíveis, desde filmes finos até camadas de biomateriais sobre substratos diversos.

A figura 2.9 apresenta o processo de revestimento ou deposição de filmes finos sobre o substrato de um polímero. Para este exemplo, observam-se que dois gases são sangrados no reator do plasma e eles vão atuar na superfície do polímero (substrato). Eles, durante o revestimento de plasma, se polimerizarão formando um revestimento sobre toda a superfície tratada. Os revestimentos produzidos por este método de plasma de baixa energia (*Glow Discharge)* são muito finos, geralmente alguns nanômetros (GALA, 2001).

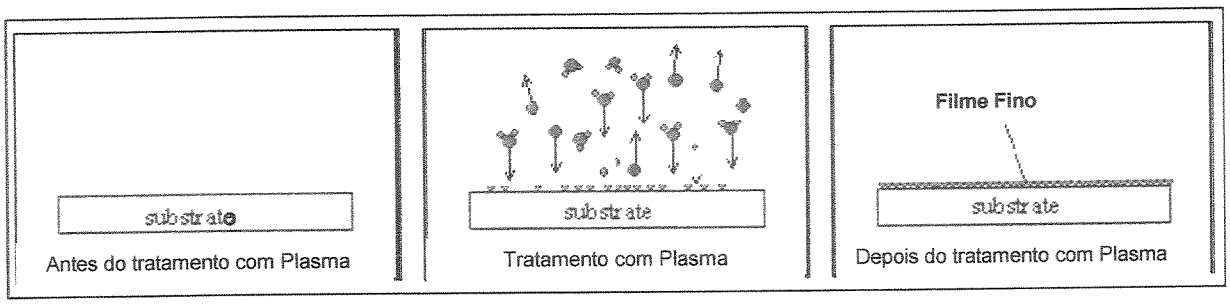


Figura 2.9 Processo de revestimento por plasma de baixa energia *(Glow Discharge)* (Adaptado Gala, 2001).

Algumas aplicações dos tratamentos utilizando plasma de baixa energia encontram-se na fabricação das válvulas do coração artificial, evitando a aderência das plaquetas e diminuindo a formação de coágulos na superfície, através do filme de oxido de titânio (XIANGHUAI, 2000).

Outros autores utilizam o plasma para estabilizar os revestimentos realizados com heparina, provocando uma imobilização covalente na superfície do biomaterial (BAE, 1999; KANG, 1995 e SAITO, 1997). Posteriormente este método será detalhadamente explicado, para o caso particular deste trabalho.

CAPÍTULO 3

Procedimento Experimental

Este capítulo trata dos procedimentos experimentais envolvidos na obtenção e caracterização dos revestimentos realizados sobre os substratos de poli(cloreto de vinila) (PVC).

Em primeiro lugar, são apresentados os materiais utilizados, seguido da descrição do processo de obtenção dos revestimentos, do planejamento experimental para a determinação da quantidade de corpo de provas necessários para cada ensaio e, por último, são apresentadas as técnicas utilizadas para tais caracterizações.

3.1. Materiais Utilizados

O estudo dos revestimentos sobre substratos dos tubos de PVC utilizados na circulação extracorpórea (CEC) envolve os seguintes materiais:

a) Tubos de PVC com diferentes calibres e formatos (mais utilizados em CEC):
   - Discos de PVC (a partir dos tubos)
   - Segmentos de tubos de PVC (Tubo 3/16" (4,75mm), Tubo ¼" (6,35mm), Tubo 3/8" (9,52mm) e Tubo ½" (12,7mm))
   - Placas de PVC (a partir dos tubos)

b) Solução de Heparina-Cloreto de Benzalcônio+Álcool Isopropílico

- A Heparina-Cloreto de Benzalcônio em pó, comercializada como *Heparin-Benzalkonium (From porcine mucosal heparin)*
- Álcool Isopropílico

c) Plasma de vários gases:

- Argônio,
- Oxigênio,
- Hexafluoreto de Enxofre (SF_6),
- Hidrogênio,
- Combinações de entre eles

3.1.1. Tubos de PVC

Foram utilizados tubos de PVC atóxicos para uso médico com diâmetro interno: 3/16" (4,75mm), ¼" (6,35mm), 3/8" (9,52mm), ½" (12,7mm). A figura 3.1 mostra os diferentes calibres utilizados no trabalho.

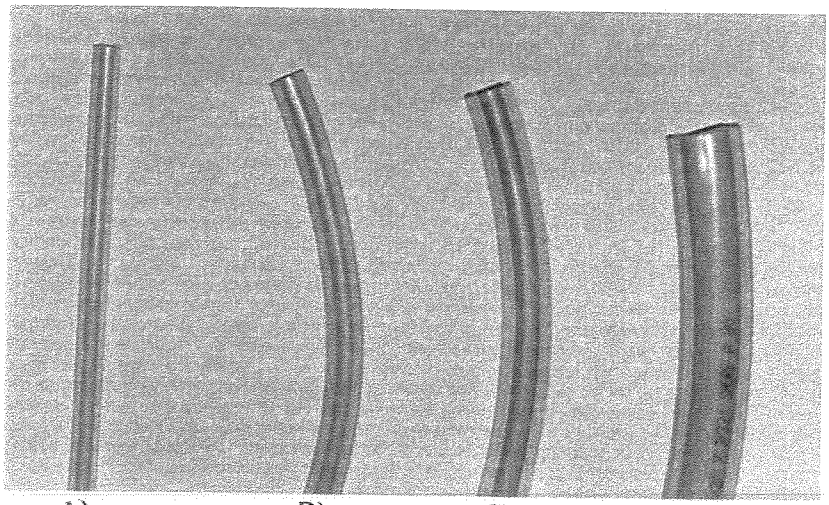


Figura 3.1 Calibres de tubos de PVC para uso médico mais utilizados em procedimentos de CEC. A) tubo 3/16" (4,75mm); B). tubo ¼" (6,35mm); C) tubo 3/8" (9,52mm); D) tubo ½" (12,7mm).

3.1.1.1. Discos de PVC

Os corpos de provas em forma de discos retirados dos tubos de PVC apresentam as seguintes características:

- Diâmetro: d= 10,00 mm
- Área superficial dos discos: A_S= 78,00 mm^2

Estes corpos de provas foram usados nas caracterizações via Microscopia óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e uma parte deles para medir ângulo de contato.

3.1.1.2. Segmentos de tubos de PVC

Os segmentos de tubos utilizados para as caracterizações apresentam diferentes calibres, como foi mencionado anteriormente: tubos de PVC (Tubo 3/16" (4,75mm), Tubo ¼" (6,35mm), Tubo 3/8" (9,52mm) e Tubo ½" (12,7mm). Estes calibres são os mais utilizados nos procedimentos de circulação extracorpórea e serviram para caracterizar os ensaios de rugosidades internas e hemocompatibilidade *in vitro*.

3.1.1.3. Placas de PVC

Os tubos foram transformados em placas quase planas, para isto foi necessário utilizar duas superfícies polidas (vidro). Os tubos foram cortados longitudinalmente e colocados entre dois vidros planos; logo depois de serem prensados com uma mordaça e ter retirado o ar da interface, foram mantidos por cinco horas a uma temperatura de 65 °C na estufa do laboratório. As placas obtidas foram usadas nas caracterizações via Microscopia óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura e ângulo de contato.

3.1.2. Solução de Heparina-Cloreto de Benzalcônio

A solução de heparina foi fabricada no LabioMec/DEMA/FEM/UNICAMP a partir da Heparina-Cloreto de Benzalcônio em pó. A solução é diluída em Álcool Isopropílico 100%.

A aparência da solução Heparina-Cloreto de Benzalcônio é transparente e para ser conservada basta mantê-la a uma temperatura de 2-8°C em recipiente fechado.

3.2. Métodos de Obtenção dos Revestimentos

Os revestimentos foram obtidos por dois métodos principais o método I e II. O método I, chamaremos de revestimento com heparina. A camada obtida de heparina-cloreto de benzalcônio deverá ter uma espessura que oscile entre 0,8 – 1,2 μm. Algumas das técnicas aplicadas para a obtenção dos revestimentos são resultados de alguns anos de pesquisa dos Professores Dr. Waldyr Parolari Novello e Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda. Assim, este trabalho constitui uma continuação da linha de pesquisa iniciada por eles (NOVELLO, 1998).

Já o método II, que chamaremos de revestimento com plasma, utiliza para revestir os substratos de PVC plasmas de diferentes gases e suas combinações, com o objetivo de obter modificações superficiais e deposição de filmes finos nas superfícies. Isso poderia favorecer a adesão do revestimento de heparina-cloreto de benzalcônio ou obter filmes finos hidrofóbicos sobre os substratos de PVC.

Na continuação será explicado o processo de limpeza dos substratos de PVC, como passo inicial dentro do processo de revestimento e, seguidamente, explicação sobre os métodos de revestimentos.

3.2.1. Limpeza dos substratos

Para a limpeza dos substratos é importante que haja uma padronização na hora da lavagem dada aos tubos e à vidraria a ser utilizada neste procedimento. Lava-se a vidraria a ser utilizada com detergente neutro, enxaguando-se com água corrente e, posteriormente, com água destilada três vezes.

Logo depois os substratos e tubos de PVC foram limpos primeiramente com auxílio de um algodão embebido em solvente apropriado (água com detergente neutro Extran). A seguir, colocam-se os substratos e tubos cortados em um béquer juntamente com 200 ml de uma solução 0,5% (em volume) de Extran MA02 neutro. O béquer deve ser colocado no ultra-som por 15 minutos e, ao fim deste tempo, os substratos devem ser enxaguados no próprio béquer com água corrente por 10 minutos. Posteriormente, enxágua-se três vezes com água destilada com agitação de 30 segundos. Por último, realiza-se a secagem, utilizando a estufa a 50°C de temperatura.

3.2.2. Método I (Revestimento com Heparina)

O método I ou revestimento com heparina, depois de limpos os substratos a serem revestidos, inicia-se o revestimento. Este método consiste no recobrimento estático praticado sobre as superfícies internas dos tubos de PVC. Para isto é necessário bloquear uma das extremidades do segmento do tubo, logo depois se preenche com solução de revestimento de heparina-cloreto de benzalcônio e começa-se a medir o tempo segundo metodologia do LabioMec. Se os substratos não são tubos, ou seja, placa, discos, procede-se à imersão da solução de revestimento que se encontra em um béquer e se faz a mesma metodologia que o caso dos tubos.

3.2.3. Método II (Revestimento com Plasma)

Depois de limpos os substratos de PVC, segundo metodologia explicada anteriormente, estes são colocados no interior do reator e se procede a executar todos os passos segundo protocolo de

Laboratório de Plasma UNESP-Guaratinguetá. A figura 3.2 mostra uma representação esquemática do reator de plasma com o mesmo princípio de funcionamento que o utilizado neste trabalho.

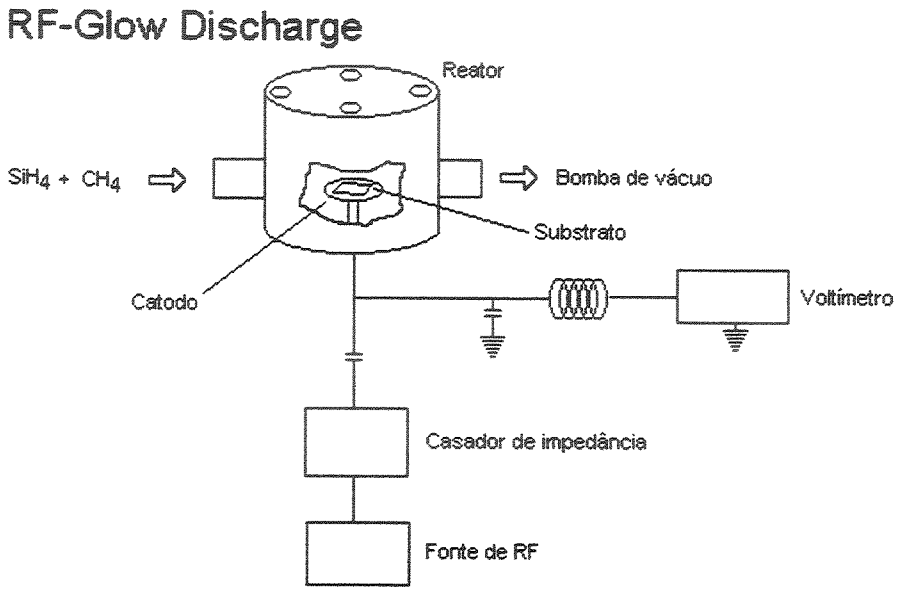


Figura 3.2 Esquema do reator de Plasma *(Glow Discharge)*. (Adaptado PEMM, 2001)

As condições que foram utilizadas para obter a deposição de filmes finos nos substratos foram:

- Potência: 50 Watt (variável fixa para todas as condições experimentais, baseada em experiências anteriores do Laboratório de Plasma)
- Pressão: $1,5 \cdot 10^{-1}$ Torr (variável fixa para todas as condições experimentais, baseada em experiências anteriores do Laboratório de Plasma)
- Tempo: 2- 15 min
- Gases Injetados: Argônio, Oxigênio, Argônio+Oxigênio, Hexafluoreto de Enxofre (SF_6).

Nos resultados serão apresentadas as combinações de condições que foram submetidas os substratos de PVC e alguns tratamentos sobre superfícies revestidas com heparina. O principal teste utilizado para ilustrar o comportamento dos revestimentos vai ser a medição do ângulo de contato.

3.3. Planejamento Experimental

Antes de dar início à descrição de como foram realizadas as caracterizações e os ensaios envolvidos, comentar-se-á a necessidade de uma análise estatística preliminar, com o objetivo de determinar o número de corpos de provas significativamente representativos para cada ensaio de modo que os resultados obtidos estejam dentro de limites de confiabilidade preestabelecidos. A figura 3.3 apresenta um diagrama que resume as etapas seguidas para a análise estatística.

Antes de dar procedimento ao planejamento experimental foi necessário saber exatamente o que se deseja estudar, como obter os dados e uma estimativa das quantidades de corpos de provas a serem analisados.

Observa-se no fluxograma que a etapa inicial corresponde ao reconhecimento e definição do problema, o qual depende em grande parte da experiência já adquirida no estudo de processos semelhantes.

Em uma etapa posterior, vem a escolha das variáveis de influência (VI) e das faixas de valores em que essas variáveis serão avaliadas, definindo-se o nível específico (valor) a ser empregado em cada ensaio. Para este trabalho as variáveis de influência foram: Tipos de superfícies revestidas (heparina-cloreto de benzalcônio e plasma) e não revestidas.

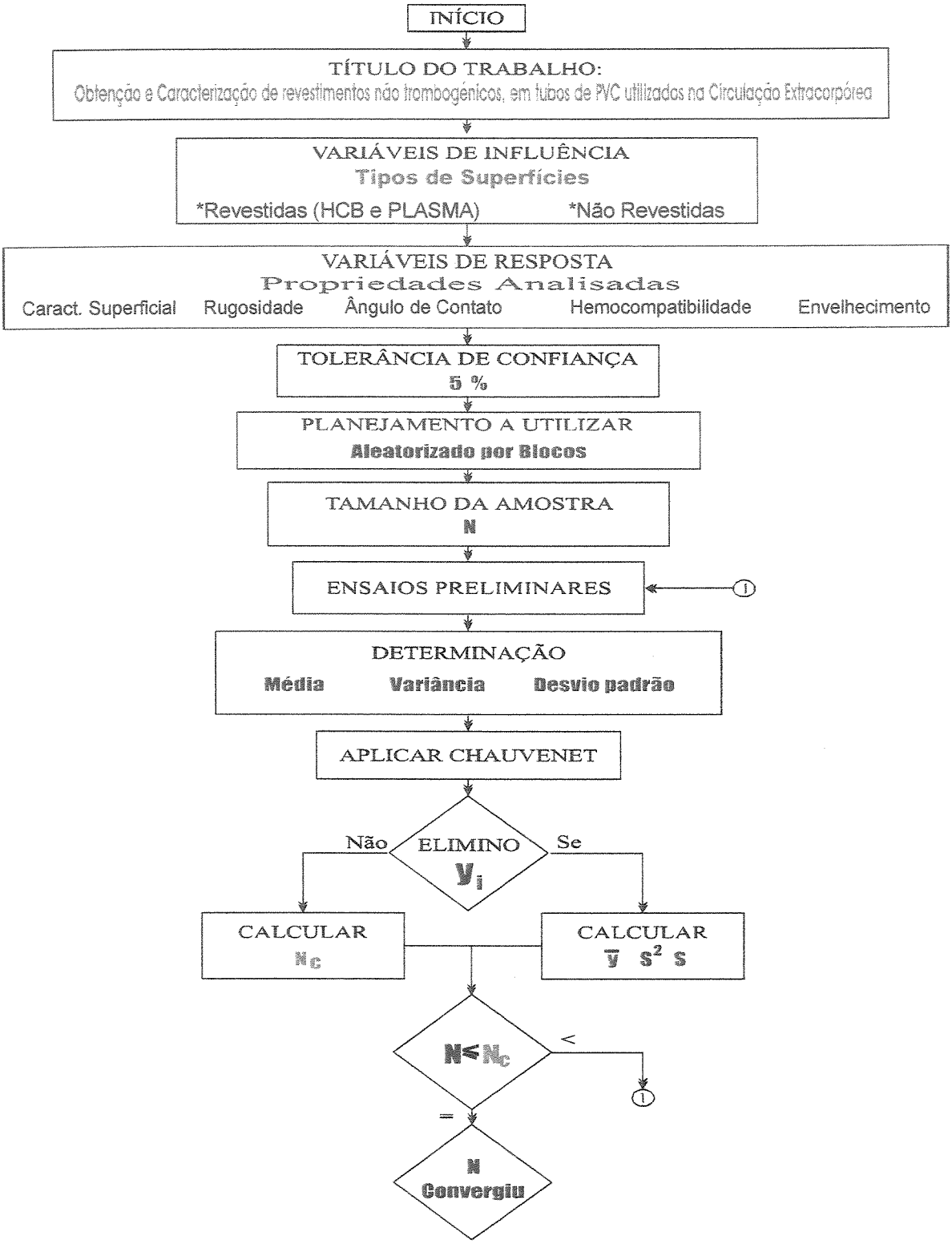


Figura 3.3- Fluxograma das etapas envolvidas no planejamento experimental.

Definidas as VI procede-se a escolha da variável de resposta (VR), as quais devem ser mensuráveis, controláveis e objetivas para a análise dos resultados. Conjuntamente a esta escolha, selecionam-se os instrumentos a utilizar com seu erro associado. As VR correspondem aos resultados obtidos através dos ensaios de caracterização superficial, rugosidade, ângulo de contato, hemocompatibilidade e envelhecimento natural, separadamente explicados com maior detalhamento em itens posteriores.

Na seqüência, estabelece-se uma tolerância de confiança do experimento, que depende dos erros associados a cada instrumento utilizado para medir as VR. Assim, a tolerância estabelecida foi de 5%, significando 95% de confiança na afirmação dos resultados das medições.

Define-se então o planejamento estatístico a ser empregado. Utiliza-se neste trabalho o do tipo: "Planejamento Experimental Completo Aleatorizado por Blocos", o qual permite realizar um experimento com maior precisão, o que reduz a influência de variáveis incontroláveis, com o objetivo de avaliar a influência dos revestimentos para uma dada variável de influência, bloqueando-se uma fonte de variabilidade, a qual deseja-se eliminar. Para este caso, verifica-se a influência dos revestimentos sobre as diferentes medições dos ensaios de: rugosidade, ângulo de contato e hemocompatibilidade. Ao bloquear-se assim os tipos de ensaios, cada bloco contém todos os tipos de revestimentos os quais são aleatorizados dentro de cada bloco.

A seguir, escolhe-se um tamanho de amostra (N) para cada ensaio. Este valor, a princípio, foi selecionado a partir de bibliografias consultadas em que se realizam ensaios semelhantes com materiais parecidos, constituindo este N um número que será posteriormente comparado com outro (N_c) devidamente calculado a partir de resultados experimentais.

Ensaia-se então N corpos de provas e determina-se com os resultados dos ensaios: a média das medições, sua variância e desvio padrão. Se existir algum resultado de uma ou mais réplicas que podem ser questionáveis do resto dos valores e se deseja saber se pertence ou não às séries de

resultados, aplica-se então o procedimento de *Chauvenet* para rejeitar ou manter esses resultados na análise da amostra. Tal procedimento consiste no cálculo da razão de desvio padrão, DR:

$$DR = \frac{|y_i - \bar{y}|}{S}$$

$y_i \Rightarrow$ *componente dos resultados da amostra*
$\bar{y} \Rightarrow$ *média resultante dos componentes da amostra*
$S \Rightarrow$ *desvio padrão*

O componente dos resultados y_i, será rejeitado se:

$$DR > Dr_o$$

e mantido se:

$$DR \leq DR_o \qquad DR_o \Rightarrow \text{razão padrão (tabela de Chauvenet)}$$

Por último calcula-se N_c para amostras pequenas, menores que 20, indicando-se para isto o uso da distribuição *t* de *Student,* tendo-se a seguinte relação:

$$N_c = \left(t\frac{S}{\delta}\right)^2$$

$$\delta = \alpha \cdot \bar{y}$$

$t \Rightarrow t$ *de Student (tabela)*
$S \Rightarrow$ *Desvio padrão*
$\delta \Rightarrow$ *Intervalo de confiança*
$N_c \Rightarrow$ *número de réplicas*

Com o valor de N_c calculado compara-se com o N dado inicialmente devido a experiências. Se é igual, então convergiu; caso contrário, recalcula-se o N_c com um novo valor de *t*, até que resultem valores repetidos. Para o caso de $N \leq N_c$, então repete-se os ensaios preliminares com outro N.

Nos diferentes ensaios utilizados neste trabalho e apresentados em item que seguem, mostram-se os valores de N_c calculados para cada ensaio específico.

3.4. Caracterização Física dos Revestimentos

A caracterização física dos revestimentos em substratos de tubos de PVC utilizados na circulação extracorpórea (CEC) foi realizada através da análise de suas superfícies, conforme os itens que se seguem.

3.4.1. Caracterização superficial

Amostras para a caracterização superficial de superfícies revestidas e não revestidas foram extraídas de diferentes calibres de tubos de PVC mais utilizados em procedimentos de CEC. Analisaram-se diferentes formatos extraídos de lotes iguais para os diferentes calibres de tubos. Os formatos obtidos em forma de placas, discos e segmentos de tubos, são específicos para cada tipo de ensaio, apresentando as seguintes dimensões:

- Placas de PVC: 15 x 50 mm
- Discos de PVC: ∅ 10 mm
- Segmentos de tubos: 50 –100 mm

Em seguida, os corpos de prova foram lavados de acordo com procedimento explicado anteriormente.

Após a lavagem dos corpos de prova faz-se o revestimento dos substratos para serem analisados nos diferentes ensaios.

Os corpos de prova foram utilizados para a análise superficial, via microscopia óptica e eletrônica, para observação e caracterização das superfícies revestidas e não revestidas presentes, caracterização da topografia e espessura do revestimento.

3.4.1.1. Microscopia Óptica (MO)

Para a análise superficial geral utilizou-se para microscopia ótica o banco metalográfico modelo Neophot-32, marca Zeiss, e microscópio óptico Reichert-Jung-Olympus, série 150, com câmera vídeo SONY acoplada, utilizando luz polarizada, acoplado a sistema de análise de imagens, com *software* dedicado, que pertence ao LabioMec/DEMA/FEM/UNICAMP.

3.4.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para microscopia eletrônica utilizou-se microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca JOEL modelo JXA 840A, cujo sistema de análise utiliza um espectrômetro de energia dispersiva (*Energy Dispersive Spectrometer*) do Laboratório DEMA/FEM/UNICAMP. As condições de operação utilizadas foram:

a) corrente de filamento	200 μA
b) tensão de aceleração do feixe	10 KeV

As amostras foram analisadas no MEV em termos de homogeneidade do revestimento, espessura, adesão de células por áreas (cinco áreas diferentes por amostras), microanálises pontuais e observações das irregularidades da superfície.

Para microanálise por feixe de elétrons das fases presentes nos revestimentos e suas interfaces, foram utilizadas as seguintes condições: tensão de 20 KV e corrente variável conforme condições do filamento, realizando-se análise em partes revestidas e não revestidas, assim como nas fendas dos revestimentos.

3.4.2. Rugosidade Superficial

A rugosidade superficial foi realizada nas superfícies internas de oito jogos de tubos de PVC, contendo três amostras cada jogo, nos calibres de:

Tubo 3/16" (4,75mm),
Tubo ¼" (6,35mm),
Tubo 3/8" (9,52mm),
Tubo ½" (12,7mm),

para um total de 12 amostras de tubos não revestidas, com número de replicas N=3.

O equipamento utilizado foi o rugosímetro S8P, fabricante Perthen, série n° 0892702, com padrão de amplificação vertical Halle Gmbh, série n° EM 874, certificado n° PTB 039PTB96, pertencente ao Centro de Tecnologia/UNICAMP. Na figura 3.4 mostra-se um esquema de como funciona um rugosímetro.

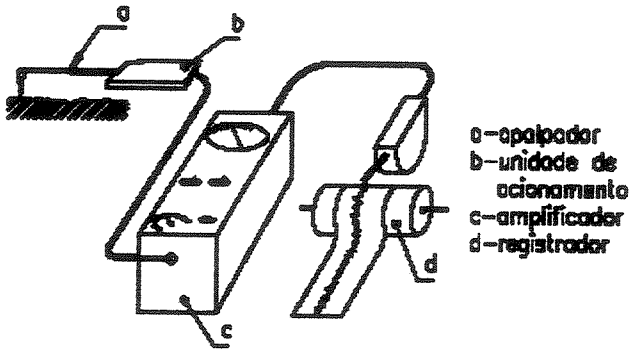


Figura 3.4 Esquema de funcionamento de um rugosímetro

O processo de funcionamento consiste, basicamente, em percorrer a rugosidade com um apalpador (a) de formato normalizado, acompanhado de uma guia (patim) em relação ao qual ele se move verticalmente.

Enquanto o apalpador é movimentado pela unidade de acionamento (b) e acompanha a rugosidade, a guia (patim) acompanha as ondulações da superfície. O movimento da agulha é transformado pelo amplificador (c) em impulsos elétricos e registrados (d) no mostrador e no gráfico.

A calibração do rugosímetro S8P, utilizado para este trabalho, foi realizada utilizando-se o apalpador RHT 6-50, n° 43157. Para a determinação da constante do apalpador, foi utilizada o padrão de amplificação vertical indicado acima, e condições de medições de acordo com a norma DIN 4768. A medida obtida é a média de nove indicações para cada sentido, longitudinal e transversal em cada jogo de calibre não revestido.

As condições do ensaio foram:

L_e= 0,08 mm

L_t= 1,75 mm

L_m= 1,25 mm

Temperatura: 20 ± 1 °C

Na figura 3.5 observa-se um exemplo dos resultados da medição de rugosidade para uma chapa de aço galvanizado. Obtido o perfil das irregularidades superficiais, representadas pela linha vermelha do gráfico, procede-se à determinação dos parâmetros de rugosidades.

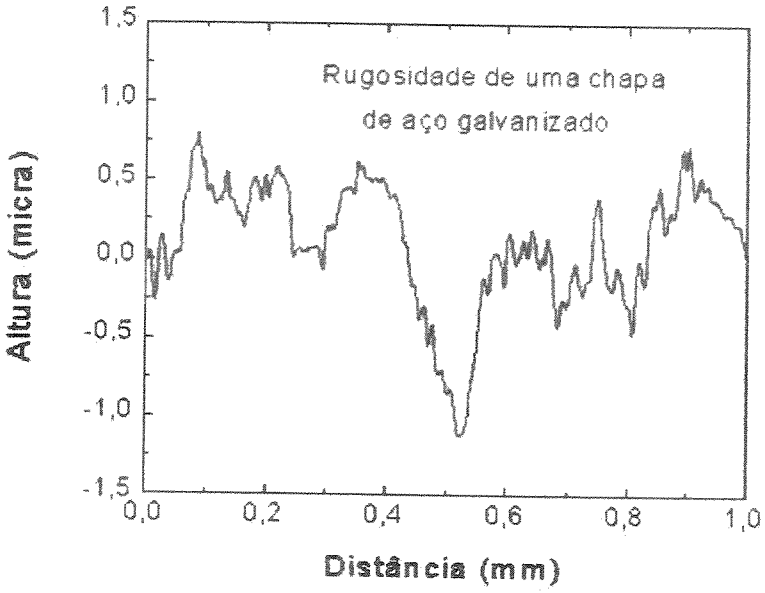


Figura 3.5 Exemplo de medição de rugosidade para uma chapa de aço galvanizado.

Os parâmetros de rugosidades adotados para avaliar a rugosidade de uma superfície são:

- Rugosidade Média ---- (Ra)
- Rugosidade Máxima ---- (Rmax)
- Rugosidade Total ---- (Rt)
- Rugosidade Média aritmética ---- (Rz)
- Rugosidade Média do Terceiro Pico e Vale (R_{3Z})

O parâmetro Ra *(roughness average)* representa a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento (yi) dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medição (lm). Essa grandeza pode corresponder à altura de um retângulo, cuja área é igual à soma absoluta das áreas delimitadas pelo perfil de rugosidade e pela linha média, tendo por comprimento o percurso de medição (lm), figura 3.6.

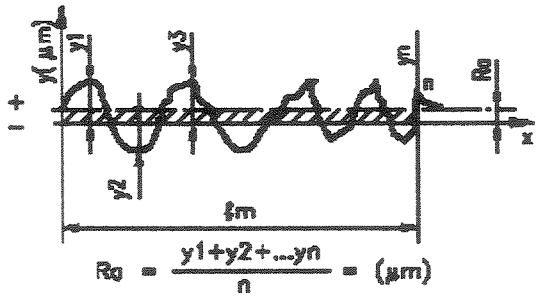


Figura 3.6 Determinação da Rugosidade Média (Ra)

A Rugosidade máxima (Rmax) está definida como o maior valor das rugosidades parciais (Zi) que se apresenta no percurso de medição (lm). Por exemplo: na figura 3.7, o maior valor parcial é o Z_3, que está localizado no 3° *cut off*, e que corresponde à rugosidade Rmax.

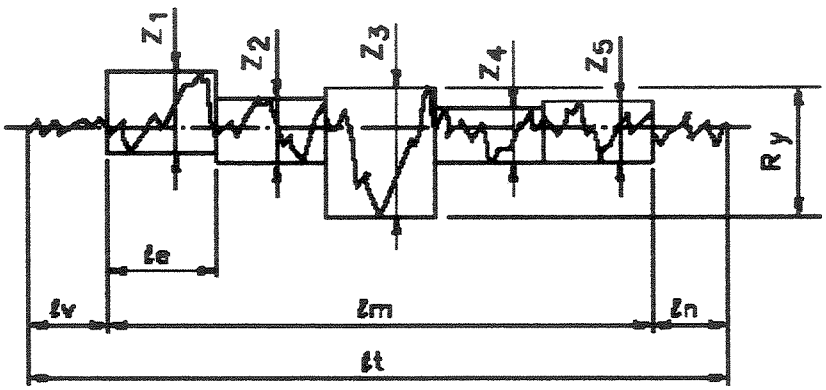
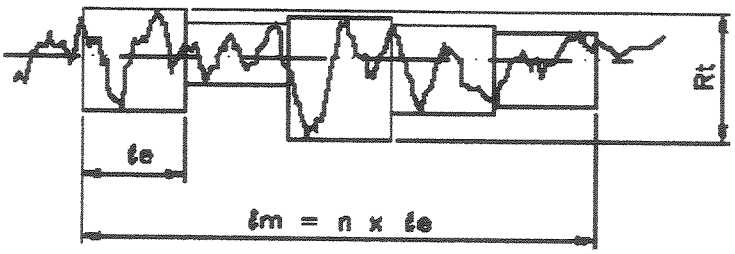


Figura 3.7 Determinação da Rugosidade Máxima (Rmax)

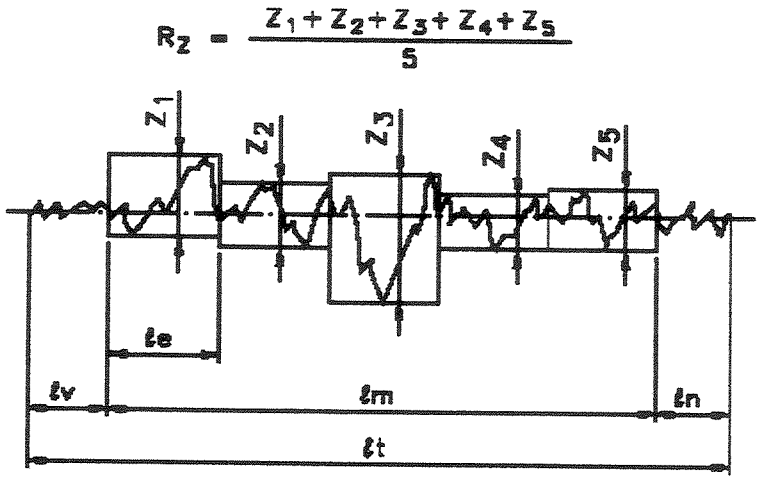
O parâmetro rugosidade total (Rt) corresponde à distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo no comprimento de avaliação (lm), independentemente dos valores de rugosidade parcial (Zi). Na figura 3.8, pode-se observar que o pico mais alto está no retângulo Z_1, e que o vale mais fundo encontra-se no retângulo Z_3. Ambos configuram a profundidade total da rugosidade Rt.



Rugosidade Rt. Distância entre pico mais alto e vale mais fundo.

Figura 3.8 Determinação da Rugosidade Total (Rt)

A rugosidade média (Rz) corresponde à média aritmética dos cinco valores de rugosidade parcial. Rugosidade parcial (Zi) é a soma dos valores absolutos das ordenadas dos pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média, existentes no comprimento de amostragem *(cut off)*. Na representação gráfica do perfil, esse valor corresponde à altura entre os pontos máximo e mínimo do perfil, no comprimento de amostragem (le), figura 3.9.

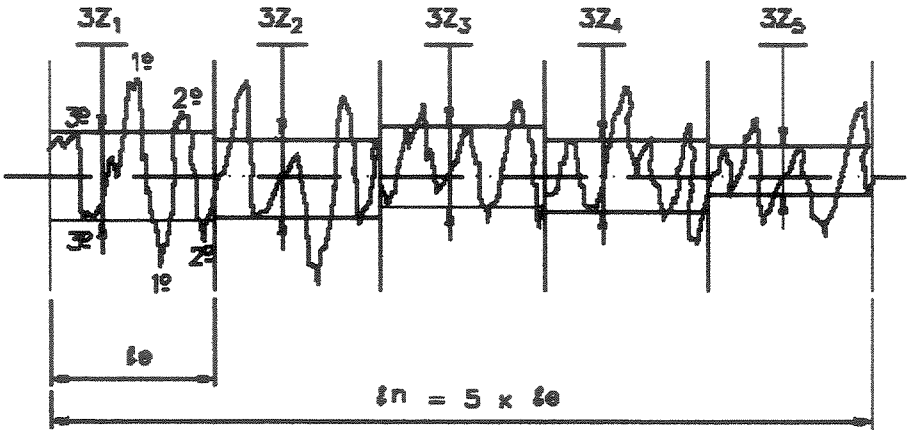


Rugosidade parcial Zi para definir Rz.

Figura 3.9 Determinação da Rugosidade Média Aritmética (Rz)

O parâmetro rugosidade média do terceiro pico e vale (R_{3Z}) consiste na média aritmética dos valores de rugosidade parcial (3Zi), correspondentes a cada um dos cinco módulos *(cut off)*. Em cada módulo foram traçadas as distâncias entre o terceiro pico mais alto e o terceiro vale mais

fundo, em sentido paralelo à linha média. Na figura 3.10 ilustram-se os cinco módulos com os valores 3Zi (i = de 1 a 5).



$$R_{3Z} = \frac{3Z_1 + 3Z_2 + 3Z_3 + 3Z_4 + 3Z_5}{5}$$

Figura 3.10 Determinação da Rugosidade Média do terceiro pico e vale (R_{3Z})

Para este trabalho serão medidos todos os parâmetros e depois de obter os resultados será necessário um análise para determinar qual deles avalia melhor a topografia da superfície interna dos tubos de PVC.

3.4.3. Medidas de Ângulo de Contato

O ângulo de contato representa o parâmetro básico para definir a molhabilidade da superfície.

Os métodos para medição do ângulo de contacto em sólidos são: Método *"sessile drop"*, Método dinâmico *"Wilhelmy"*, Método de fibra única *"Wilhelmy"*, Método *"powder contact Angle"*. Para medição do ângulo de contato no caso que sejam líquidos existem duas vias: o método estático e o método dinâmico. Dentro do método estático encontram-se os seguintes métodos: Método "*Du Nouy Ring*", Método "*Wilhelmy Plate*", Método "*Spinning Drop* " e o Método

"*Pendant Drop*". No caso do dinâmico encontram-se: Método "*Bubble pressure*" e Método "*Drop Volume*" (KRÜSS, 2001).

O conceito do ângulo de contato é baseado na energia superficial. Quando uma gotícula interage com uma superfície sólida, ela atinge uma forma de equilíbrio. A Gotícula pode ser caracterizada pelo ângulo formado na região onde o líquido contata a superfície sólida. Este ângulo é chamado de ângulo de contato.

A determinação do ângulo de contato neste trabalho foi realizada utilizando o goniômetro NRLCA, modelo Ramé-Hart 100-00, que usa o método *sessile drop*. Este equipamento pertence ao Laboratório de Plasma/Depto de Física-Química/UNESP-Guaratinguetá. Ele contém uma câmara de vídeo que grava a imagem de uma gota de água deionizada (0,2 μl em volume) depositada sobre a superfície da amostra utilizando uma micro-seringa. Também possui um *software* dedicado para análise de imagem, o RHI 2001 *Imaging Software*, que determina o ângulo de contato entre o plano tangencial à gota (calculado desde a imagem) e um plano paralelo à interface gota-superfície.

O conceito de ângulo de contato pode ser usado quantitativamente para medir a interação entre quaisquer líquidos e superfície sólida, figura 3.11. O componente da energia superficial livre do líquido e sólido pode ser modelada vetorialmente. A definição de ângulo de contato pode ser escrita como uma soma vetorial:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV}.\cos\theta$$

γ_{LV} = *Energia livre superficial do líquido.*

γ_{SL} = *Energia livre interfacial entre o sólido e o líquido.*

γ_{SV} = *Energia livre superficial do sólido.*

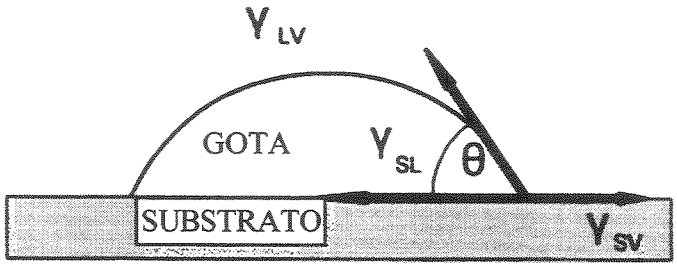


Figura 3.11 - Diagrama do ângulo de contato.

Além de ser medido o ângulo de contato, foi calculado através do programa do equipamento a energia superficial harmônica e geométrica, assim como o trabalho de adesão. Foi necessário para isto fazer medidas do ângulo de contato com Diodometano (apolar) e água deionizada (polar). O número de réplicas por amostras analisadas foi N=5, para cada condição de revestimento.

3.4.4. Espectroscopia de Infravermelho com Reflexão Interna Múltipla (MIR)

A absorção da radiação Infravermelha (Iv) (de comprimentos de onda entre 800 e 300000 nm) provoca alterações na energia térmica das moléculas, nomeadamente da energia rotacional, vibracional e/ou translacional. A energia térmica de uma molécula é dada pela fórmula:

$$E_T = E_e + E_t + E_r + E_V$$

E_T - Energia térmica da molécula

E_e - Energia eletrônica

E_t - Energia translacional

E_r - Energia rotacional

E_V - Energia vibracional

A espectrometria de infravermelho estuda estas transições como resultado da absorção da radiação Iv. As técnicas espectroscópicas de infravermelho consistem em:

a) medição do espectro vibracional de uma amostra, através da qual se faz passar a radiação de infravermelho,
b) registro dos comprimentos de onda que foram absorvidos,
c) e determinação da intensidade de absorção da radiação.

Sabendo que a quantidade de energia absorvida é função do número de moléculas presentes e que cada molécula tem um conjunto específico de freqüências de vibração que a caracterizam, esta análise fornece uma informação tanto qualitativa como quantitativa. Isso identifica uma substância desconhecida, por comparação do seu espectro de infravermelho com os espectros de substâncias conhecidas, até encontrar um igual ou próximo.

A região do espectro eletromagnético no Infravermelho pode ser dividida em 3 secções principais: Iv próximo (350 a 800 nm), Iv médio (2000/2500 a 16000 nm) e Iv longínquo (16000 a 300000 nm). A zona das impressões digitais, de maior interesse para fins analíticos, é a do Iv médio (OLIVEIRA, 2001).

Para a presente análise, a espectroscopia de infravermelho com reflexão interna múltipla refere-se à absorção parcial e reflexão atenuada de uma onda de infravermelho incidente, com trajetória paralela a uma interface entre dois meios de índices de refração diferentes. Nesta técnica, a amostra fica em contato com a superfície do cristal e os raios infravermelhos se refletem internamente através da mesma. O raio emitido tem absorção característica dos vários grupos químicos da superfície. O raio incidente penetra de 1000 a 10 000 Å na amostra, mas essa profundidade pode ser variada utilizando-se cristais com índices de refração diferentes. Quanto maior o índice de refração, menor é a profundidade de penetração, o que leva a uma maior sensibilidade. O uso de cristais com ângulos diferentes também permite a variação do alcance da técnica. Geralmente utilizam-se ângulos de 30, 45 ou 60°, porém obtém-se maior profundidade para

cristal com ângulo de 30°. Esta técnica é comumente conhecida como espectroscopia ATR ou MIR, que significa a combinação a espectroscopia de Iv, com a óptica da reflexão total atenuada.

Como principais vantagens do método podem ser relacionadas as seguintes, segundo FINK e CHITTUR (1986):

a) Rápida aquisição de dados, até 10 espectros por segundo. Dados podem ser obtidos quase que continuamente e os resultados podem ser apresentados num tempo real.
b) Capacidade de obtenção de dados de sistemas fisiológicos intactos em ambientes aquosos através da subtração do *background*.
c) Potencial para análise de multi-componentes de espectros complexos.
d) Observação de conformação macromolecular através da desconvolução de características espectrais.
e) Não requer preparação destrutiva da amostra e permite o estudo de sistemas moleculares sem rompê-los.
f) Sensibilidade à superfície.
g) Simplicidade do procedimento de medida.

Apesar das vantagens mencionadas anteriormente, na utilização da técnica por MIR o contato entre a amostra e o cristal especial denominado elemento de reflexão interna deve ser perfeito e a superfície do filme deve ser lisa, homogênea e regular para a obtenção de resultados satisfatórios, devido à grande dificuldade relacionada à reprodutibilidade do método.

Na figura 3.12 mostra-se um exemplo de espectro de PVC típico, segundo arquivos-base do Instituto de Química da UNICAMP.

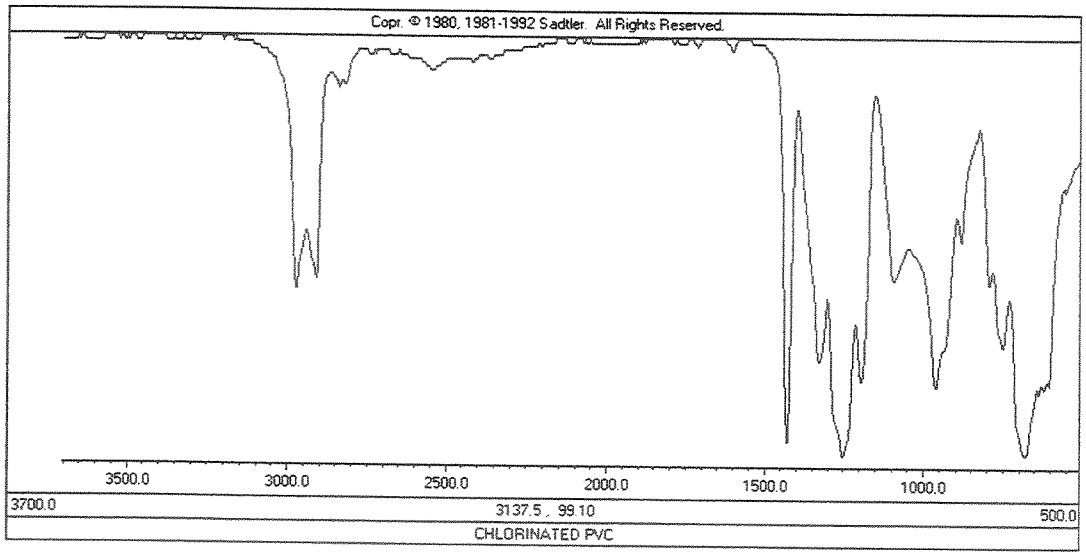


Figura 3.12 Espectro MIR de um poli(cloreto) de vinila (PVC) típico.

O resultado de uma caracterização por espectroscopia no infravermelho é expresso em um espectro de infravermelho. Nesta região do espectro de radiações eletromagnéticas, a absorção da energia, para comprimentos de ondas (ou freqüências) bem definidos, provoca vibrações e rotações moleculares dos componentes das moléculas orgânicas. Assim, os espectros de infravermelho são formados por linhas (picos e bandas) de absorção, cujas posições e intensidades correspondem à presença de ligações e grupamentos químicos específicos que formam a constituição e a composição química da amostra caracterizada. Para este ensaio foram somente analisadas amostras únicas para três condições diferentes de revestimentos.

As análises para a obtenção dos espectros de infravermelho das três amostras de PVC foram realizadas na Central Analítica - Instituto de Química/Unicamp e o equipamento utilizado foi NICOLET 52 FT-IR SPECTROMETER.

3.5. Avaliação da Hemocompatibilidade (in-vitro)

Para avaliar a hemocompatibilidade dos revestimentos praticados sobre os substratos de PVC, foram analisados através de exame de laboratório hemostático os seguintes parâmetros:

- Tempo de Protrombina (TP)
- Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)
- Tempo de Trombina (TT)
- Fibrinogênio
- Contagem de Plaquetas

Os exames foram realizados no laboratório de hemostasia do HEMOCAMP/UNICAMP, foi necessário coletar sangue fresco diretamente de um único doador voluntário. Nunca se utilizou sangue estocado em bolsa.

O protocolo realizado para os testes de hemocompatibilidade neste trabalho são:

1- Já cortados os segmentos de tubos com comprimentos dependendo do calibre selecionado, dependendo do volume de sangue a ser analisado, com número de réplicas n=3, estando o mesmo número de réplicas revestidas e não revestidas por diferentes métodos, tendo por último passo uma esterilização com óxido de etileno, e então procede-se o bloqueamento de uma das extremidades das amostras de tubo.
2- Coloca-se uma porcentagem de anticoagulante; para este caso foi utilizado o citrato.
3- Procede-se ao preenchimento dos tubos com sangue humano fresco retirado no momento, depois tampa-se os segmentos de tubos. Retira-se também uma amostra de sangue, que será o "controle", para isto determinam-se todos os parâmetros imediatamente.
4- Homogeneizar a 8 rpm as amostras de tubos agora bloqueadas pelos dois extremos.
5- Depois de transcorridas umas 2 horas de homegenização, fazer contagem de plaquetas.
6- Depois centrifugar o sangue a 3000 rpm por 15 minutos, para obter o plasma.
7- Determinar-se o TP, TTPA, TT e Fibrinogênio para as diferentes amostras de plasmas provenientes dos tubos revestidos e não revestidos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

8- Paralelamente, lava-se os segmentos de tubos com solução salina e são encaminhados para análise no microscópio.

O fibrinogênio, TP, TTPA e TT foram determinados fazendo uso do aparelho TROMBOLIZER-COMPACT XR, do fabricante Organon Teknika, também chamado de coagulometro. Ele é um aparelho Photo-óptico automatizado, na figura 3.13 é mostrado.

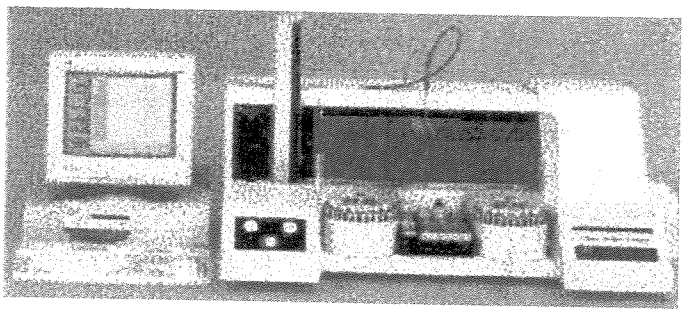


Figura 3.13 Coagulometro TROMBOLIZER-COMPACT XR, do centro HEMOCAMP / UNICAMP.

As contagens de plaquetas foram realizadas utilizando o equipamento ADVIA-120, com leitura à laser do fabricante BAYER. Antes de cada medição o sangue foi homogenizado através do Homogenizador de sangue PHOENIX AP-22, com velocidade de rotação de 8 rpm.

3.5.1. Tempo de Protrombina (TP)

Quando se realiza o teste tempo de protrombina (TP), esse vai medir o tempo necessário para um coágulo de fibrina se formar em uma amostra de plasma citratado após a adição de íons de cálcio e tromboplastina de tecido (fator III). Devido às diferenças de sensibilidade dos reagentes utilizados por diferentes fontes, a Organização Mundial de Saúde recomenda uma padronização utilizando-se uma tromboplastina de referência mundial, a partir da qual se calcula um índice de correção denominado ISI *(International Sensitivity Index)*. O INR *(International Normalized Ratio)* é a relação do TP do paciente com o TP do "pool" normal, elevado ao ISI.

Os objetivos deste teste são:

a) Fornecer uma avaliação global dos fatores de coagulação extrínsecos V, VII e X e de protrombina e fibrinogênio.
b) Monitorar a resposta para a terapia de anticoagulante oral.

Os valores de referência para sangue humano são: TP – 10 a 14 segundos (normal).

Um TP prolongado pode indicar doença hepática ou deficiência em fibrinogênio, protrombina ou fator VI, VII ou X (testes específicos podem identificar tais deficiências). Pode também indicar deficiência de vitamina K em pacientes que não estejam recebendo anti-coagulantes. Para pacientes em tratamento com anti-coagulantes orais, um TP com INR excedendo a 3,0 pode ser indicativo de deficiência de vitamina K.

Um TP prolongado pode resultar do uso de corticotropina, esteróides anabolisantes, resina colestiramina, heparina E.V. (com 5 horas de coleta) indometacina, ácido mefenâmico, metimazole, oxifembutazona para-aminosilato, fenilbutazona, fenitoína, propiltiouracil, quinidina, quinino, hormônios tireoideanos, vitamina A ou abuso de álcool.

O resultado de TP prolongado ou encurtado pode surgir após a ingestão de antibióticos, barbitúricos, hidroxizina, sulfonamidas, salicilatos (mais do que 1 g/dia prolonga o TP), óleos minerais ou clofibrato (LABES, 2000).

3.5.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

O teste de Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) é usado para avaliar todos os fatores de coagulação da via intrínseca – exceto plaquetas – por meio da medição do tempo necessário para formação de um coágulo de fibrina após a adição de emulsão de cálcio e fosfolipídio

a uma amostra de plasma. Um ativador, tal como o caolim, é usado para diminuir o tempo de coagulação.

Os objetivos deste teste são:

- Ajudar no rastreamento pré-operatório com relação às tendências de sangramento.
- Rastrear deficiências congênitas dos fatores de coagulação.
- Monitorar a terapia com heparina.

Os valores de referência de TTPA são: 25 a 36 segundos.

Um TTPA prolongado pode indicar uma deficiência de determinados fatores de coagulação do plasma, terapia de longo prazo com varfarina, a presença de heparina ou a presença de produtos de divisão da fibrina, fibrinolisinas ou anti-coagulantes circulantes que são anticorpos para fatores específicos de coagulação (LABES, 2000).

3.5.3. Tempo de Trombina (TT)

O teste de tempo de trombina (TT) plasmática mede a velocidade com que um coágulo se forma quando uma quantidade padrão de trombina bovina é adicionada a uma amostra de plasma pobre em plaquetas do paciente e uma amostra de controle normal de plasma pobre em plaquetas. Após a adição da trombina, o tempo de coagulação para cada amostra é registrado e comparado. Este teste permite uma estimativa rápida, porém imprecisa, dos níveis de fibrinogênio do plasma.

Os objetivos do teste são:

- Detectar deficiências ou defeitos de fibrinogênio.
- Auxiliar no diagnóstico de CID ou doença hepática.
- Monitorar a efetividade de tratamento com heparina ou agentes trombolíticos.

Valores de referência TT - 9 a 15 segundos.

Um tempo de trombina prolongado pode indicar uma terapia de heparina, doença hepática, coagulação intravascular disseminada , hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia. Os pacientes com tempo prolongado de trombina podem necessitar da medição dos níveis de fibrinogênio; em caso de suspeita de CID, é também necessário o teste para produtos de divisão de fibrina (LABES, 2000).

3.5.4 Fibrinogênio

O fibrinogênio (Fator I) origina-se no fígado e é convertido em fibrina durante a coagulação. Em razão da fibrina ser necessária para a formação de coágulos, a deficiência de fibrinogênio pode produzir desordens de sangramento de caráter leve a grave.

Este teste é usado para medir a quantidade de fibrinogênio em uma amostra de plasma sangüíneo. Observar que a deficiência de fibrinogênio pode também prolongar o TTPA, TP e tempo de trombina.

O objetivo do teste é auxiliar no diagnóstico de suspeita de desordens de sangramento ou coagulação causadas por anormalidades nos valores de fibrinogênio.

Valores de referência: 150 - 370 mg/dl (1,5 a 3,7 g/l) (normal).

Níveis deprimidos de fibrinogênio podem indicar a fibrinogenemia congênita, hipofibrinogenemia, CID, fibrinólise, doença hepática grave, câncer metastático ou lesões da medula óssea. Trauma ou complicações obstétricas podem também causar níveis baixos.

Os níveis de fibrinogênio abaixo de 100 mg/dl impedem uma interpretação dos testes de coagulação que tenham um coágulo de fibrina como um ponto final.

Os níveis elevados podem ocorrer durante o terceiro trimestre da gravidez e em mulheres que tomam contraceptivos orais. O fibrinogênio é um regente de fase aguda e podem ocorrer níveis altos em pacientes com infecção aguda, desordens de colágeno, neoplasias, nefrose ou hepatite.

Pesquisas recentes ressaltam a importância da influência da taxa de fibrinogênio na aceleração da formação de tombos. Uma taxa elevada altera para mais a hipercolesterolemia, além de exercer influência na hiperagregabilidade plaquetária (LABES, 2000).

3.5.5 Contagem de Plaquetas

As plaquetas ou trombócitos promovem a coagulação, ou seja, a formação de um coágulo hemostático em locais de comprometimento vascular.

A contagem de plaquetas é o mais importante teste de rastreamento da função plaquetária. As contagens precisas são vitais.

Os objetivos do teste são:

- Avaliar a produção ou utilização de plaquetas.
- Avaliar os efeitos da quimioterapia ou radioterapia na produção de plaquetas.
- Diagnosticar ou monitorar trombocitose ou trombocipenia.
- Confirmar uma estimativa visual da quantidade e morfologia da plaqueta a partir de um filme sanguíneo colorido.

Valores de referência: método automatizado, com eventual estudo morfológico com esfregaços corados, as contagens normais de plaquetas variam entre 130.000 a 370.000/ml.

Uma contagem diminuída de plaquetas (trombocitopenia) pode resultar de medula óssea aplástica ou hipoplástica; uma doença infiltrativa de medula óssea como, por exemplo, carcinoma ou leucemia; hipoplasia megacariocítica; trombopoiese infecciosa proveniente de deficiência de ácido fólico ou vitamina B(12); acúmulo de plaquetas em um baço aumentado; destruição aumentada de plaquetas devido a drogas ou desordens imunes; coagulação intravascular disseminada; síndrome de Bernard-Soulier; ou lesões mecânicas às plaquetas.

Uma contagem aumentada de plaquetas (trombocitose) pode resultar de hemorragias, desordens infecciosas, câncer, anemia por deficiência de ferro, cirurgia recente, gravidez, ou esplenectomia e desordens inflamatórias. Em tais casos, a contagem de plaquetas retorna ao normal após o paciente recupera-se da desordem primária. Todavia, a contagem permanece elevada em trombocitomia primária, mielofibrose com metaplasia mielóide, policitemia vera e leucemia mielóide crônica. Em tais desordens, as plaquetas podem estar disfuncionais, resultando em sangramento (ALPHA, 2000).

3.6 Avaliação do Envelhecimento no Revestimento

Na literatura mencionam-se normas e procedimentos para avaliar o envelhecimento de materiais poliméricos, inclusive do PVC, mas não foi possível encontrar uma norma ou técnica que caracteriza este processo para tratamentos superficiais com substratos poliméricos. Por isso a proposta neste trabalho será analisar o envelhecimento dos revestimentos através de uma análise superficial dos substratos.

Como se sabe, o PVC é relativamente instável sob a ação de temperaturas elevadas ou de luz ultravioleta. Para temperaturas superiores a 160°C apresenta perda inicial de ácido clorídrico e formação de polienos (seqüência de duplas ligações conjugadas), depois as seqüências poliênicas são rapidamente oxidadas por reações em cadeia via radicais livres. Seguidamente os peróxidos formados se decompõem rapidamente e os radicais gerados no decorrer da oxidação atacam os meros intactos e iniciam uma perda adicional de ácido clorídrico, segundo AGNELLI (2001). Para

este trabalho, as temperaturas não ultrapassam os 60°C, questão importante para não interferir na estabilidade do revestimento.

Os ensaios de envelhecimento se baseiam na causa e efeito, desde que um material submeta-se a este tipo de ensaio, obviamente o efeito esperado nada mais será que a sua degradação. Entretanto, a causa não é tão simples de se determinar, pois está ligada a vários fatores de meio ambiente, requerendo que o ensaio tenha uma preparação e planejamento adequados, inerentes às suas características intrínsecas. Assim originam-se os ensaios de "Envelhecimento Natural", que avaliam as causas e efeitos sofridos por um material ou grupo de materiais expostos diretamente ao meio natural de utilização. Já os ensaios acelerados ou de "Envelhecimento Artificial" reproduzem em laboratório o aspecto sinergístico da atmosfera de forma que se possa correlacioná-lo com as condições encontradas no meio natural.

Para este trabalho, as amostras revestidas serão analisadas através do envelhecimento natural, segundo ROSE (1996). Os elementos do meio mais importantes para este teste são: a luz ultravioleta (U. V.) da radiação solar, temperatura, umidade, vento, poeira e poluentes. Destes elementos climáticos, muitos serão nulos para este estudo, já que as amostras analisadas estarão expostas às seguintes condições:

a) Temperaturas entre 22 –32 °C
b) Baixa umidade
c) Poeira e poluentes 0%, as amostras foram embaladas e seladas hermeticamente
d) Baixa radiação solar, condições de laboratório

As amostras de segmentos de tubos revestidas com solução de heparina–cloreto de benzalcônio, esterilizadas e embaladas foram mantidas por 8 meses nas condições anteriores, logo depois foram analisadas via microscopia óptica de varredura (MEV).

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussões

Introdução

Na análise de resultados apresentam-se figuras e tabelas comparativas para cada umas das caracterizações, assim como gráficos que esclarecem cada questão tratada e fundamentalmente a variação de cada umas das propriedades com o tipo de revestimento ou calibre de tubo usado.

A seguir, mostram-se e esclarecem-se algumas das predições que teoricamente alguns pesquisadores da área mencionam e outros contradizem. Analisam-se resultados dos ensaios experimentais tais como: análise das superfícies via microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, rugosidade superficial, ângulo de contato, espectroscopia de infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR), tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de trombina (TT), fibrinogênio, contagem de plaquetas e envelhecimento natural dos revestimentos.

Encerrando este capítulo, encontra-se um item contendo discussões finais.

4.2 Caracterização Física dos Revestimentos

4.2.1 Caracterização Superficial

Como se explicou no capítulo anterior, com respeito à caracterização dos revestimentos, é muito importante a topografia superficial e o aspecto geral dos revestimentos, questão esta que será apresentada a seguir, detalhando os resultados obtidos.

4.2.1.1 Microscopia Óptica (MO)

O objetivo fundamental deste ensaio é observar a superfície de cada uns dos calibres de tubos revestidos e não revestidos, identificar a existência de alguma orientação de ranhuras superficiais e observar a diferença do substrato revestido e não revestido.

Na figura 4.1, observa-se a superfície dos diferentes calibres de tubo-PVC não revestidos [tubo 3/16" (4,75mm), tubo ¼" (6,35mm), tubo 3/8" (9,52mm) e tubo ½" (12,7mm)]. Mostra-se a orientação do material formando linhas paralelas, para o aumento indicado em cada micrografia.

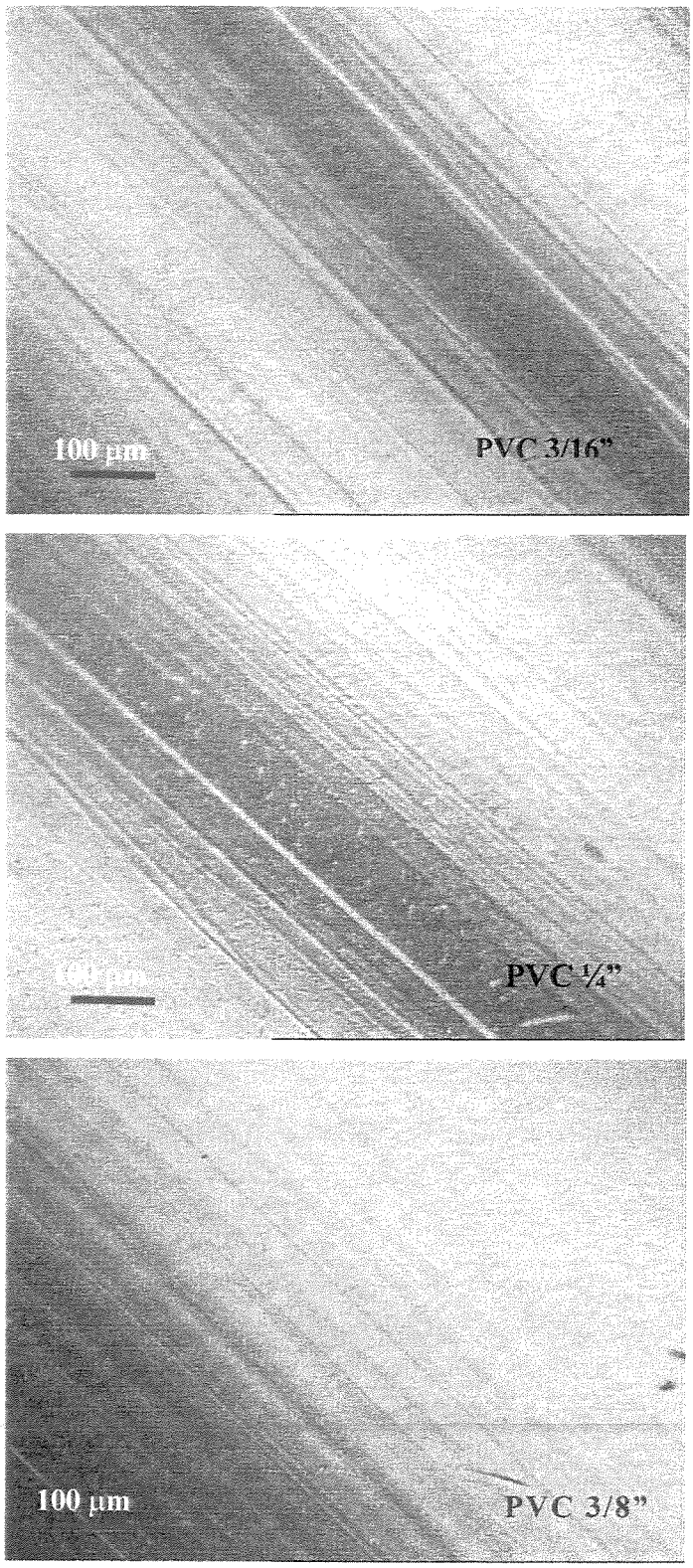


Figura 4.1.Micrografias superficiais dos tubos de PVC não revestidos de calibres diferentes.

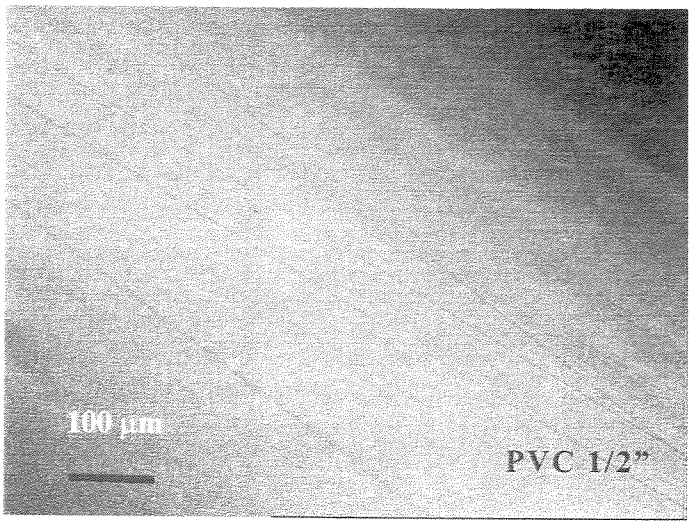


Figura 4.1. Micrografias superficiais dos tubos de PVC não revestidos de calibres diferentes. (continuação)

As micrografias foram tomadas de diferentes regiões dos tubos, cortadas em forma longitudinal. É difícil afirmar que todos os calibres analisados apresentam exatamente esta aparência. Muitas vezes encontram-se ranhuras muito profundas em outros lotes fornecidos, mas para este trabalho essa variável foi bloqueada e as análises foram feitas utilizando o mesmo lote.

Observa-se também na figura 4.1 como as ranhuras direcionadas longitudinalmente desaparecem à medida que aumenta o diâmetro do tubo. Esta afirmação somente será complementada com a determinação da rugosidade dos calibres posteriormente.

Na figura 4.2 mostra-se uma comparação entre as micrografias do tubo 3/8" (9,52mm) para superfícies revestidas e não revestidas. Nota-se que não existe muita diferença entre o substrato revestido e não revestido para este nível de aumento. Para todos os calibres o comportamento foi similar, não foi possível apreciar uma diferença marcante. Por isso somente foi apresentada a micrografia de um calibre.

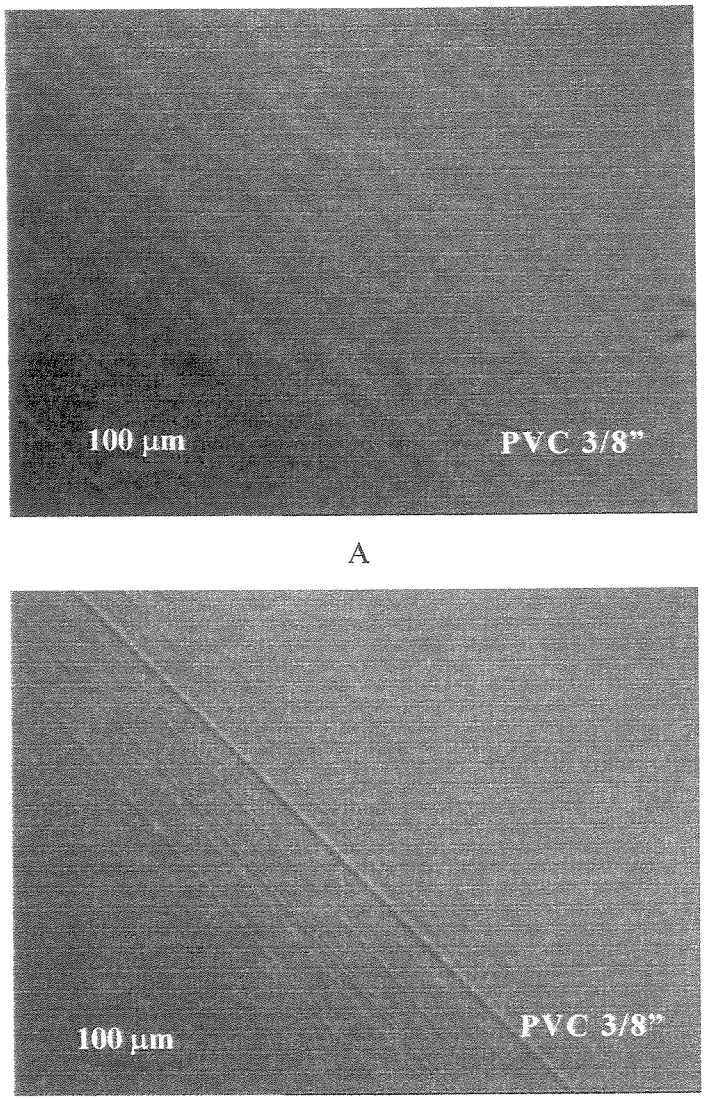


Figura 4.2 Micrografias superficiais MO do calibre PVC 3/8" (9,52 mm): A) PVC não revestido; B) PVC revestido com heparina-cloreto de Benzalcônio.

É importante mencionar a dificuldade deste tipo de ensaio. Em primeiro lugar, para focalizar a superfície foram necessários vários dispositivos e iluminação adicional; outra dificuldade foi que alguns substratos eram curvos pela geometria do tubo, o que proporcionava pontos de desfoque na micrografia. E, por último, a transparência das amostras prejudicava a utilização de aumentos superiores, já que não existe reflexão da luz dificultando a análise superficial das amostras.

UNICAMP

Conclui-se neste ensaio que os diferentes calibres de PVC analisados, quanto à análise superficial via MO, apresentam rasgos de orientação das ranhuras deixadas pelo processo de fabricação, no sentido da extrusão. Quando são revestidos os substratos, são mantidos para este nível de aumento características similares, ou seja, talvez o revestimento não seja suficientemente espesso para retificar as ranhuras da superfície sem revestimento. Comprova-se também que a superfície não revestida não é totalmente lisa.

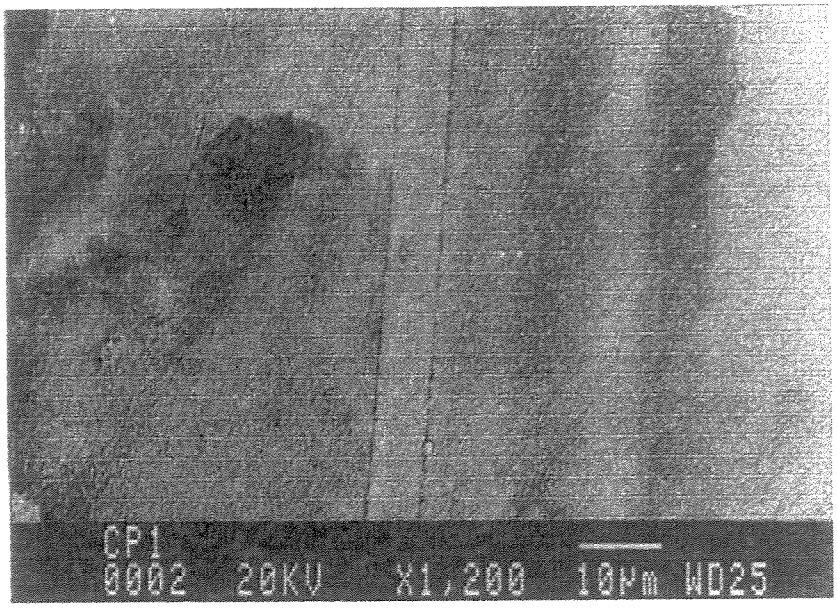
4.2.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização superficial dos substratos dos tubos de PVC e dos revestimentos foi aprofundada através da utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Com o MEV foi possível chegar a aumentos muitos superiores e realizar microanálise em determinadas zonas. Para efetuar a análise, as amostras são fixadas em uma base de alumínio e revestidas por um filme fino condutor. Neste caso utilizou-se ouro, depois são colocadas no MEV.

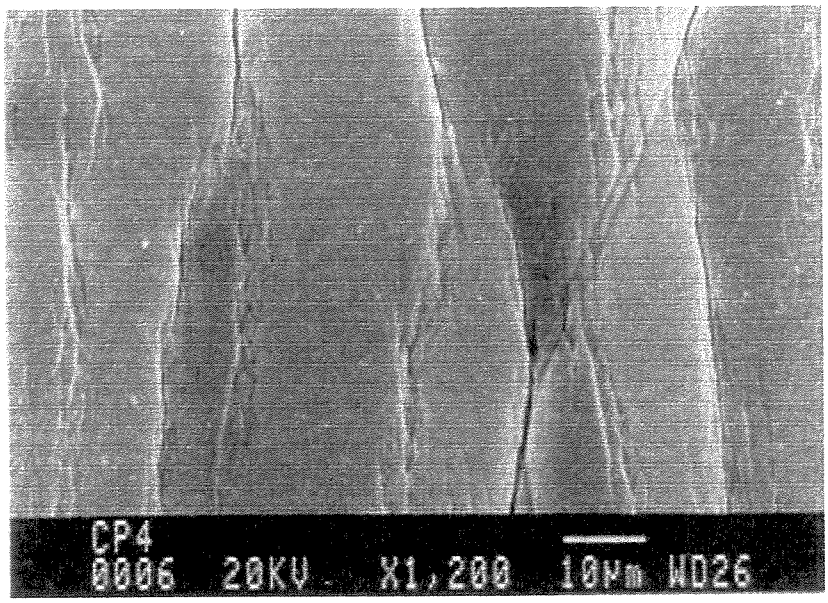
Na continuação apresentam-se os resultados das análises para cada amostra revestida e não revestida, além das micrografias dos substratos depois do teste de hemocompatibilidade, depois de estar em contato com sangue humano fresco.

Micrografias (MEV) dos tubos revestidos pelo método I (Revestimento com Heparina)

Os resultados das micrografias dos substratos analisados via MEV foram numerosos, devido à grande variedade de substratos tratados. Seguidamente apresenta-se exemplares mais comuns das superfícies dos substratos de PVC não revestidos e revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio, figura 4.3.



A



B

Figura 4.3 Micrografias superficiais MEV, do substrato de PVC: A) PVC não revestido; B) PVC revestido.

Observa-se na figura 4.3 a diferença entre a superfície de PVC revestida com heparina-cloreto de benzalcônio e não revestida. Nas micrografias pode-se notar que o revestimento forma uma topografia diferente quando reveste o substrato, questão de difícil apreciação via

microscopia óptica. Muitas fendas aparecem quando se efetua o revestimento. Isso pode ser provocado pela maneira de revestir o tubo com a solução de heparina-cloreto de benzalcônio: os substratos na maioria das vezes eram colocados verticalmente dentro da estufa no momento da secagem, podendo surgir as microfendas observadas, não visíveis na microscopia óptica.

Para ter certeza de que a superfície foi revestida completamente e que as fendas formadas nos revestimentos também contêm solução de revestimento, foi realizada uma microanálise em pontos dentro e fora da fenda (matriz), como se observa na figura 4.4.

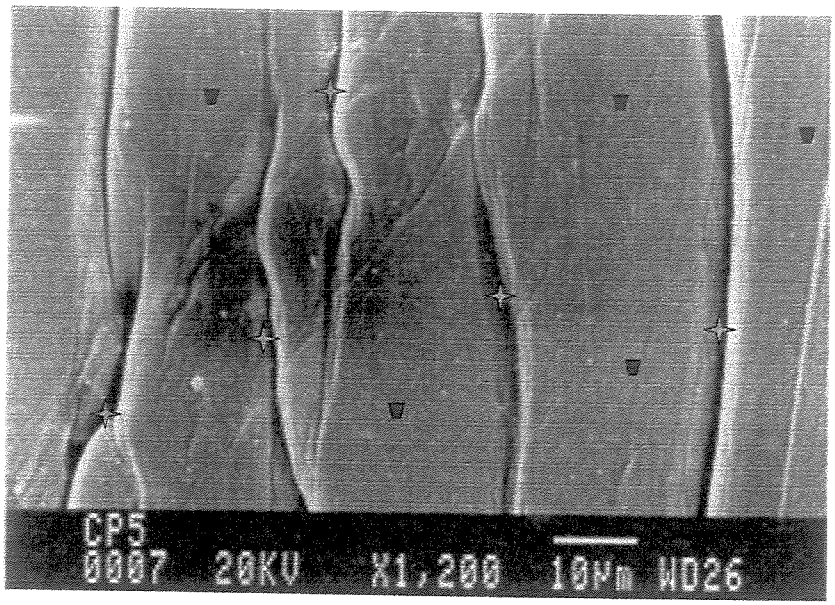


Figura 4.4 Micrografia do substrato revestido de PVC via MEV, com os pontos do microanálise.1) ✦ Fenda --; 2) ▼ Matriz.

Os resultados do microanálise são apresentados na tabela 4.1 (média de 5 pontos para cada região de fenda e matriz). Os valores obtidos não caracterizam a composição do revestimento nos diferentes pontos, resultando em todos os casos valores que identificam o substrato de PVC. A explicação destes resultados é conseqüência da espessura do revestimento, sendo muito fino para a microanálise. Serão necessários testes adicionais para afirmar que o revestimento está presente em todas as micro-superfícies das amostras. Isto será verificado no teste de hemocompatibilidade e logo depois análise via MEV.

Tabela 4.1 Resultados da microanálise feita no revestimento Heparina–Cloreto de Benzalcônio

ANÁLISE PONTUAL DO REVESTIMENTO HEPARINA-CLORETO DE BENZALCÔNIO		
POSIÇÃO	% wt Cl	% wt S
❶ Fenda	100 %	0 %
❷ Matriz	100 %	0 %

OBS: As porcentagens são relativas a Cl (substrato) / S (revestimento); não são considerados outros elementos presentes. O elemento C não foi analisado por se tratar de elemento leve, não detectável nas condições de ensaio disponíveis.

A incógnita agora seria a espessura do revestimento de heparina-cloreto de benzalcônio. Para isto realizam-se cortes transversais de amostras revestidas e analisam-se com aumentos maiores (x 7 000). O resultado pode observar-se na figura 4.5.

O revestimento apresenta uma espessura aproximada de 1 μm regular em toda a extensão da superfície, formando uma interface definida com o substrato de PVC, como se mostra na figura 4.5.

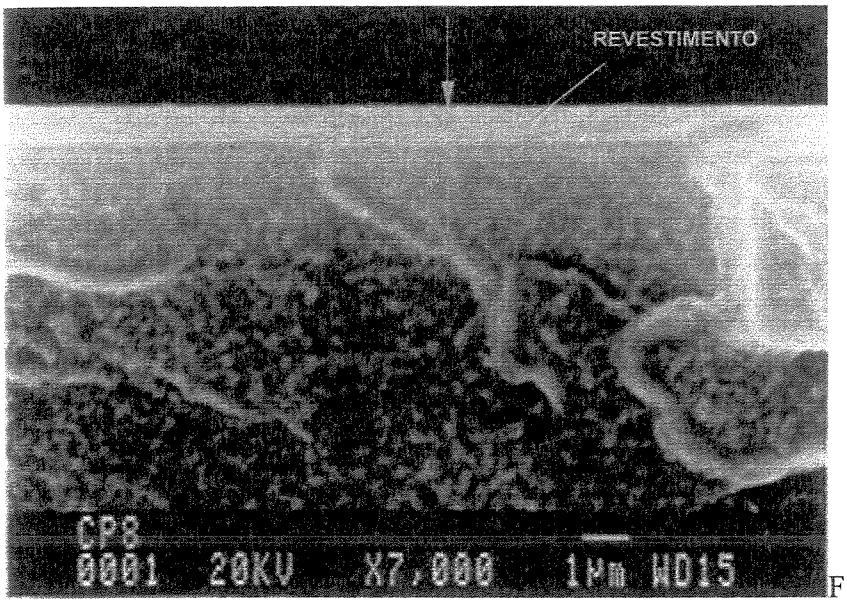


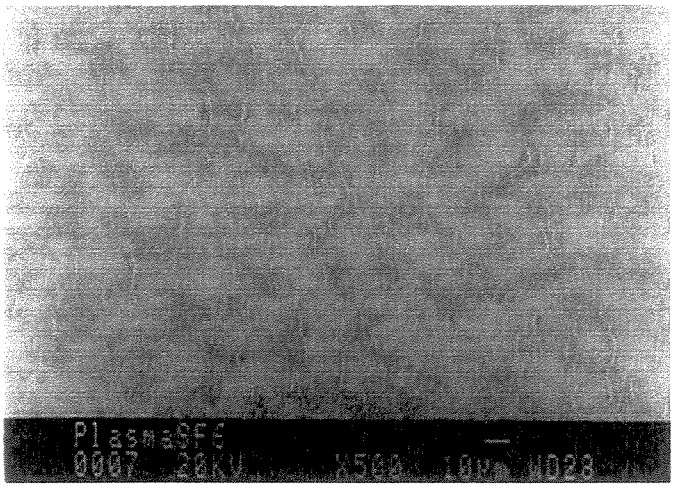
Figura 4.5 Corte transversal do tubo de PVC revestidos, em que mostra a espessura do revestimento de heparina, aproximadamente 1μm.

Micrografias (MEV) dos Tubos Revestidos pelo Método II (Revestimento com Plasma)

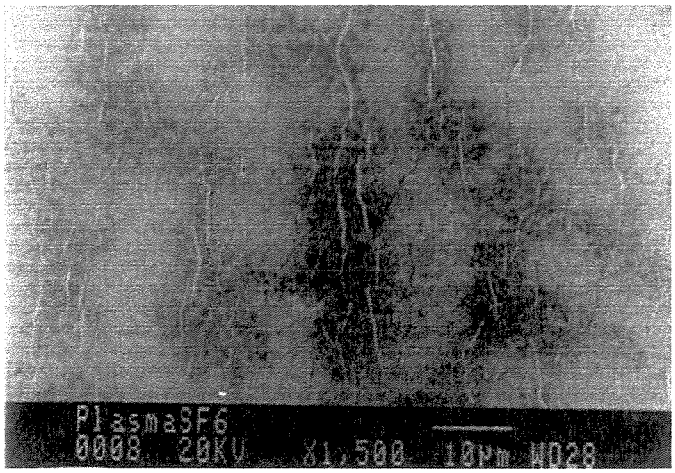
Das micrografias dos substratos revestidos pelo método II (revestimento por plasma) foram selecionadas algumas e na continuação, mostra-se o revestimento que apresentou melhores propriedades.

Dentro dos revestimentos realizados, em que vários gases foram injetados no reator de plasma, o revestimento com hexafluoreto de enxofre (SF_6) foi o mais representativo. Os outros foram também observados via MEV, mas não serão apresentados a seguir, por apresentarem propriedades inferiores ao SF_6.

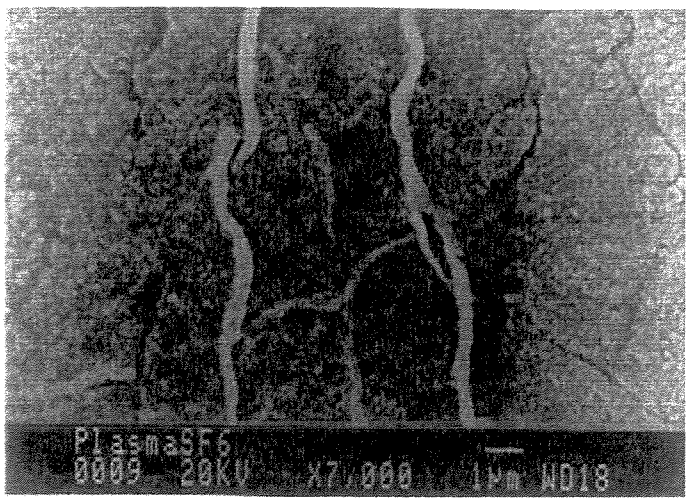
A figura 4.6 mostra as micrografias de vários aumentos do revestimento com SF_6, ou seja, aspecto superficial do filme fino depositado sobre o substrato de PVC.



A



B



C

Figura 4.6 Micrografias realizadas pelo MEV da superfície tratada com plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre). A) Aumento de x500 B) Aumento de x1500 C) Aumento de x7000.

Como se observa na figura 4.6, o filme depositado sobre a superfície também apresentou várias micro-placas uniformemente distribuídas, diferentes das ranhuras do substrato. Observa-se na micrografia de maior aumento detalhes de camadas superpostas próprio do procedimento de deposição de filmes finos através de plasmas.

Micrografias (MEV) dos Tubos Revestidos pelo Método I (Revestimento com Heparina), depois de estar 2,5 horas em contato com sangue humano

Os tubos revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio foram esterilizados e colocados em contato com sangue humano por 2,5 horas. Os tubos analisados seguiram o protocolo utilizado no teste de hemocompatibilidade, que no capítulo anterior se descreve.

As amostras de tubos bloqueadas nos extremos e preenchidas com sangue humano fresco foram homogeneizadas durante duas horas a 8 rpm, no equipamento homogeneizador PHOENIX-AP 22 do laboratório do Hemocentro-Unicamp. Seguidamente retira-se o sangue para realizar os testes de hemocompatibilidade e os tubos são lavados, secos e encaminhados para o MEV.

Os resultados das micrografias pelo MEV são mostrados na figura 4.7. Nesta figura, observa-se uma grande diferença entre os tubos revestidos (coluna direita) e não revestidos (coluna da esquerda). Verifica-se que para os substratos não revestidos existe uma adsorção apreciável de plaquetas e células em várias regiões dos tubos. Já para os tubos revestidos a adsorção de plaquetas é menor, em que podem ser observadas as ranhuras do substrato, já que o revestimento foi liberado ao sangue em contato durante as 2,5 horas, evitando uma a adsorção de componentes celulares.

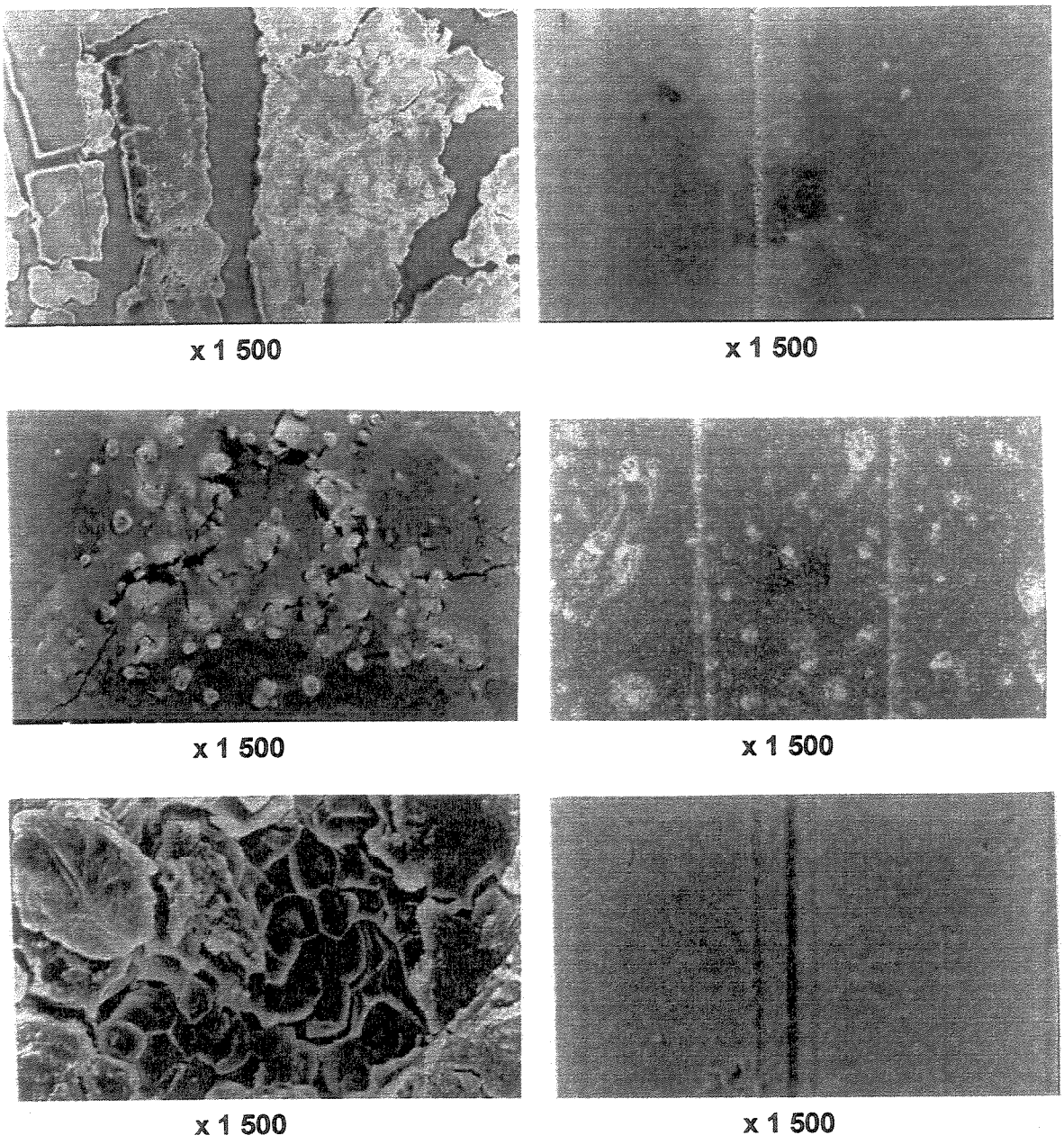


Figura 4.7 Microestruturas obtidas pelo MEV dos tubos de PVC em várias regiões não revestidos (coluna da esquerda) e tubos revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio (coluna da direita), depois do contato com sangue por 2,5 horas.

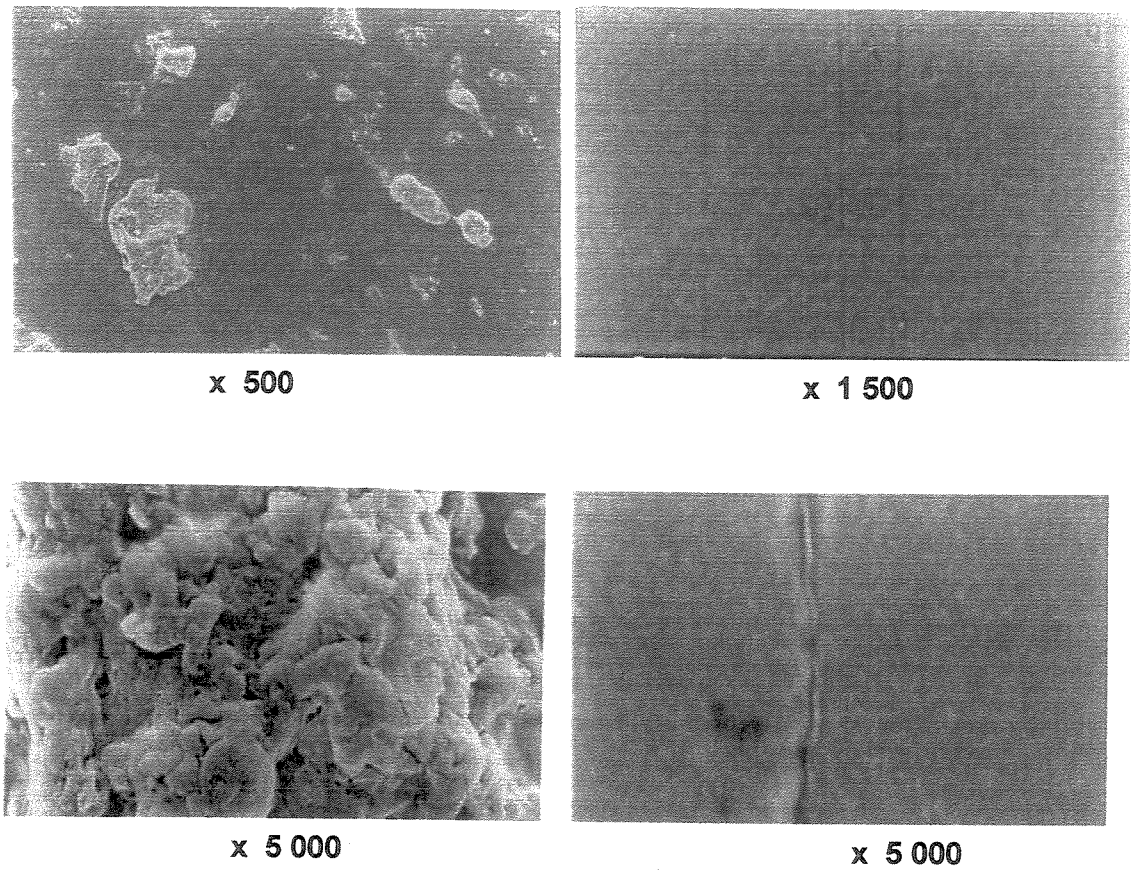


Figura 4.7 (continuação) Micrografias obtidas pelo MEV dos tubos de PVC em várias regiões não revestidas (coluna da esquerda) e tubos revestidos com heparina-cloreto de benzalcônio (coluna da direita), depois do contato com sangue por 2,5 horas.

Em estudo mais profundo, verificou-se que algumas células eram encontradas nas microfendas do revestimento em poucos corpos de prova. Isso se deve muitas vezes à qualidade de uniformidade do revestimento, pode ser que em algumas microfenda não exista presença do revestimento, provocando a exposição do substrato e a imediata adsorção de proteínas e logo depois a adsorção de elementos celulares. Isto foi confirmado no Departamento de Biologia celular da Unicamp, segundo MOREIRA et al. (2000).

Em alguns substratos de PVC não revestidos em contato com o sangue observa-se camada homogênea de proteínas e componentes celulares, que foram primeiramente adsorvidas pelo PVC e logo depois se estabilizou, formando um revestimento com características parecidas ao

endotélio. Este fato chamou a atenção a muitos pesquisadores da área, definindo esta camada como "neo-íntima". À continuação apresentam-se na figura 4.8 algumas micrografias que sugerem que sejam característicos da neo-íntima.

As micrografias obtidas pelo MEV mostram a suposta neo-intima formada sobre os substratos de PVC não revestidos.

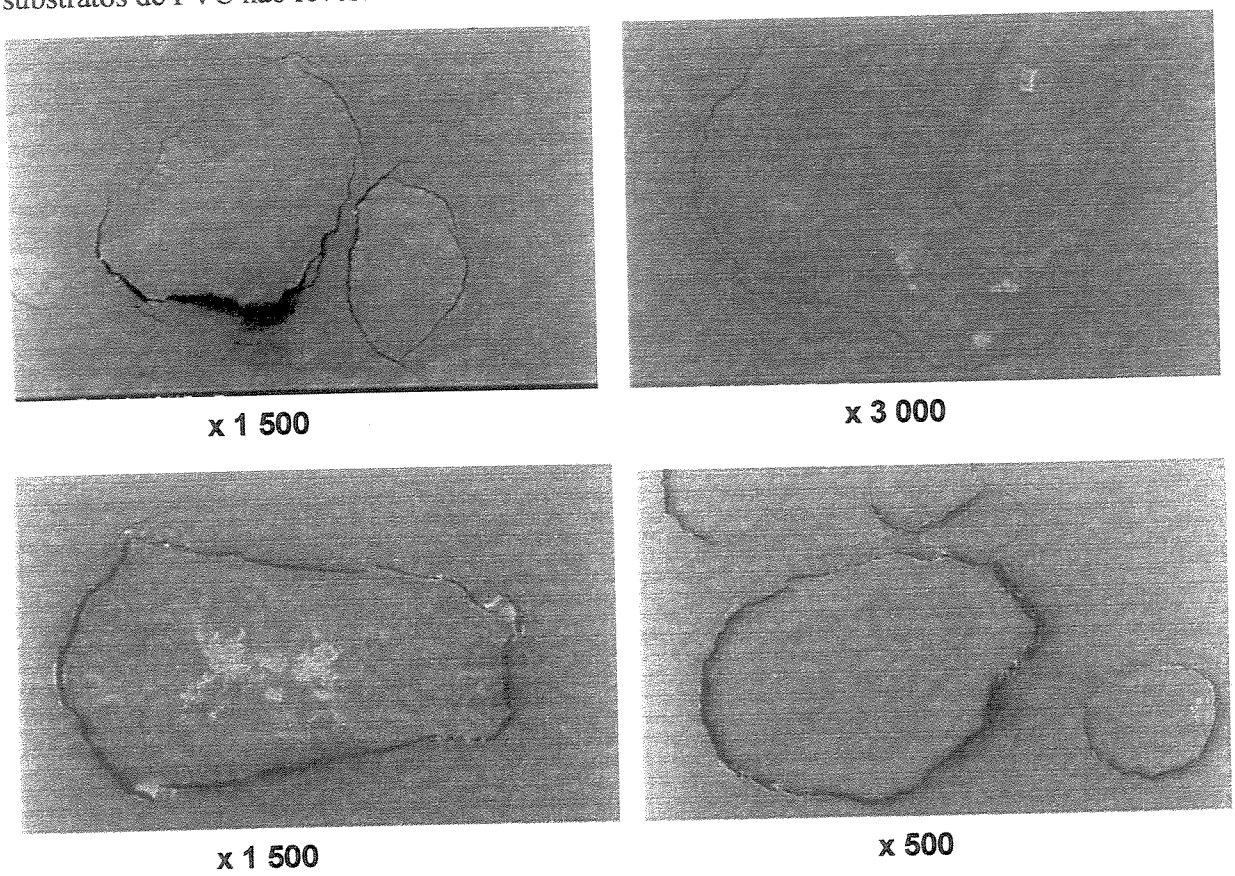


Figura 4.8 Micrografias obtidas pelo MEV dos tubos de PVC não revestidos, depois do contato com sangue por 2,5 horas. Características da neo-íntima.

Micrografias (MEV) dos Tubos Revestidos pelo Método II (Revestimento com Plasma), depois de estar 2,5 horas em contato com sangue humano

Na figura 4.9, são apresentadas as micrografias correspondentes às amostras tratadas por plasma de SF_6 depois de estar por 2,5 horas em contato com sangue humano fresco. O

procedimento foi o mesmo que o procedimento anterior analisado para o método I de revestimento.

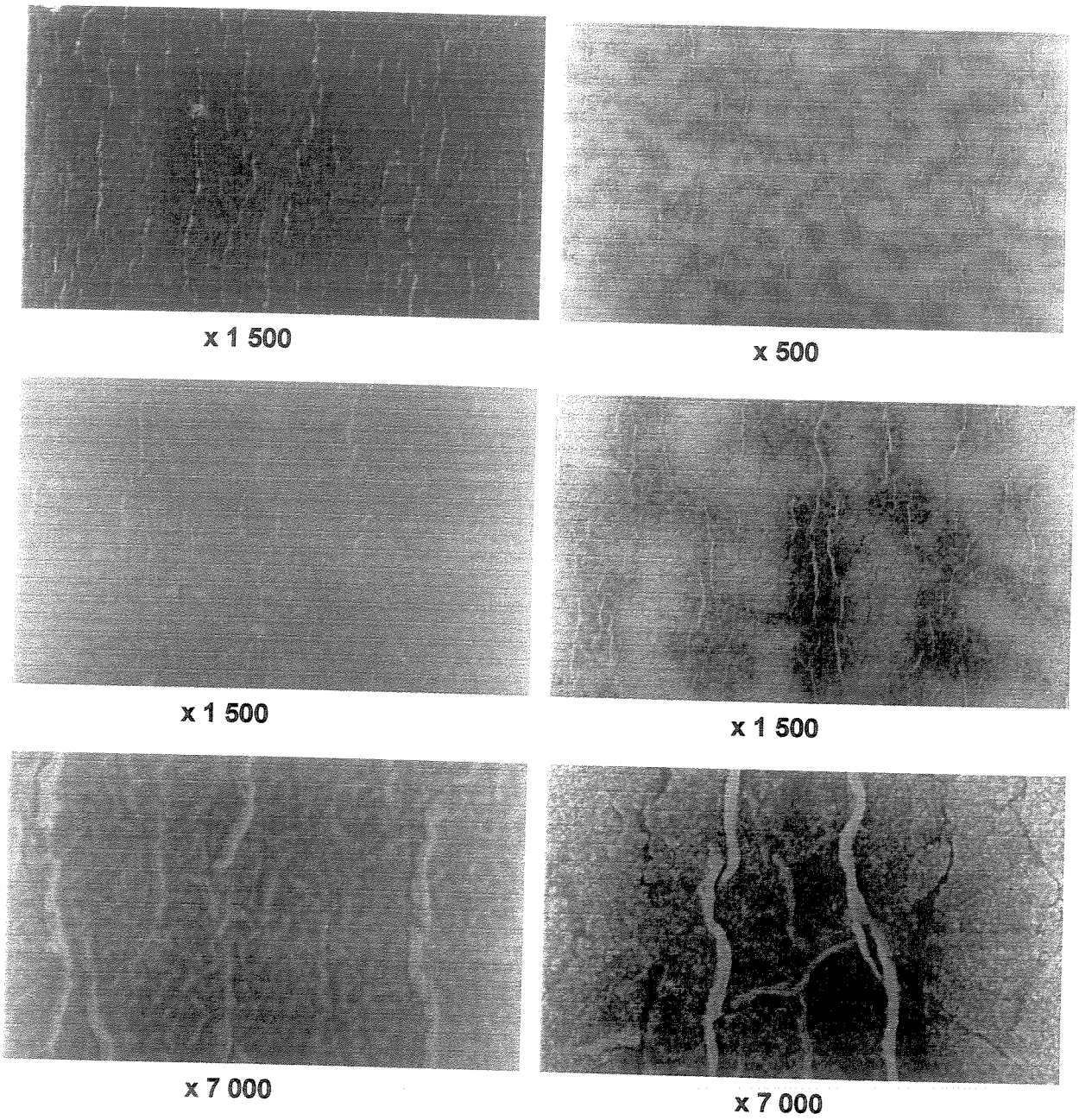


Figura 4.9 Micrografia obtida pelo MEV do revestimento com plasma de SF_6 sobre substratos de PVC, depois de 2,5 horas em contato com sangue humano. Revestimentos em contato com sangue (coluna da esquerda) e revestimentos sem contacto com sangue (coluna da direita).

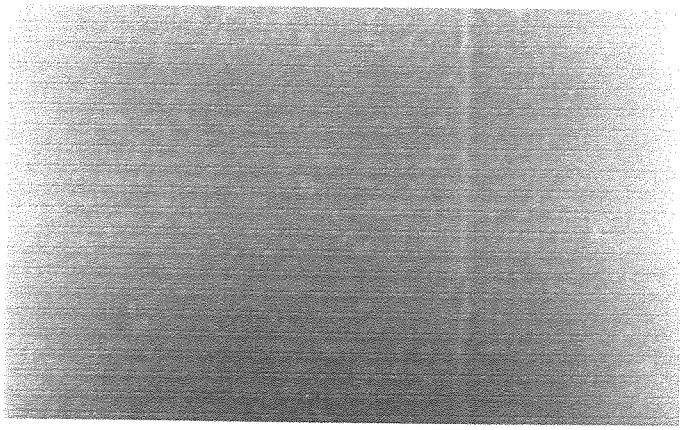
Na figura 4.9, observa-se que praticamente não ocorre adesão de plaquetas ou adsorção de alguns componentes sanguíneos, exibindo aproximadamente a mesma aparência sem estar em contato com o sangue. Em poucas regiões do revestimento observam-se pequenos pontos, que podem ser minúsculas partes de algum componente do sangue, não verificado neste trabalho.

O comportamento deste revestimento avaliado via MEV apresenta propriedades interessantes, já que não são observadas formações de trombos.

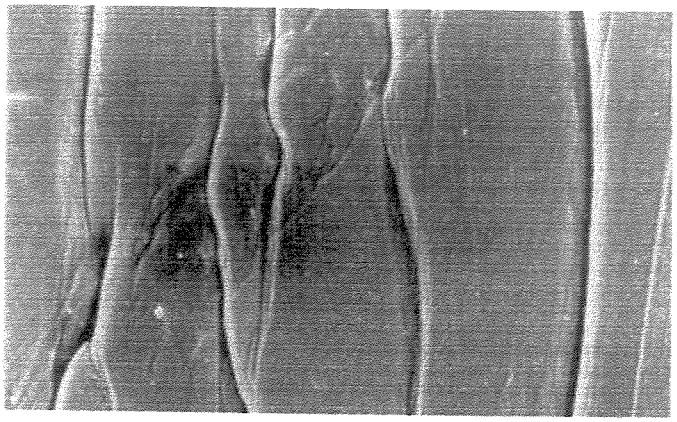
Comparação das Micrografias dos Tubos Revestidos pelo Método I (Revestimento com Heparina) e pelo Método II (Revestimento com Plasma), depois de estar 2,5 horas em contato com sangue humano

A respeito das micrografias obtidas, dos três grupos estudados, figuras 4.10, de maneira geral podem ser feitas algumas considerações, dentre as quais se destacam:

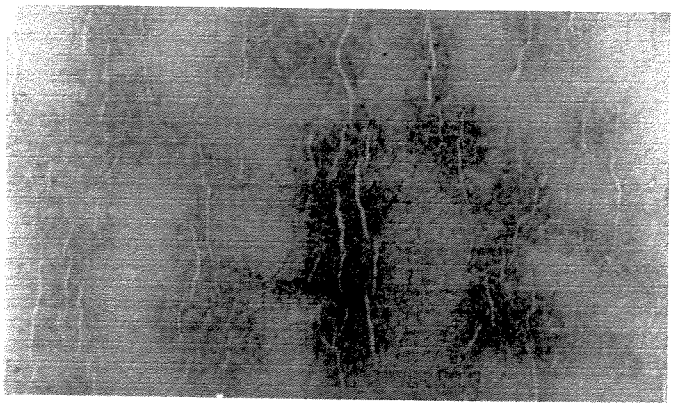
a) Os revestimentos obtidos pelo método I e II apresentaram topografias diferentes comparados com os substratos de PVC nas diferentes regiões da superfície interna dos tubos.
b) A microanálise praticada nos revestimentos com heparina, nas fendas deixadas pelo revestimento e na matriz da superfície revestida não teve diferença por ser muito fino o revestimento, em que a profundidade de penetração do feixe de elétrons é maior, registrando somente características do substrato.
c) Para ambos métodos de revestimentos, depois de estar em contato com o sangue 2,5 horas, observou-se uma diminuição na formação de trombos e adesão de plaquetas. No caso de tubos não revestidos a quantidade de trombos registrada na superfície foi muito significativa, chegando a formar em alguns casos uma neo-intima, com os próprios componentes do sangue, que segundo alguns pesquisadores apresenta características similares ao endotélio.
d) O revestimento com SF_6 não apresentou trombos na superfície e a adesão de plaquetas foi quase zero.



PVC não Revestido (x 1 500)



PVC Revestido Heparina-Cloreto de Benzalcônio. (x 1 500)



PVC Revestido com Plasma SF_6 (x1 500)

Figura 4.10 Micrografias (MEV) dos diferentes grupos de superfícies analisados sem estar em contato com o sangue.

4.2.2 Rugosidade Superficial

Os resultados da rugosidade superficial interna dos tubos de PVC neste trabalho constituem uma caracterização importante para trabalhos futuros. Na literatura, até o momento, não foi encontrada análise de rugosidades para superfícies internas em tubos de PVC. Muitos autores comentam e vinculam a rugosidade com hemocompatibilidade, mas tudo não passa de suposições teóricas.

Como foi dito no capítulo anterior, as rugosidades superficiais foram medidas nas superfícies internas de quatro calibres de PVC, contendo três amostras para cada calibres de tubo não revestidos: 3/16" (4,75mm), ¼" (6,35mm), 3/8" (9,52mm) e ½" (12,7mm). Foram realizadas as medições em dois sentidos: sentido longitudinal e transversal ao comprimento do tubo.

Os parâmetros de rugosidade medidos apresentam as médias dos valores. São eles: Rugosidade Máxima (Rmax); Rugosidade Média aritmética (Rz); Rugosidade Média do Terceiro Pico e Vale (R_{3Z}); Rugosidade Média (Ra) e Rugosidade Total (Rt) para tubos não revestidos.

As tabelas 4.2 – 4.5 apresentam as médias dos resultados de rugosidades para cada calibre de tubo especificado.

Tabela 4.2 Resultados dos parâmetros de rugosidades para o Tubo 3/16" (4,75 mm)

TUBOS DE PVC MAIS UTILIZADOS NA CEC		
Parâmetros de Rugosidade	Tubo 3/16" (4,75 mm)	
	Não Revestido	
	Rug. Long. (µm)	Rug. Transv. (µm)
Rmax	0,73± 0,31	0,91 ± 0,94
Rz	0,36 ± 0,08	0,38 ± 0,31
R_{3Z}	0,18 ± 0,06	0,17 ± 0,21
Ra	0,05± 0,01	0,05± 0,03
Rt	0,75 ± 032	0,91± 0,93

Tabela 4.3 Resultados dos parâmetros de rugosidades para o Tubo 1/4" (6,35 mm)

TUBOS DE PVC MAIS UTILIZADOS NA CEC		
Parâmetros de Rugosidade	Tubos 1/4" (6,35 mm)	
	Não Revestido	
	Rug. Long. (μm)	Rug. Transv. (μm)
Rmax	0,78 ± 0,87	0,41± 0,22
Rz	0,33 ± 0,21	0,25 ± 0,10
RPM (R3z)	0,15 ± 0,12	0,09 ± 0,03
Ra	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Rt	0,79 ± 0,86	0,42 ± 0,22

Tabela 4.4 Resultados dos parâmetros de rugosidades para o Tubo 3/8" (9,52 mm)

TUBOS DE PVC MAIS UTILIZADOS NA CEC		
Parâmetros de Rugosidade	Tubos 3/8" (9,52 mm)	
	Não Revestido	
	Rug. Long. (μm)	Rug. Transv. (μm)
Rmax	0,71 ± 0,20	0,36 ± 0,22
Rz	0,45 ± 0,10	0,21 ± 0,10
RPM (R3z)	0,17 ± 0,05	0,08 ± 0,04
Ra	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Rt	0,75 ± 0,20	0,38 ± 0,22

Tabela 4.5 Resultados dos parâmetros de rugosidades para o Tubo 1/2" (12,7 mm)

TUBOS DE PVC MAIS UTILIZADOS NA CEC		
Parâmetros de Rugosidade	Tubos 1/2" (12,7 mm)	
	Não Revestido	
	Rug. Long. (μm)	Rug. Transv. (μm)
Rmax	1,06 ± 0,18	1,21 ± 1,09
Rz	0,73 ± 0,13	0,57 ± 0,36
RPM (R3z)	0,30 ± 0,05	0,26 ± 0,21
Ra	0,12 ± 0,02	0,08 ± 0,04
Rt	1,11 ± 0,22	1,26 ± 1,07

Para um melhor entendimento dos resultados, apresenta-se, na continuação, gráficos que comparam cada parâmetro medido nos diferentes calibres de tubos de PVC.

As figuras 4.11 e 4.12 representam o comportamento do parâmetro Rmax, para os diferentes calibres de tubos de PVC não revestidos, medidos no sentido longitudinal e transversal. Como se pode observar, o comportamento de Rmax no sentido longitudinal não apresenta diferença significativa em três calibres; somente o tubo ½" (12,7 mm) registra um aumento de 43% em comparação à média dos restantes, demonstrando que o maior valor das rugosidades

parciais (Zi), ou seja, os picos máximos na superfície foram registrados no tubo ½" no sentido longitudinal.

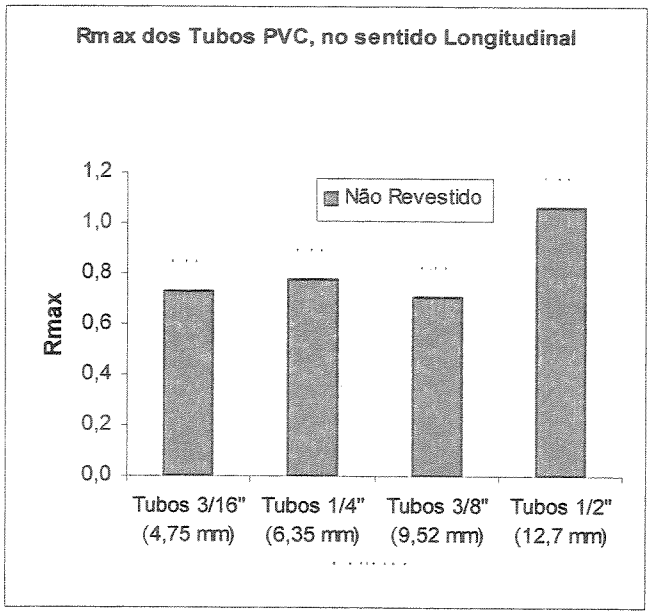


Figura 4.11 Representação do Rmax (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC.

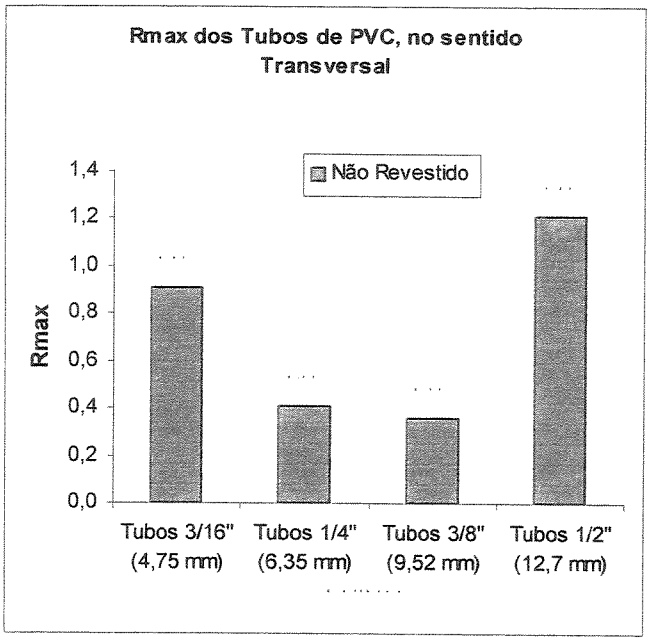


Figura 4.12 Representação do Rmax (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC.

Nas figuras 4.13 e 4.14 mostram-se os gráficos do comportamento do parâmetro Rz para tubos não revestidos. Observa-se que para o calibre de ½" (12,7 mm) a rugosidade tem um comportamento maior que para o resto dos calibres. Isto pode ser atribuído ao processo de fabricação, em que muitas variáveis podem influenciar, por exemplo: espessura da parede do tubo, tempo de resfriamento, diâmetros de extrusão, rugosidade da matriz, composição do material, etc.

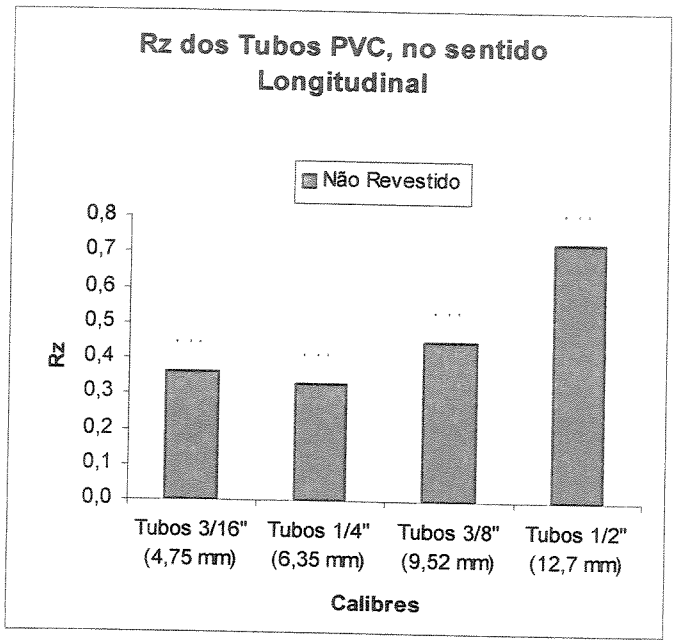


Figura 4.13 Representação do Rz (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC.

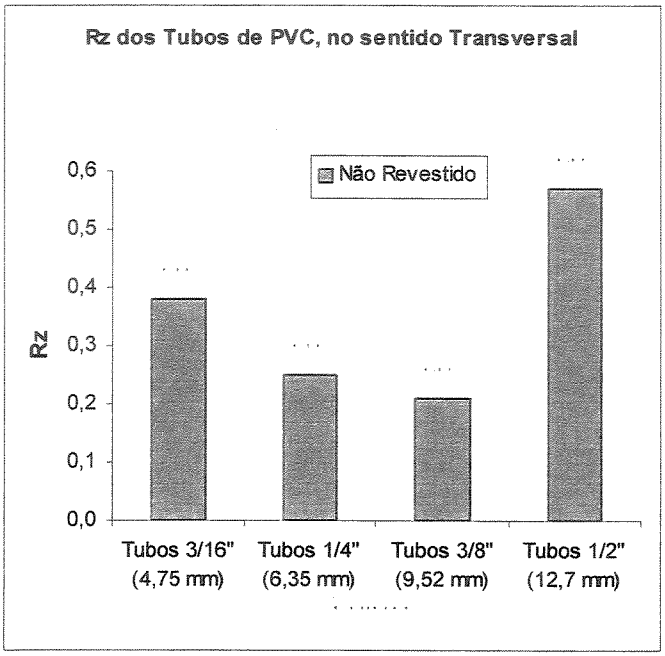


Figura 4.14 Representação do Rz (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC.

As figuras 4.15 e 4.16 representam o comportamento do parâmetro R_{3Z}, para os diferentes calibres de tubos de PVC não revestidos, medidos no sentido longitudinal e transversal. Observa-se um comportamento de R_{3Z} similar aos parâmetros anteriores, sendo o tubo ½" (12,7 mm) o mais rugoso.

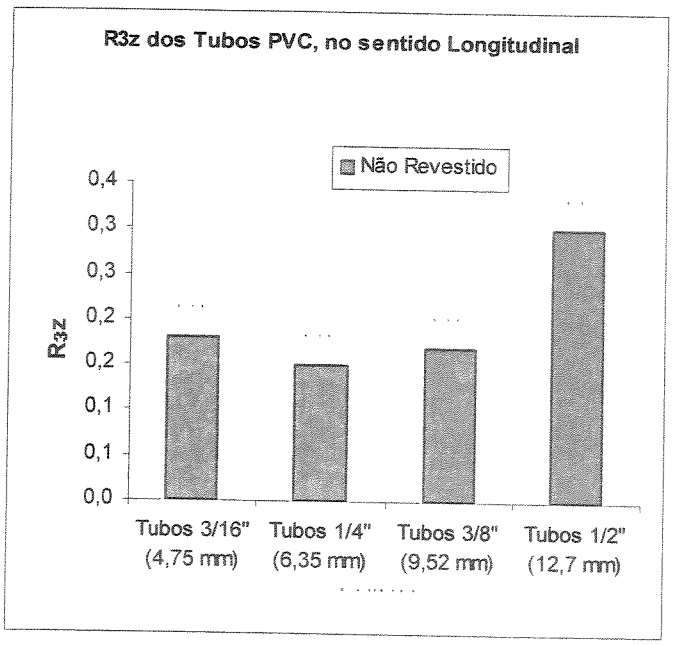


Figura 4.15 Representação do R_{3Z} (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC.

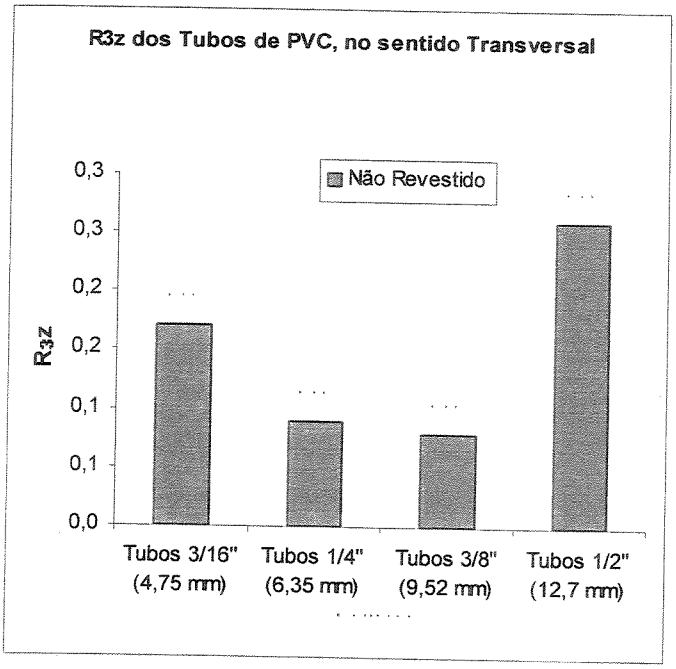


Figura 4.16 Representação do R_{3Z} (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC.

Observa-se nas figuras 4.17 e 4.18 um comportamento similar do parâmetro Ra aos parâmetros anteriores, para os diferentes calibres de tubos de PVC, medidos no sentido longitudinal e transversal.

Cada parâmetro apresenta valores específicos, já que são médias de valores utilizados para o cálculo final de cada parâmetro.

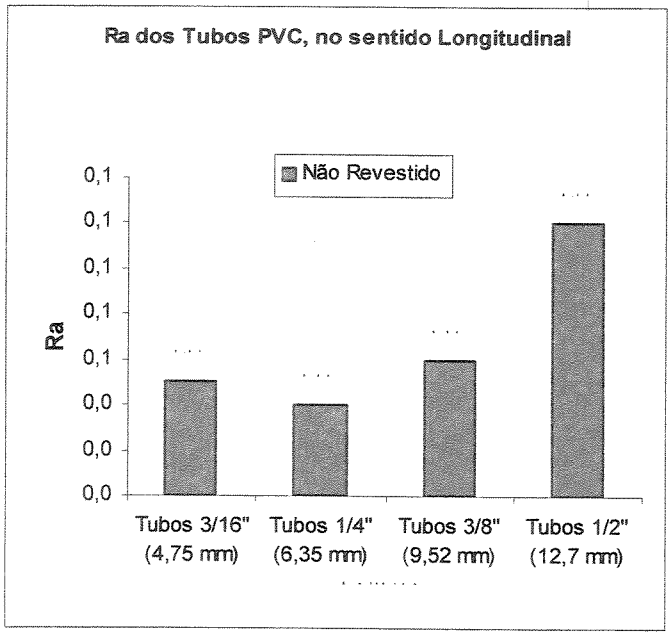


Figura 4.17 Representação do Ra (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC.

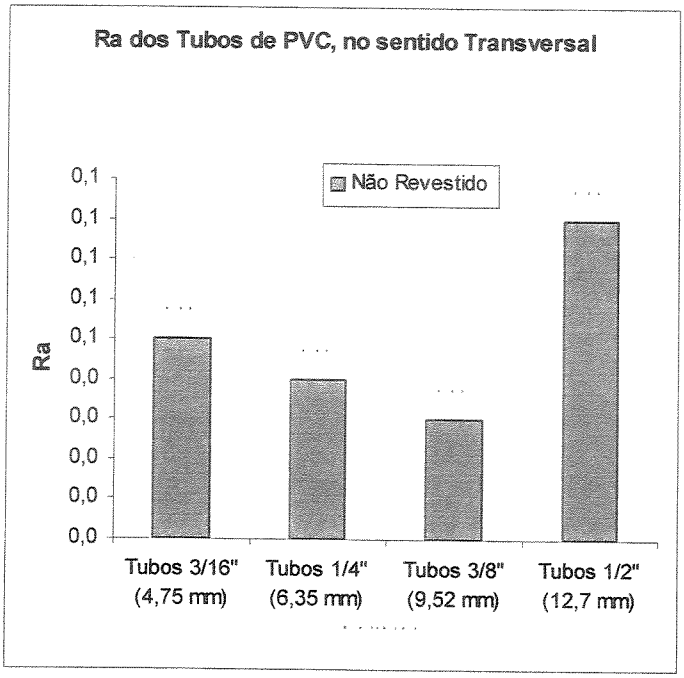


Figura 4.18 Representação do Ra (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC.

Por último, mostra-se nas figuras 4.19 e 4.20 o comportamento do parâmetro Rt, para os diferentes calibres de tubos de PVC, medidos no sentido longitudinal e transversal.

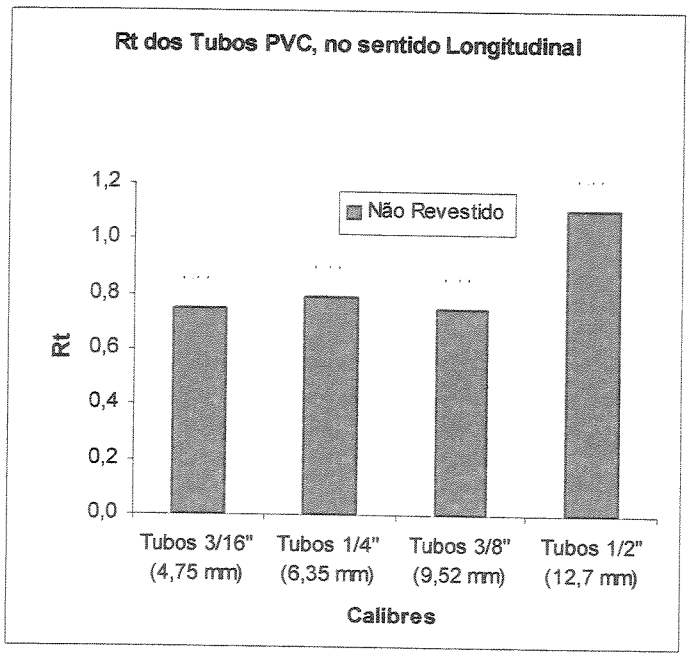


Figura 4.19 Representação do Rt (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido longitudinal de tubo de PVC.

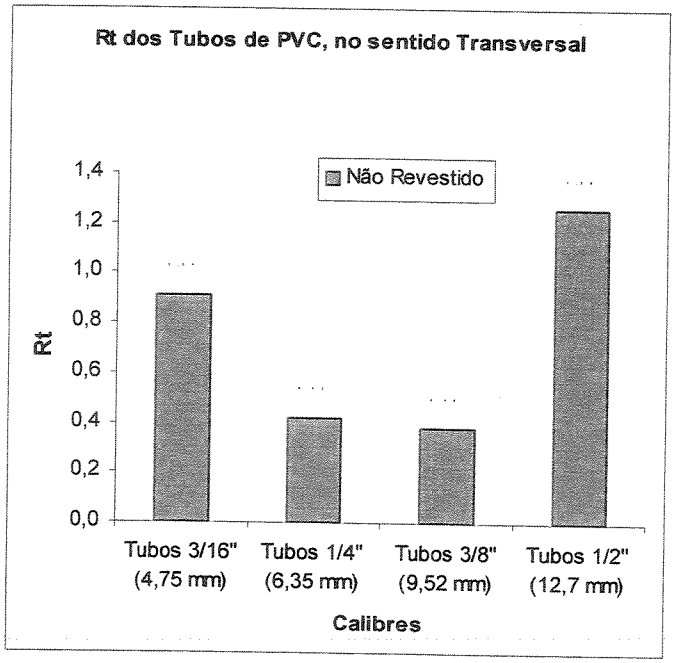


Figura 4.20 Representação do Rt (μm) para os diferentes calibres, medido no sentido transversal de tubo de PVC.

Resumidamente, pode-se analisar que os comportamentos dos parâmetros de rugosidades apresentados anteriormente são similares para todos os parâmetros determinados. Nota-se que para o calibre ½" (12,7) a rugosidade medida apresenta valores maiores que para o resto dos calibres. Segundo pesquisadores da área, se há maior rugosidade, menor será a hemocompatibilidade, ou seja, quanto maior a rugosidade superficial maior será a área exposta ao sangue. Por esta razão, uma superfície rugosa promove uma coagulação sanguínea mais rápida do que uma superfície altamente polida, segundo PARK e LAKES (1992).

Neste trabalho se verificará, nos testes hematológicos, que a afirmação anterior não é possível adaptar para todo tipo de superfícies, ou seja, existe uma dependência direta da natureza do substrato.

4.2.3 Medidas de Ângulo de Contato

Os resultados das medidas do ângulo de contato, assim como da energia superficial harmônica/geométrica e o trabalho de adesão, para os diferentes revestimentos praticados sobre as superfícies internas dos tubos de PVC, são mostrados em tabelas a seguir. Os números de amostras foram cinco amostras para cada tratamento de superfícies. As superfícies analisadas foram:

A) PVC sem Tratar
B) PVC Revestido com Heparina-Cloreto de Benzalcônio (HCB)
C) PVC Tratado com Plasma de Argônio (2 minutos)
D) PVC Tratado com Plasma de Oxigênio (2 minutos)
E) PVC Tratado com Plasma de Oxigênio (15 minutos)
F) PVC Tratado com Plasma de Argônio+Oxigênio (15 minutos)
G) PVC Tratado com Plasma de Oxigênio e Revestidos Posteriormente com Heparina-Cloreto de Benzalcônio (15 minutos)
H) PVC Revestido com Heparina-Cloreto de Benzalcônio e Posteriormente Tratado com Plasma de Argônio+Oxigênio (15 minutos)
I) PVC Revestido com Plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre) (15 minutos)

J) PVC Tratado com Plasma de Argônio+Oxigênio, depois Revestido com Heparina-Cloreto de Benzalcônio (15 minutos)

A seguir apresentam-se nas tabelas 4.6 – 4.16 os resultados das medidas do ângulo de contato, assim como da energia superficial harmônica/geométrica e o trabalho de adesão, para os diferentes revestimentos praticados sobre as superfícies internas dos tubos de PVC.

Tabela 4.6 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC sem tratar.

PVC SEM TRATAR								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	82,50	11,90	6,36	47,31	1,56	47,67	82,30	100,50
2	80,46	30,03	7,90	42,20	2,98	41,55	84,86	94,78
3	76,84	29,28	9,40	42,45	4,21	41,36	89,37	95,11
4	77,05	30,46	9,39	42,01	4,24	40,88	89,12	94,59
5	76,97	30,46	9,42	42,01	4,27	40,87	89,21	94,59
Med	78,76	26,43	8,49	43,20	3,45	42,47	86,97	95,91

Tabela 4.7 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC revestido com Heparina.

PVC REVESTIDO COM HCB								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	74,04	31,12	10,76	41,74	5,54	40,17	92,82	94,29
2	58,98	49,79	19,99	33,60	17,75	28,84	110,32	83,60
3	56,50	38,75	19,90	38,58	16,61	34,39	113,00	90,42
4	60,70	39,78	17,87	38,14	14,13	34,35	108,40	89,84
5	60,70	39,78	23,07	35,97	21,31	30,89	117,80	86,95
Med	62,18	39,84	18,32	37,61	15,07	33,73	108,47	89,02

Tabela 4.8 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC tratado com Plasma de Argônio por 2 minutos.

PVC TRATADO COM PLASMA DE ARGÔNIO (2 minutos)								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	66,03	31,14	14,48	41,70	9,49	39,09	102,40	94,28
2	68,92	28,50	12,93	42,69	7,65	40,59	98,99	95,45
3	66,12	29,53	14,32	42,30	9,22	39,79	102,30	95,00
4	67,66	35,56	14,05	39,96	9,26	37,28	100,50	92,13
5	69,67	25,07	12,38	43,87	6,91	42,03	98,09	96,81
Med	67,68	29,96	13,63	42,10	8,50	39,76	100,46	94,73

Tabela 4.9 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC tratado com Plasma de Oxigênio por 2 minutos.

PVC TRATADO COM PLASMA DE OXIGÊNIO (2 minutos)								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	63,17	37,59	16,42	39,09	12,18	35,73	105,70	91,05
2	62,07	30,52	16,35	41,92	11,62	38,85	106,90	94,56
3	63,53	28,97	15,53	42,50	10,56	39,69	105,30	95,24
4	61,72	29,39	16,44	42,35	11,66	39,29	107,30	95,06
5	63,83	28,22	15,33	42,77	10,29	40,03	104,90	95,56
Med	62,86	30,94	16,01	41,73	11,26	38,72	106,02	94,29

Tabela 4.10 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC tratado com Plasma de Oxigênio por 15 minutos.

PVC TRATADO COM PLASMA DE OXIGÊNIO (15 minutos)								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	56,23	23,05	18,71	44,47	14,02	41,00	113,30	97,54
2	58,76	23,48	17,49	44,34	12,57	41,17	110,60	97,39
3	57,93	27,30	18,16	43,08	13,59	39,66	111,50	95,94
4	59,01	25,18	17,48	43,80	12,65	40,59	110,30	96,77
5	57,36	28,35	18,51	42,71	14,09	39,18	112,10	95,51
Med	57,86	25,47	18,07	43,68	13,38	40,32	111,56	96,63

Tabela 4.11 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC tratado com Plasma de Argônio+Oxigênio por 15 minutos.

PVC TRATADO COM PLASMA DE ARGÔNIO+OXIGÊNIO (15 minutos)								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	50,77	18,15	21,13	45,82	16,73	41,86	118,80	99,07
2	51,75	25,42	21,09	43,70	17,10	39,65	117,90	96,68
3	44,40	20,74	24,40	45,12	20,99	40,43	124,80	98,31
4	49,77	23,15	21,92	44,42	18,00	40,23	119,80	97,51
5	44,23	24,56	24,76	43,97	21,69	39,16	125,00	97,00
Med	48,18	22,40	22,66	44,61	18,90	40,27	121,26	97,71

Tabela 4.12 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC tratado com Plasma de Oxigênio por 15 minutos e revestido posteriormente.

PVC TRATADO COM PLASMA DE OXIGÊNIO E REVESTIDOS HCB POSTERIORMENTE (15 minutos)								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água (°)	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	45,47	38,18	25,51	38,81	23,87	33,54	123,90	90,73
2	42,39	34,45	26,61	40,36	24,93	35,00	126,60	92,69
3	43,53	33,47	25,94	40,94	23,96	35,54	125,60	93,17
4	46,62	32,67	24,30	41,07	21,75	36,19	122,80	93,56
5	43,34	37,08	26,45	39,27	24,99	33,87	125,70	91,33
Med	44,27	35,17	25,76	40,09	23,90	34,83	124,92	92,30

Tabela 4.13 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC revestido e posteriormente tratado com Plasma de Argônio+Oxigênio por 15 minutos.

PVC REVESTIDO E POSTERIORMENTE TRATADO COM PLASMA DE ARGÔNIO+OXIGÊNIO (15 minutos)								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	43,21	34,18	26,18	40,47	24,34	35,20	125,90	92,83
2	41,36	33,28	26,99	40,83	25,31	35,43	127,40	93,27
3	41,96	42,02	27,81	37,13	27,32	31,34	126,90	88,54
4	40,31	38,34	28,13	38,13	27,33	33,01	128,30	90,65
5	40,09	37,28	28,09	39,19	27,17	33,50	128,50	91,22
Med	41,39	37,02	27,44	39,15	26,29	33,70	127,40	91,30

Tabela 4.14 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC revestido com Plasma de SF_6 por 15 minutos.

PVC REVESTIDO COM PLASMA DE SF_6 (HEXAFLURETO DE ENXOFRE) (15 minutos)								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água (°)	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	127,80	82,95	-0,84	12,38	0,49	16,67	28,19	57,04
2	130,60	96,26	0,00	0,00	0,10	10,32	25,45	45,26
3	127,00	87,32	-0,93	13,12	0,20	14,31	28,98	53,18
4	125,30	91,39	0,00	0,00	0,02	12,20	30,65	49,56
5	135,10	81,56	-0,77	8,47	1,65	17,96	21,25	58,26
Med	129,16	87,90	-0,51	6,79	0,49	14,29	26,90	52,66

Tabela 4.15 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para o PVC tratado com Plasma de Argônio+Oxigênio por 15 minutos e depois revestido com Heparina-Cloreto de Benzalcônio.

PVC TRATADO COM PLASMA DE ARGÔNIO+OXIG DEPOIS REVESTIDO COM HCB (15 minutos)								
	Ângulo de Contato		Energia Sup. Harmônica		Energia Sup. Geométrica		Trabalho de Adesão	
CP	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
1	41,73	34,39	26,93	40,38	25,35	34,97	127,10	92,72
2	43,36	36,74	26,40	39,42	24,89	34,04	125,70	91,51
3	46,16	36,54	24,96	39,51	22,97	34,39	123,20	91,62
4	47,08	34,73	24,29	40,25	21,93	35,32	122,40	92,55
5	48,74	34,49	23,42	40,35	20,77	35,59	120,80	92,67
Med	45,41	35,38	25,20	39,98	23,18	34,86	123,84	92,21

A tabela 4.6 apresenta um resumo dos resultados das médias determinadas para ângulo de contato, energia de superfície harmônica, energia de superfície geométrica e trabalho de adesão, medidos para um médio polar (água deionizada) e apolar (diodometano), nos diferentes revestimentos realizados nas superfícies de PVC.

Tabela 4.6 Resultados das medições do ângulo de contato, energia de superfície harmônica/geométrica e trabalho de adesão, para os diferentes revestimentos superficiais do PVC.

REVESTIMENTOS SUPERFICIAIS DO PVC (RESUMO)								
AMOSTRAS	ÂNGULO DE CONTATO (°)		ENERGIA SUP. HARMÔNICA (dyn/cm)		ENERGIA SUP. GEOMÉTRICA (dyn/cm)		TRABALHO DE ADESÃO (erg/cm^2)	
	Água	Diodometano	Polar	Dispersiva	Polar	Dispersiva	Água	Diodometano
A)PVC	78,76 ±2,58	26,43 ±8,13	8,49 ±1,36	43,20 ±2,31	3,45 ±1,19	42,47 ±2,92	86,97 ±3,23	95,91 ±2,57
B) PVC REVESTIDO COM HCB	62,18 ±6,85	39,8 4±6.64	18,32 ±4,62	37,61 ±3,04	15,07 ±5,92	33,73 ±4,31	108,47 ±9,43	89,02 ±4,00
C)PVC TRATADO COM PLASMA DE ARGÔNIO (2 minutos)	67,68 ±1,63	29,96 ±3,84	13,63 ±0,93	42,10 ±1,44	8,50 ±1,15	39,76 ±1,76	100,46 ±1,93	94,73 ±1,72
D) PVC TRATADO COM PLASMA DE OXIGÊNIO (2 minutos)	62,86 ±0,92	30,94 ±3,81	16,01 ±0,54	41,73 ±1,51	11,26 ±0,80	38,72 ±1,73	106,02 ±1,04	94,29 ±1,85
E) PVC TRATADO COM PLASMA DE OXIGÊNIO (15 minutos)	57,86 ±1,12	25,47 ±2,32	18,07 ±0,57	43,68 ±0,77	13,38 ±0,73	40,32 ±0,87	111,56 ±1,21	96,63 ±0,89
F) PVC TRATADO COM PLASMA DE ARGÔNIO+OXIGÊNIO (15 minutos)	48,18 ±3,60	22,40 ±2,97	22,66 ±1,79	44,61 ±0,87	18,90 ±2,29	40,27 ±1,02	121,26 ±3,39	97,71 ±0,98
G) PVC TRATADO COM PLASMA DE OXIGÊNIO e REVESTIDO COM HCB POST. (15 minutos)	44,27 ±1,73	35,17 ±2,36	25,76 ±0,93	40,09 ±1,01	23,90 ±1,31	34,83 ±1,11	124,92 ±1,54	92,30 ±1,21
H) PVC TRATADO COM PLASMA DE ARG+OXIG e REVESTIDO COM HCB (15 minutos)	41,39 ±1,27	37,02 ±3,50	27,44 ±0,84	39,15 ±1,56	26,29 ±1,39	33,70 ±1,68	127,40 ±1,06	91,30 ±1,89
I) PVC REVESTIDO COM PLASMA DE SF6 (HEXAFLUORETO DE ENXOFRE) (15 minutos)	129,16 ±3,83	87,90 ±6,06	-0,51 ±0,47	6,79 ±6,45	0,49 ±0,67	14,29 ±3,13	26,90 ±3,68	52,66 ±5,37
J) PVC TRATADO COM PLASMA DE ARG+OXIG DEPOIS REVESTIDO COM HCB (15 minutos)	45,41 ±2,84	35,38 ±1,16	25,20 ±1,46	39,98 ±0,48	23,18 ±1,94	34,86 ±0,64	123,84 ±2,54	92,21 ±0,60

A representação gráfica seguinte mostra com maior clareza o comportamento do ângulo de contato (água) para os diferentes revestimentos enumerados com letras em maiúsculas, como descreve-se anteriormente, figura 4.21.

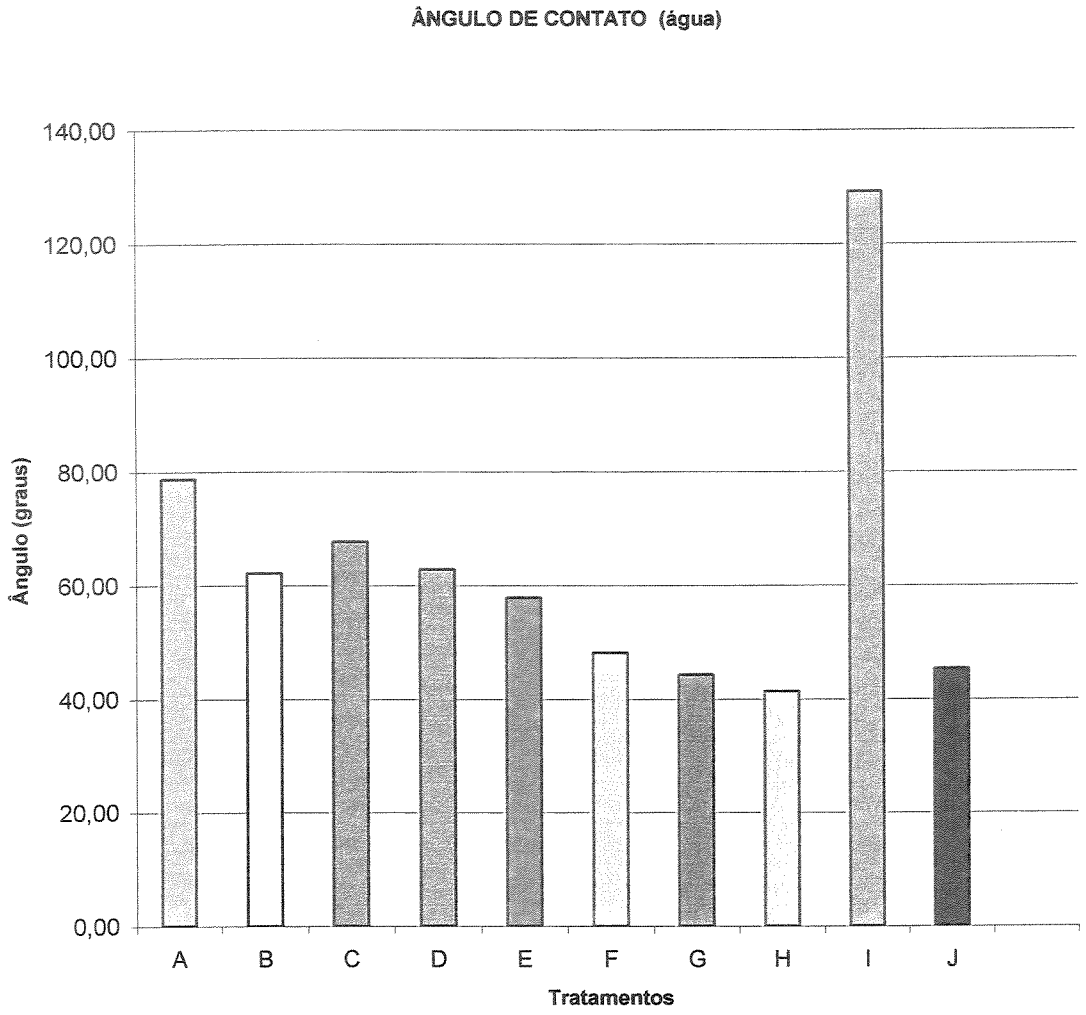


Figura 4.21 Comportamento do ângulo de contato para os diferentes revestimentos do tubo de PVC.

Observa-se na figura 4.21 que na maioria dos revestimentos existe uma diminuição da hidrofobicidade das superfícies, se for comparado ao PVC sem revestimento. O único revestimento que teve um aumento considerável foi a superfície tratada com plasma de SF_6, em que o ângulo de contato médio atingiu valores de 129,16°, uns dos maiores ângulos de contato obtidos para o PVC, em comparação com outros trabalhos já realizados anteriormente por outros autores. O elevado poder hidrofóbico, segundo alguns autores, pode ser uma limitação para

materiais utilizados em contato com o sangue, já que podem promover uma maior adsorção de proteínas plasmáticas como o fibrinogênio e γ-globulinas nas superfícies dos biomateriais, tornando-os menos hemocompatíveis, segundo KIM et al. (1976).

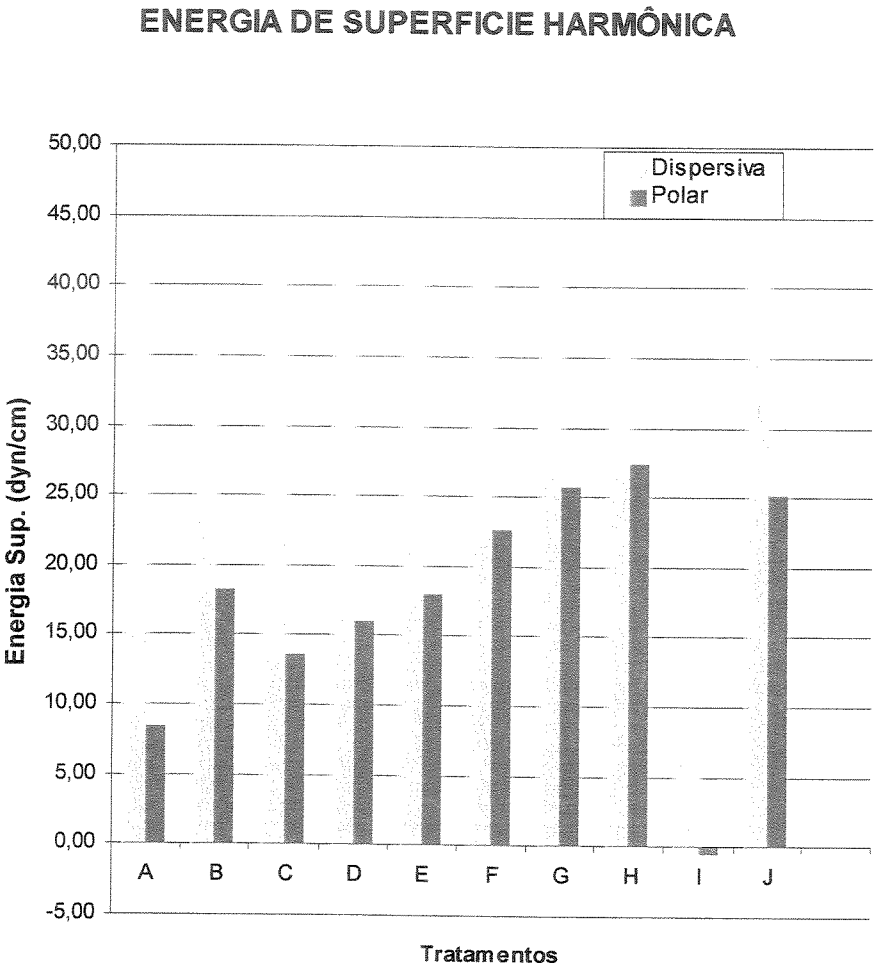


Figura 4.22 Comportamento da energia de superfície harmônica para os diferentes revestimentos do tubo de PVC.

O comportamento da energia de superfície harmônica mostra-se na figura 4.22. Observa-se que o componente polar para todos os revestimentos é menor que o componente dispersivo de energia superficial, demonstrando características de materiais hidrofóbicos em todos os

revestimentos superficiais. Segundo KAELBLE et al (1977), materiais com um alto componente dispersivo de energia de superfície e um baixo componente polar são mais compatíveis que aqueles com um baixo componente dispersivo de energia de superfície e um alto componente polar.

Outros pesquisadores consideram que, para que as superfícies sejam hemocompatíveis, o valor da energia livre interfacial deve ser mínima e os componentes dispersivo e polar de energia livre de superfície do biomaterial e do sangue forem respectivamente iguais, dando ênfase à teoria hidrofílica da hemocompatibilidade (RUCKENSTEIN e GOURISANKAR, 1984). Segundo a figura 4.22, não ocorre o anteriormente exposto, ou seja, para este trabalho a teoria hidrofóbica resulta ser mais adequada. Para confirmar este fato posteriormente analisa-se ambas teorias nos testes hematológicos.

4.2.4 Espectroscopia de infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR)

Os resultados do teste de espectroscopia de infravermelho com reflexão interna são apresentados na forma de espectros que relacionam a absorbância com o número de onda (cm^{-1}).

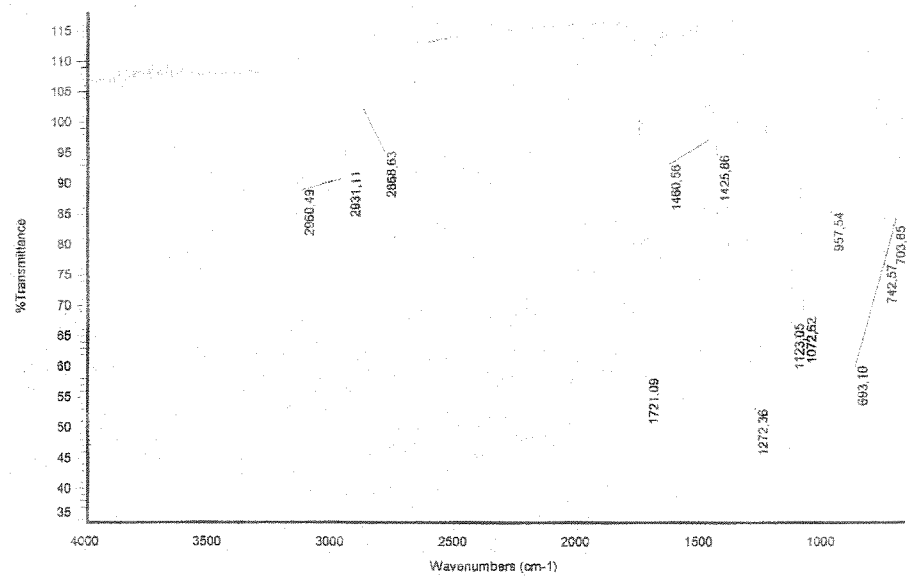
Foram analisadas as superfícies internas dos tubos de PVC, com as seguintes condições:

A) PVC não revestido

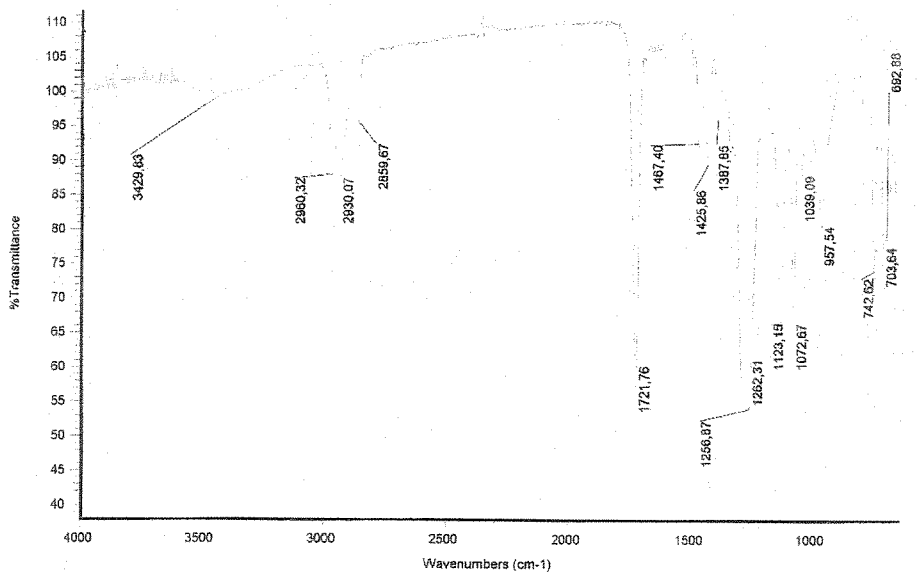
B) PVC revestido com solução de Heparina-cloreto de Benzalcônio

C) PVC revestido (deposição de filme fino) com Plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre)

Os espectros das diferentes superfícies não apresentaram diferença. A figura 4.23 mostra o resultado dos espectros obtidos nos diferentes revestimentos.

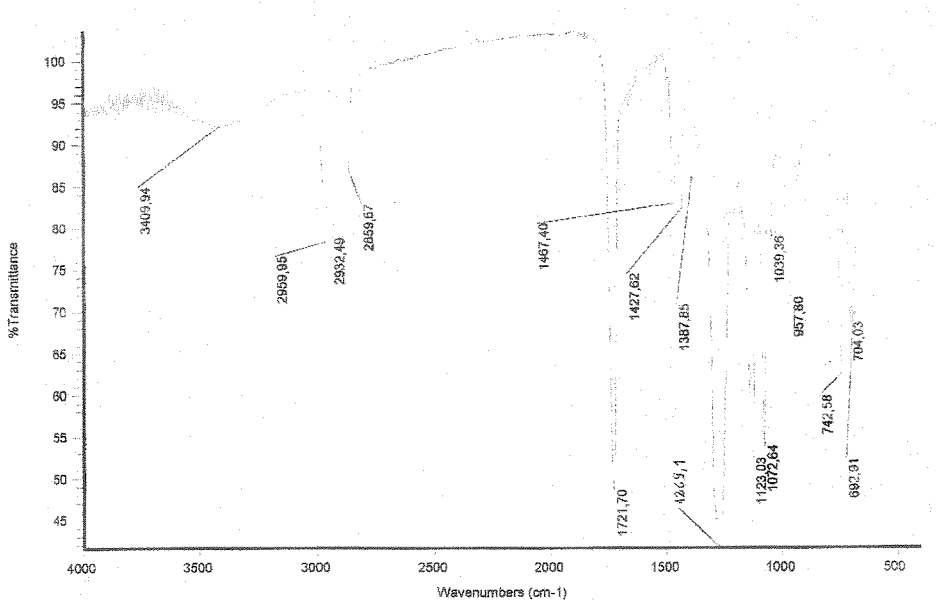


A)



B)

Figura 4.23 Espectros de ATR das superficies internas do PVC modificadas: A) PVC não revestido; B) PVC revestido com solução de Heparina-cloreto de Benzalcônio; C) PVC revestido com Plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre)



C)

Figura 4.23 (continuação) Espectros de ATR das superfícies internas do PVC modificadas: A) PVC não revestido; B) PVC revestido com solução de Heparina-cloreto de Benzalcônio; C) PVC revestido com Plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre)

A figura 4.23 mostra os espectros das superfícies internas do PVC modificadas: A) PVC não revestido; B) PVC revestido com solução de Heparina-cloreto de Benzalcônio; C) PVC revestido com Plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre), respectivamente. Verifica-se que não existe diferença entre os espectros, e todas as bandas correspondem ao substrato, ou seja, ao PVC. Observam-se picos de 2800 a 3000 cm^{-1}, característicos das ligações CH saturada, correspondente ao ácido carboxílico do éster (plastificante do PVC), outros picos a 1300-1500 cm^{-1}, característico da ligação CH_2 e a banda de 900-1000 cm^{-1} característica da presença de grupos de dupla ligação $-CH=CH_2$, por último uma banda envolta dos 3500 cm^{-1} representa o grupo OH e significa que a amostra pode ter absorvido água do ambiente. Não foram detectados outros grupos correspondentes ao revestimento com heparina e revestimento com SF_6, o que se supõe que o espectro infravermelho é dominado pelas absorções do substrato de PVC. Concluindo-se que as modificações causadas pelos revestimentos são muito superficiais, as quais não evitam que a radiação atingisse e fosse absorvida pelo PVC.

A espectroscopia no infravermelho, sempre que for possível, deverá ter a sua utilização complementada com os resultados obtidos através de outras técnicas de caracterização. Além disso, qualquer informação adicional sobre um comportamento característico do material polimérico estudado poderá auxiliar de forma expressiva a análise via espectroscopia no infravermelho.

4.3 Avaliação da Hemocompatibilidade (*in-vitro*)

Primeiramente avalia-se a hemocompatibilidade *in vitro* para os diferentes calibres de tubos de PVC (tubo 3/16" (4,75mm), tubo ¼" (6,35mm), tubo 3/8" (9,52mm), tubo ½" (12,7mm)), mais utilizados na circulação extracorpórea, realizando os testes de: Tempo de Protrombina (TP); Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA); Tempo de Trombina (TT); Fibrinogênio e Contagem de Plaquetas ($x10^3$ células/µl).

As condições para este primeiro teste foram:

a) Volume de sangue igual para todos os calibres, V= 10ml. (Foi escolhido o mesmo volume para garantir a mesma quantidade de células presentes na medição.)
b) Comprimentos e áreas superficiais para os diferentes calibres:

	tubo 3/16" (4,75mm)	**tubo ¼" (6,35mm)**	**tubo 3/8" (9,52mm)**	**tubo ½" (12,7mm)**
Comprimentos (mm)	534,6	315,8	140,3	78,9
Área Superficial Interna (mm^2)	8421,05	6299,21	4199,48	3149,61

c) Tempo aproximado de contato com sangue humano fresco: t = 2,5 horas

Os resultados apresentam-se na tabela 4.7, para os diferentes calibres de tubos de PVC revestidos e não revestidos pelo método I (heparina-cloreto de benzalcônio), mantidos por 2,5 horas em contato com sangue humano fresco.

Tabela 4.7 Resultados dos testes de hemocompatibilidade, para os diferentes calibres do PVC revestidos pelo método I.

	Controle	TUBO-1/2"-Ø12,7mm		TUBO-3/8"-Ø9,52mm		TUBO-¼"-Ø6,35mm		TUBO-3/16"-Ø4,75mm	
	Controle	Revestido	Não Revestido	Revestido	Não Revestido	Revestido	Não Revestido	Revestido	Não Revestido
TP (segundos)	12,2 ±1,10	17,3 ±1,51	15,2 ±1,27	22 ±2,04	12,9 ±1,04	19,4 ±1,74	12,4 ±0,99	21 ±1,93	8,9 ±2,65
TTPA (segundos)	31,8 ±1,02	Não Coag	38,7 ±1,24	Não Coag	33,4 ±1,07	Não Coag	33,7 ±3,04	Não Coag	36,4 ±3,21
TT (segundos)	12.8 ±1,05	Não Coag	15,9 ±0,99	Não Coag	14,4 ±0,35	Não Coag	16,2 ±1,19	Não Coag	11,7 ±1,36
Fibrinogênio (mg/dl)	223,1 ±0,12	141,4 ±1,09	131,8 ±1,27	134,7 ±0,95	170,8 ±1,43	188,2 ±1,37	205,4 ±0,79	213,3 ±1,26	261,2 ±4,23
Plaquetas ($x10^3$ célula/µL)	247 ±2,78	238 ±3,65	219 ±1,98	225 ±2,45	201 ±2,52	196 ±6,76	150 ±7,87	180 ±4,63	64 ±5,28

Os valores de referência para sangue humano são: TTPA = 25 a 36 segundos (normal)
TP – 10 a 14 segundos (normal)
TT - 9 a 15 segundos (normal)
Fibrinogênio: 150 - 370 mg/dl (normal)
Plaquetas: 130.000 a 370.000 cel/µl (normal)

Representando graficamente os valores obtidos de fibrinogênio em função da área superficial dos tubos revestidos e não revestidos, percebe-se na figura 4.24 uma relação ional, ou seja, à medida que aumenta área superficial, aumenta a quantidade de ênio no sangue para tubos revestidos e não revestidos, sendo menor para os tubos com revestimento a base de heparina. Isto quer dizer que se há maior área em contato, existe a possibilidade de formar um coágulo mais rapidamente. Observando que, para calibres maiores, com o mesmo volume de sangue, existem probabilidades baixas de se formar trombos, em comparação com calibres de menor diâmetro.

Os demais parâmetros como, por exemplo, TP, TTPA e TT, apresentam tempos maiores para tubos revestidos que não revestidos. Em alguns casos, são tempos muitos elevados que o equipamento sinalizou como "Não Coagulo", ou seja, que não existe coagulação, demonstrando com isto a presença da heparina. O que se pode concluir é que uma parte da heparina do

revestimento é liberada ao sangue, demonstrando que existe uma ligação secundária do revestimento com o substrato de PVC de origem eletrostático, ou seja, considera-se que sejam ligações secundárias decorrentes de força de Van der Walls. Este processo é muito importante, já que pode ser utilizado em casos de pacientes em que seja necessária dose mínima de heparina.

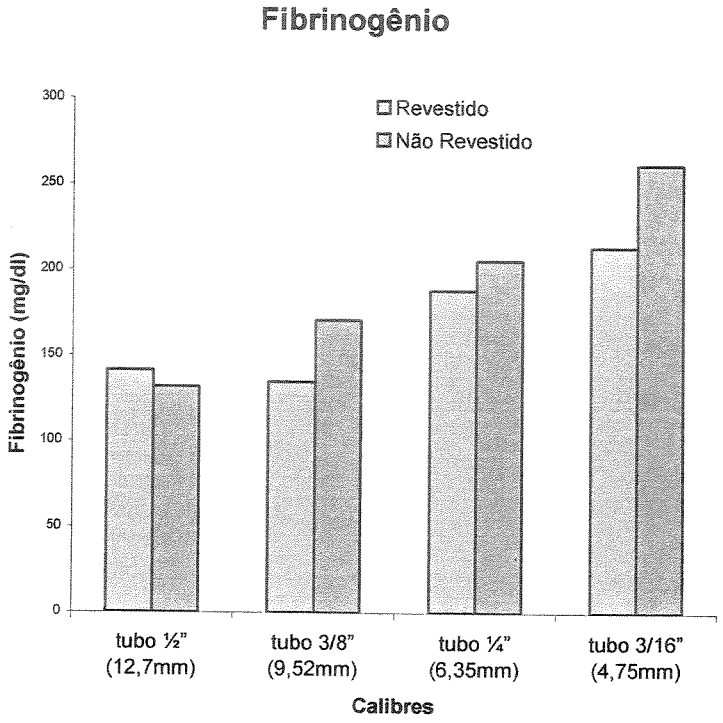


Figura 4.24 Comportamento do fibrinogenio nos diferentes calibres de tubos revestidos e não revestidos.

Outro teste de hemocompatibilidade foi realizado. Neste caso, para diferentes revestimentos obtidos, ambos métodos (I e II) de revestimentos foram avaliados, em alguns casos foram combinados os dois métodos. Os resultados dos revestimentos depois de estar 2,5 horas em contato com sangue são comparados com uma amostra inicial de sangue, retirada e analisada antes de transcorrido o tempo do teste. Na tabela 4.8 observam-se os resultado para cinco diferentes revestimentos realizados:

A) PVC sem Tratar

B) PVC Revestido com Heparina

C) PVC Tratado com Plasma de Argônio+Oxigênio e Revestidos com solução de Heparina-Cloreto de Benzalcônio posteriormente (15 minutos)

D) PVC Revestido com Plasma de SF_6 (Hexafluoreto de Enxofre) (15 minutos)

E) PVC Revestido com solução de Heparina-Cloreto de Benzalcônio e depois tratado com Plasma de Argônio (15 Minutos)

Tabela 4.8 Resultados dos testes de hemocompatibilidade, para os diferentes revestimentos superficiais do PVC.

RESULTADOS DOS EXAMES DE HEMOCOMPATIBILIDADE					
Amostras de sangue	**Número de Plaquetas (x10³ célula/μL)**	**Tempo de Protrombina (s)**	**TTPA (s)**	**Tempo deTrombina (s)**	**Fibrinogênio (mg/dl)**
Inicial	255,33±0,58	13,30±0,44	28,43±0,21	10,40±0,85	249,63±4,23
A) PVC	205,67±1,15	17,77±4,03	42,27±14,83	10,97±0,70	212,60±22,86
B) PVC-Revest HCB	235,00±2,65	Não Coág	Não Coág	Não Coág	248,21±15,38
C) PVC+Plasma Ar/O2+Reves-tido HCB	156,33±8,50	Não Coág	Não Coág	Não Coág	242,88±12,07
D) PVC+Plasma SF6	234,33±5,51	13,27±0,23	27,67±0,78	12,07±2,11	251,27±4,34
E) PVC - Revestido HCB+Plasma Argônio	234,67±3,21	Não Coág	Não Coág	Não Coág	257,82±8,16

Os valores de referência para sangue humano são: TTPA = 25 a 36 segundos (normal)
TP – 10 a 14 segundos (normal)
TT - 9 a 15 segundos (normal)
Fibrinogênio: 150 - 370 mg/dl (normal)
Plaquetas: 130.000 a 370.000 cel/μl (normal)

Os resultados na tabela 4.8 apresentam o comportamento de cada uns dos revestimentos obtidos para os diferentes parâmetros; à continuação analisa-se detalhadamente:

Contagem de plaquetas: o comportamento para todos os revestimentos foi normal, ou seja, entre 130 000-370 000 cel/µl para o organismo humano. Analisando cada revestimento registraram-se diminuição de 38,7% e 19,4% no revestimento (C) e no tubo sem revestimento respectivamente, mas ainda está entre valores normais.

Tempo de Protrombina: Para o tubo não revestido observa-se um aumento do TP. Isto pode ser ocasionado por resíduos de alguma substância nas paredes do PVC, que poderia ser o plastificante do tubo. Para os revestimentos (B,C e E), os resultados de "Não Coágulo" representam a presença da heparina, ou seja, parte do revestimento foi consumido pelo sangue. Por último, no revestimento com plasma SF_6, observam-se valores quase idênticos aos iniciais, ou seja, o revestimento teve um excelente comportamento para este parâmetro medido.

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada: Começando pelo tubo não revestido, observa-se um aumento consideravel do TTPA. Isto continua sendo ocasionado por resíduos ou substâncias nas paredes do PVC, que poderiam ser os ésteres do acido ftálico do plastificante que componente do substrato. Para os revestimentos (B,C e E), os resultados de "Não Coágulo", representam a presença da heparina, como anteriormente dito. No revestimento (D), com plasma SF_6, observam-se valores aproximados ao controle inicial, confirmando ter uma boa hemocompatibilidade.

Tempo de Trombina: O resultado do TT para os revestimentos (A e D) foram normais. Para os revestimentos a base de heparina e combinados com plasma, prevaleceu o caráter " Não Coágulo", precisamente pela presença da heparina.

Fibrinogênio: Os valores de fibrinogênios se mantiveram normais para todos os revestimentos, ou seja, entre 150-370 mg/dl. No tubo não revestido observa-se um decréscimo de 14,8%, demonstrando que teve alteração na taxa de fibrinogênio, existindo a probabilidade de parte do fibrinogênio estar convertido em um coágulo de fibrina.

4.4 Avaliação do Envelhecimento no Revestimento

Na continuação mostram-se os resultados das análises microscópicas realizadas nas superfícies das amostras revestidas pelo método I, embaladas e envelhecidas naturalmente depois de transcorridos oito meses. Na figura 4.25, observam-se as amostras já revestidas, esterilizadas e embaladas pela empresa ACECIL (Esterilizadora de Material Medico Hospitalar).

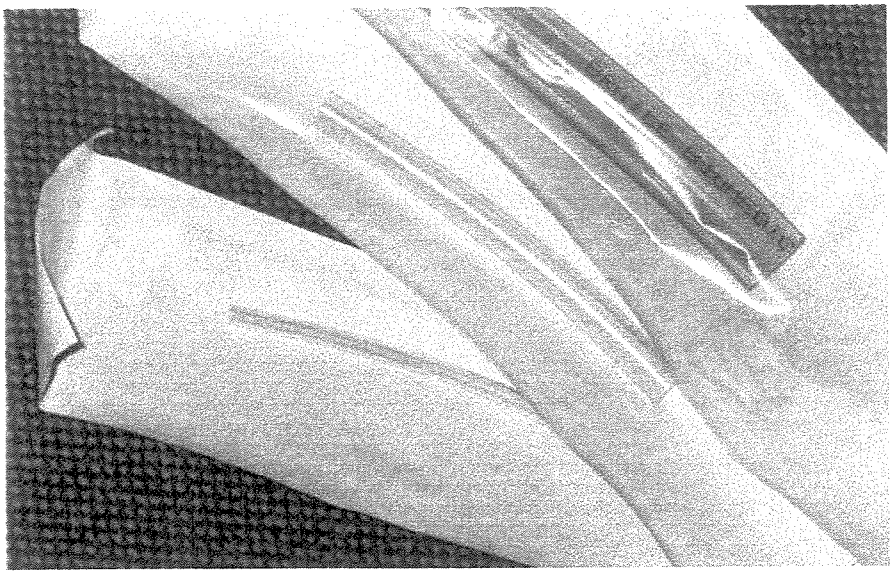


Figura 4.25 Amostras de tubos de PVC, revestidas com HCB, esterilizadas e emabaladas pela empresa ACECIL.

As condições do ensaio foram:

a) Temperaturas entre 22 –30 °C
b) Baixa umidade aproximadamente uma média de 40%
c) Poeira e poluentes 0%, as amostras foram embaladas e seladas hermeticamente
d) Baixa radiação solar, condições de laboratório (sombra total)

As micrografias mostram os revestimentos envelhecidos na figura 4.26. Observa-se o aparecimento de rugas, causadas pelo processo de envelhecimento, durante oito meses.

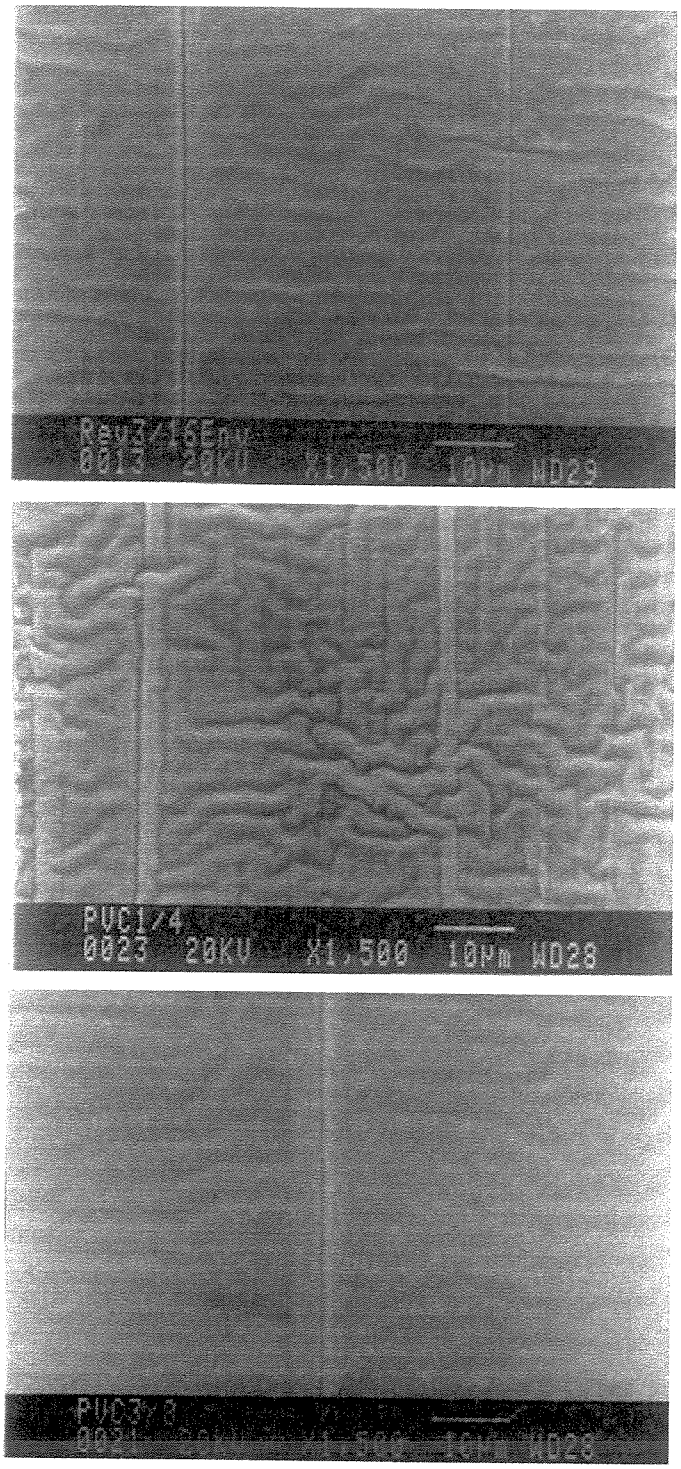


Figura 4.26 Micrografias obtidas pelo MEV das amostras de tubos de diferentes calibres envelhecidas por 8 meses. A) PVC 3/16" (4,75mm); B) PVC ¼" (6,35mm); C) PVC 3/8" (9,52mm) e D) PVC ½" (12,7mm).

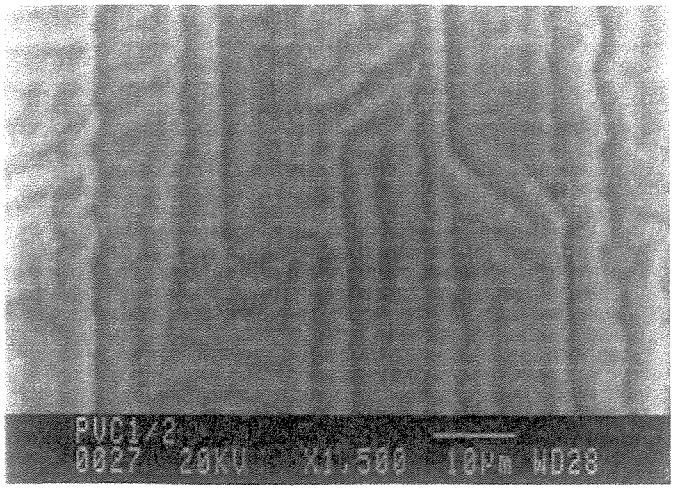


Figura 4.26 (continuação) Micrografias obtidas pelo MEV das amostras de tubos de diferentes calibres envelhecidas por 8 meses. A) PVC 3/16" (4,75mm); B) PVC ¼" (6,35mm); C) PVC 3/8" (9,52mm) e; D) PVC ½" (12,7mm).

Fazendo uma análise, observa-se na figura 4.26 que há agrupamentos e aparecimentos de picos e fendas que anteriormente não estavam presentes, o que se pode afirmar que ocorre mudança superficial do revestimento. Este comportamento pode-se agravar com o aumento do tempo de envelhecimento, mas se propõe um estudo mais aprofundado e analisar por um tempo mais prolongado os revestimentos, seguindo as normas internacionais para todo equipamento de CEC, que deve cumprir no mínimo cinco anos de validade após esterilização.

O processo de aparecimento de rugas pode ser atribuído fundamentalmente a dois fatores principais: temperatura e quantidade de radiação. Para alguns autores, como é o exemplo de ROSE (1996), comenta o seguinte: a temperatura pode influenciar significativamente na velocidade das reações químicas, incluindo reações de oxidação e reações fotoquímicas. Também pode favorecer os processos difusivos, resultando em perda de estabilizantes ou plastificantes. Para o caso da quantidade de radiação, existem muitos fatores e variáveis envolvidos na radiação, mas não deixa de ser um dos fatores ambientais mais importantes responsável pelo envelhecimento. A radiação solar na região do ultravioleta (UV) é dividida em três partes: UV-A, UV-B e UV-C, a faixa da radiação UV-B possui energia suficiente para romper ligações químicas e causar degradação fotoquímica, questão que acelera o envelhecimento dos revestimentos.

Como se observa na figura 4.26, o revestimento está presente no substrato dos tubos de PVC e por ser um revestimento ativo por contar com base heparina, pode-se dizer que transcorrido o tempo do teste ainda existe a possibilidade de favorecer a hemocompatibilidade.

4.5 Discussões finais

Para uma avaliação global dos revestimentos obtidos pelo método I (revestimento com heparina-cloreto de benzalcônio) e método II (revestimentos com plasma) analisados neste trabalho, são apresentados a seguir comentários finais:

a) Obtiveram-se superfícies não trombogênicas, no caso do revestimento a base de heparina e revestimento com plasma SF_6.

b) As superfícies dos tubos revestidos e não revestidos não apresentam diferença se observados via microscopia óptica, registrando-se ranhuras orientadas que se atribuem ao processo de fabricação (extrusão).

c) Para a análise via MEV, observa-se que para tubos revestidos com heparina cloreto de benzalcônio e revestidos com plasma origina-se uma topografia diferente ao substrato.

d) Para tubos revestidos por ambos métodos não se observa a formação de trombos na superfície, concluindo-se que todos apresentaram boa hemocompatibilidade, destacando-se o revestimento com plasma SF_6, que mostrou os melhores valores dos parâmetros de coagulação.

e) Para os diferentes calibres de tubos de PVC, observa-se que para igual volume de sangue existe uma maior tendência à formação de um trombo, nos casos de calibres com menores diâmetros, devido a existir uma maior quantidade de fibrinogênio presente no plasma sanguíneo.

f) Com relação à rugosidade superficial dos substratos não revestidos, observa-se que nos diferentes calibres existem diferenças, em que o diâmetro maior exibe valores de rugosidades elevados em comparação ao resto dos calibres analisados. Com isto se conclui que para maiores diâmetros de tubos os revestimentos seriam mais eficazes.

g) Com relação ao ângulo de contato, observa-se que o componente polar de energia superficial, para todos os revestimentos, apresenta um valor maior que o componente dispersivo. Isto demonstra características de materiais hidrofóbicos, os quais segundo pesquisadores da área de biomateriais são mais compatíveis que aquele com baixo componente dispersivo de energia de superfície e um alto componente polar, sendo mais aceita a teoria hidrofóbica.

h) Os parâmetros da coagulação no caso dos revestimentos de maneira geral apresentaram valores considerados normais para o organismo humano, o que verifica o poder não trombogênicos dos revestimentos obtidos.

CAPÍTULO 5

Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

Conclusões

A redução da trombogenicidade foi comprovada nos testes hematológicos e avaliações das superfícies por microscopia eletrônica de varredura após contato com sangue, tanto para revestimentos a base de heparina-cloreto de benzalcônio, como para revestimentos com plasma, obtendo-se maior redução nos revestimentos com heparina.

As técnicas de caracterização e avaliação apresentadas podem ser utilizadas como ferramentas no estudo e desenvolvimento de novos revestimentos ou revestimentos superficiais.

Os dois principais tipos de revestimentos avaliados tornaram as superfícies mais hidrofóbicas.

Os revestimentos com plasma foram mais estáveis do que os revestidos com heparina, sendo mais indicados em produtos com maiores períodos de contato com o sangue.

Os revestimentos com heparina-cloreto de benzalcônio provocam liberação gradual da heparina tornando-se indicados para procedimentos de CEC, que necessitam da manutenção da anticoagulação do sangue.

A rugosidade superficial determinada para os diferentes calibres não revestidos apresenta diferenças significativas entre eles. O revestimento possibilita uma igualdade na topografia depois de aplicado sobre as diferentes superfícies, retificando e apresentando uma topografia superficial homogênea e diferente das superfícies não revestidas.

No teste de espectroscopia de infravermelho com refexão interna múltipla (MIR), não foram detectados grupos correspondentes ao revestimento com heparina e revestimento com SF_6, o que se supõe que o espectro infravermelho é dominado pelas absorções do substrato de PVC. Assim, conclui-se que as modificações causadas pelos revestimentos são muito superficiais, os quais não evitaram que a radiação atingisse e fosse absorvida pelo PVC, sendo este teste não apropriado para analisar os revestimentos obtidos.

Em relação à avaliação da hemocompatibilidade, não foram observados trombos nas superfícies revestidas para um período de exposição *in vitro* de 2,5 horas, em todos os revestimentos obtidos. Os revestimentos realizados a partir da solução de heparina-cloreto de benzalcônio registraram um aumento nos tempos dos parâmetros de coagulação, quando comparados com os substratos de PVC não revestidos e revestidos por plasma. A hemocompatibilidade *in vitro,* de maneira geral demonstra que para tubos revestidos os parâmetros de coagulação são retardados ou são mantidos estáveis demonstrando o poder não-trombogênico dos revestimentos.

Na avaliação do envelhecimento no revestimento, verifica-se que existem modificações superficiais nos revestimentos de heparina após oito meses de envelhecimento natural, provocada, fundamentalmente, por variações de temperaturas e radiações. Se propõe um estudo aprofundado com tempos mais prolongados, seguindo as normas internacionais de todo equipamento de CEC, que define um tempo mínimo de cinco anos de validade após esterilização.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a possibilidade de obtenção de novos tipos de revestimentos não trombogênicos sobre substratos de PVC, utilizados em circuitos extracorpóreos.

Novos produtos e aplicações podem advir dos novos, e agora caracterizados, tipos de revestimentos.

A utilização dos revestimentos desenvolvidos pode ser estendida para produtos como válvulas cardíacas, cateteres, implantes, cânulas, drenos e uma infinidade de aplicações específicas que requerem redução da trombogenicidade.

Sugestões para Trabalhos Futuros

- ✓ Obter e testar revestimentos com plasma obtido de outros gases, com a finalidade de analisar o grau de hemocompatibilidade.
- ✓ Analisar quantitativamente o tipo de proteínas adsorvidas nos revestimentos.
- ✓ Analisar a interface dos revestimentos com o substrato de PVC, com uso de recursos mais sofisticados, para detecção de reações ou falta de interação entre revestimento/biomaterial.
- ✓ Testar o comportamento dos revestimentos em fluxo de sangue, para os diferentes calibres.
- ✓ Testar aplicações dos revestimentos em válvulas, cateteres, implantes, etc.
- ✓ Desenvolver técnicas para a caracterização da validade do revestimento com tempo mínimo de cinco anos, segundo normas internacionais.
- ✓ Analisar pontos críticos na Circulação Extracorpórea e propor que tipo de revestimento seria o mais adequado.
- ✓ Estudar e projetar a utilização destes revestimentos em escala industrial.

Referências Bibliográficas

ADAMSON, A W. **Physical Chemistry of Surfaces.** New York, John Wiley & Sons, 1976.

AGNELLI, J.A.M. **Curso Básico sobre Características Especiais de Polímeros.** Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais, UFSCar/UNESP. São Carlos-SP. P 19-28, 2001.

AGNELLI, J.A.M. **Curso sobre Degradação, Estabilização e Envelhecimento de Polímeros.** Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais, UFSCar/UNESP. São Carlos-SP. p 40-57, 2001.

ALPHA. Laboratórios Especializados Ltda. Boletim Informativo. **Exames Laboratoriais Essenciais.** setembro, 2000. Disponível em < http://www.alphalab.com.br/biblioteca.htm>. Acesso em 28 set. 2000.

ALVES, G. P. **Recobrimentos de Superfícies de PVC com filmes de Langmuir-Blodgett usando Fosfatidiletanolamina.** Campinas,SP. FEQ, UNICAMP, 1999. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 114 p. 1999.

ANDRADE, J. D., Interrelation of Protein adsorption and blood Compatibility of Biomaterials, **Medical Instrument**, Baltimore, v. 7, p. 110- 120, 1973.

BAE, J. S.; SEO, E. J; KANG, I. K. Synthesis and Characterization of Heparinized polyurethanes Using Plasma Glow Discharge. **Biomaterial,** v. 20, p. 529-537, 1999.

BENNET JS. Mechanisms of Platelet Adhesion and Aggregation: an Update. **Hosp Practice.** v. 27 p. 124-40, 1992.

BRUCK, S. D. Medical Applications of Polymeric Materials. **Medical Progress Through Technology**, 9: p. 1-16, 1982.

CBAS COMPENDIUM CARMEDA.. **Heparin coatings.** Maio, 2000. Disponível em <http://www.carmeda.com/CBSAcompend51100.pdf>. Acesso em 17 maio. 2000.

CHAPMAN, D. Biomembranes and New Hemocompatible Materials. **Langmuir**, v.9, n.1, p. 39-45, 1993.

CHAPMAN, D.; DURRANI, A A. **Phospholipids Acid Esters, their Preparetion and their use for the preparation of biocompatible Surfaces.** European Patent. London. Al 0157469. 18 de maio de 1985.

CHAPMAN, D.;CHARLES, S. A. A coat of many lipids in the clinic. **Chemistry in Britain.** p. 253-256, 1992.

CHOLAKIS, C.H.; SEFTON, M. V. Chemical Characterization of an immbilized heparin: heparin-PVA. **Polymers as Biomaterials**. New York, Plenum Press, p. 305-315, 1984.

CONCEIÇÃO, D.S.; GOMES O.M. **Circulação Extracorpórea.** Sarvier LTDA. São Paulo, 1973.

DAVIE EW. Biochemical and Molecular Aspects of the Coagulation Cascade. **Thrombos Haemost** , v. 74, p.1-6, 1995.

DUMITRUI, S. **Polymeric Biomaterials.** New York: Marcel Dekker, 1993. 845 p.

EDDY, T. L. et al. Plasma/Arc Melter/Review for Vitrification of Mixed Wastes: Results. In: International Symposium on Environmental Technologies: Plasma Systems and Applications, 11, 1995, Georgia, **Proceedings...**v. 2, p. 517-528.

EDMUNDS, H. L. The Sangreal. Editorial J. **Thorac Cardiovascular Surgery**. v.90, p.1-6, 1985.

FINK, D.J.; CHITTUR, K. K. Monitoring Biological Processes by Fourier Transform infrared Spectroscopy, **Enzyme Microb. Technology.**, v. 9, p. 568-572, Sep. 1986.

GALA INSTRUMENTE. **Plasma coatings.** Junho, 2001. Disponível em <http://www.plasma.li/index.htm>. Acesso em 17 julho. 2001.

GALEMBECK, F. **Adesão de Superfície** – Curso de Extensão – área de tecnologia – Instituto de Química – UNICAMP (1992).

GARCIA, INÊS L. **Tratamentos Químicos de Superfícies de Poliuretano de Grau Médico para Imobilização de Componentes não Trombogênicos.** Campinas: FEQ, UNICAMP, 1995. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

GODOY, P. H. **Construção de um Equipamento de Plasma de arco DC para Múltiplos Fins.** Campinas,SP. FEM, UNICAMP, 1997. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Mecânica. Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

HARMAND, M. F.; BRIQUET, F. In Vitro Comparative Evaluation under Static Conditions of the Hemocompatibility of Four Types of Tubing for Cardiopulmonary Bypass. **Biomaterials.** v.20, p. 1561-1571,1999.

HORBERTT, T.A.Principles Underlying the Role of Adsorbed Plasma Proteins in Blood Interactions With Foreign Materials. **Cardiovasc. Pathol.**, v. 2, n. 3 (Suppl.), p. 137-148, 1993.

IKADA, Y., IWATA, H. ; et al. Blood Compatibility of hydrophilic Polymers. **Journal of Biomedical Materials Research.** Japão, v. 15, p 697-718, 1981.

INSTITUTO DO PVC: O Instituto. Publicações. Noticias. Links, Agosto 2000. Disponível em <http://www.institutodopvc.org/>. Acesso em: 28 set. 2000.

INSTITUTO DO PVC: O Instituto. Publicações. Noticias. Links, Outubro 2001. Disponível em <http://www.institutodopvc.org/>. Acesso em: 18 out. 2001.

KAELBLE, D. H., MOACANIN, J., Interrelation of Protein adsorption and blood Compatibility of Biomaterials. **Polymer,** v. 18, p 475-482, 1977.

KAKKAR, V.V.; THOMAS, D.P. **Heparin- Chemestry and clinical Usage.** Ed. J.M. Arrowsmith LTD, Bristol-Great Britain. 1976, 376 p.

KANG, I. K; KWON, O. H.; LEE, Y.M.; SUNG, Y. K. Preparation and Surface Characterization of Funtional Group-Grafted and Heparin-Immobilized Polyrethanes by Plasma Glow Discharge. **Biomaterials**, v. 17, n. 8, p. 841-847, 1996.

KIM, S. W. et al.Effect of Phthalate Plasticizer on Blood Compatibility of Polyvinyl Chloride. **Journal of Pharmaceutical Science,** v. 65, n.5, p. 670-673, 1976.

KLAGES, C. P. Modification and Coating of biomaterial Surfaces by Glow-Discharge Processes. A Review. **Mat. Wiss. U. Werksttofftech,** v. 30, p. 767-774, 1999.

KOENIG, W. **Recent progress in the clinical aspects of fibrinogen.** Eur Heart J 1995;16(suppl A):54-9.

KONDO, A, OKU, S. HIGASSHITANI, K. Adsorption of γ-globulin, a Model Protein for antibody, on colloidal Particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, 1991,.p. 537-543.

KRÜSS. Advancing Surfaces Science. **Measuring Methods.** June, 2001. Disponível em: <http://www.kruss.de/krussdframed_e.html>. Acesso em : 26 jul.2001.

LABARRE, D.; JOSEFOWICZ, M.; BOFFA, M. C. Properties of Heparin-poly(methyl methacrylate) copolymers II. **Journal Biomed. Materials Research.** v. 11, p. 283-295, 1977.

LABES. Laboratórios Especializados Ltda. Boletim Informativo. **Exames Laboratoriais Essenciais.** Novembro, 2000. Disponível em <http://www.labes.com.br/FrameBoletim.htm>. Acesso em 27 nov. 2000.

LARSSON, R. L. et al. The Stability of Glutardialdehyde-stabilized-heparinized Surfaces in Contact with Blood. **Thrombos. Haemostas.** Stuttgard, v. 37, p. 262- 273, 1977.

LEININGER, R. et al. Nonthrombogenic Plastic Surfaces. **Science**, v. 152: p. 1625-1626, 1966.

LELAH, M. D.; COOPER, S. L. **Polyurethanes in medicine**. Boca Raton, CRC Press, 1986.

LU, D. R., PARK, K., Effect of Surface Hidrofobicity on the Conformational Change of Adsorbed Fibrinogen. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 144, n. 1, Jun. 1991.

LYMAN, D. J., MUIR, W. M., LEE, I.J., Transformations American Society. **Artifitial International Organs,** v. 11, p. 301-317, 1965.

LYMAN, D. J.; ROWLAND, S. M. Biomaterials. In: Kroschwitz, J. I. **Polymers: Biomaterials and Medical Applications.** . p. 52-71, 1989.

MANO, E.B. **Polímeros como Materiais de Engenharia.** Editora Edgard Blücher LTDA, segunda reimpressão, São Paulo-Brasil, 2000. 197 p.

MARRECO,P. R. **Estudo do Recobrimento de Policloreto de Vinila (PVC com Fosfatidilcolinas.** Campinas,SP. FEQ, UNICAMP, 1999. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 151 p. 1999.

MCLEAN, J. The Discovery of Heparin. **Circulation**. v.19, p. 75- 78. 1959.

NIEUWENHUISEN, W. Biochemistry and measurement of fibrinogen. **Eur. Heart Journal.** v. 16(suppl A), p. 6-10.1995.

MOREIRA, P. L.; NOVELLO, W. P.; WADA, M. L. Importance of Uniform Heparin on Biopolymers. **Artificial Organs.** v. 24, p. 209-211, 2000.

NOGUEIRA, D. A. R. **Adsorção de Proteínas na Superfície de Biomateriais Poliméricos.** Campinas,SP. FEQ, UNICAMP, 1999. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 77 p. 1999.

NOVELLO, W. P.; ARRUDA, A. C. F. Characterization of coatings for open-heart surgery tubing with heparin and lipid. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.9, n°12, p. 793-796, 1998.

NYILAS, E., MORTON, W. A, LEDERMAN, D. M., CHIN, T. H., CUMMING R. D., Interrelation of Protein adsorption and blood Compatibility of Biomaterials. **Trans. American. Soc. Artificial International Organs,** v. 21, p. 55-69, 1975.

OLIVEIRA, BEATRIZ P.P.; FERREIRA, MARGARIDA A. **Aplicações de Espectroscopia de Infravermelho na Industria Alimentar.** Disponível em <http://www. ubista.ubi.pt/~ubiquim/revistas/rev4_6.html> .Acesso em 27 nov. 2001.

PARK, J. B.; LAKES, R. S. **Biomaterials an Introduction.** Second Edition. United State of America-NY, chapter 10. p. 220-237, 1992.

PEMM (Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais) Universidade Federal do Rio de Janeiro **Área de Superfícies e Filmes Finos. Deposição e Caracterização**. Março, 2001. Disponível em <http://www.metalmat.ufrj.br/superficie/hp_sup.html>. Acesso em 13 março. 2001.

PITT, W. G.; PARK, K. E COOPER, S. L. Sequential Protein Adsorption and Trombus Deposition on Polymeric Biomaterials. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 111, n.2, p. 343-362, 1986.

RAPAPORT SI, RAO LVM. **The tissue factor pathway: how it has become a "Prima Ballerina".** Thrombos Haemost v. 74, p. 7-17.1995.

ROSA, D. S. **Correlação entre Envelhecimentos Acelerados e Natural do Polipropileno Isotático (PPi).** Campinas: FEQ, UNICAMP. 1996. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, p 34-66,1996.

RUCKENSTEIN, E.; GOURRISANKAR, S. V. Interrelation of Protein adsorption and blood Compatibility of Biomaterials. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 101, p. 436-451, 1984.

SAITO, N.; NOJIRI, CH.; KURODA, SH.; SAKAI, K. Photochemical Grafting of α-propylsulphate-poly(ethylene oxide) on polyrethane surfaces and enchanced antitrombogenic potential. **Biomaterials,** v. 18, p. 1195-1197, 1997.

SCHMER, G. The Biological activity of Covalently Immobilized Heparin. **Trans. American. Soc. Artificial International Organs,** v. 18, p. 321-323, 1972.

SEVASTINOV, V. I. Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, in **High Performance Biomaterials – A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications.** Ssycher M., ed. Technomic Publishing Co., INC., cap. 221, p. 313-341, 1991.

SEVASTINOV, V. I., Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of Biomaterials, in **High Performance Biomaterials – A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications.** Ssycher M., ed Technomic Publishing Co., INC., cap 221, p. 313–341, 1991.

SHAPIRA, M. O. et al. Heparin-Bonded Circuit Wiith Low Systemic Anticoagulation in a Patient UIT Heparin-Induced Trombocytopenia. **The Journal Extra-Corporeal Technology.** v. 31, n.3, p. 142-144. 1999.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. **Fundamentos da Circulação Extracorpórea.** Centro Editorial Alfa Rio. Rio de Janeiro. v. 1, cap. 14, p.255-273, 1995.

THOMAS, D.P.; KAKKAR, V. V. **Heparin-Chemestry and Clinical Usage.** Ed. J.M. Arrowsmith Ltd. Bristol- Great Britain. 1976, 376 p.

VALÊNCIA, G. **Lipid Containing Plastics.** European Patent. Barcelona. WO 87/02687. 07 de maio de 1987.

VAN STRAATEN, J.; PEPPAS, N. A . ATR-FTIR Analysis of Protein Adsorption on Polymeric Surfaces. **Journal of Biomaterials Science – Polymer Edition,** v. 2, p.113-125,1991.

VERRASTRO, T., LORENZI, T.F., WENDEL, S. N. **Hematologia e Hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica.** São Paulo. Ed. Atheneu, 1996. 303p.

VERT, M.; LI, S. M.; SPENLEHAUER, G. ; GUERIN, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. J. Mater. Science Mater. Med., v. 3, p. 432-446, 1992.

WILLIANS, D. F. Definitions in Biomaterials – **Progress in Biomedical Engineering.** Ed. Elsevier, v.4, Cap. 1, 1987.

XIANGHUAI, L. Recent Advance in Surface Treatment and its Applications in China. **Surface and Coatings Technology,** v. 131, p. 261-266, 2000.

YOUNG, B. R.; PITT, W.G.; COOPER, S. L. Protein Adsorption on Polymeric Biomaterials I. Absorption Isotherms. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 124, n.1, p.28-43, 1988.

ZISMAN, W. A, Contact Angle, Wettability, and adhesion. **Advances in Chemistry Series,** Fowkes, F. M., ed., v 43, p. 1, 1964.

Bibliografia Adicional Consultada

ALLINGER, N.L., **Química Orgânica.** Rio de Janeiro: Mc Guanabara Dois S.A., 961 p, 1978.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM - F895-84 Standard Test Method for agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity, 1984, p. 276-279.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION - AAMI 10993-1: Biological evaluation of medical devices - Part 1: Guidance on selection of tests, 1994, p. 1-18.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION - AAMI 10993-4: Biological evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests interactions with blood, 1994, p. 45-68.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION - AAMI 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1994, p: 69-82.

BERKOWSKI, L., KLEMPNER, D., Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Wiley Interscience, v.3, 2 ed, p. 271-339, 1987.

BRITISH STANDARD - BS 5736: Part 10: 1988, Evaluation of medical devices for biological hazards. Part 10. Method of test for toxicity to cells in culture of extracts from medical devices, 1988, p. 1-5.

BRUCK, S. D., **Blood compatible Synthetic Polymers- An introduction,** Ed. Charles C. Thomas, Maryland, USA, 1989, p. 3-25.

CRUZ, A. M.; PEROTA, M. L. R.; MENDES, M. T. R. **Elaboração de referencias (NBR 6023/2000).** Editora Interciência Ltda. Niterói-RJ., 2000, 71 p.

DEBSKI, R. ; BOROVETZ, H. ; MITCHELL, L. ; GRIFFITH, B. ; HAUBOLD, A. AND HARDESTY, R.The behavior of blood components following contact with an carbon surfaced membrane oxygenator , **Biomaterials** *1980,* Ed.; John Wiley and Sons Ltda, New York, USA, 1982; p. 498-503.

DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, Biological Evaluation of Medical Devices, New Jersey, USA, 1995, p. 1-6.

DUEK, E.A.R., MALMONGE, S.M., ZAVAGLIA, C.AC., **Tecnologia dos Materiais Poliméricos,** Apostila do programa de Cursos de Extensão, Faculdade de Engenharia Mecânica/DEMA/UNICAMP, 1999.

GARCIA, I. L. **Tratamentos Químicos de Superfícies de Poliuretanos de Grau Médico para Imobilição de Componentes não Trombogênicos.** Campinas,SP. FEQ, UNICAMP, 1995. Tese (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 74 p. 1995.

HAGE, E. **Compósitos e Blendas Poliméricas.** Campinas: FEM, UNICAMP, 1989. Apostila. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade estadual de Campinas, 1989. p. 2-121.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 10993-1: Biological evaluation of medical devices - Part 1: Guidance on selection of tests, 1992, p. 1-12.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 10993-12: Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials, 1996, p. 1-12.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 10993-4: Biological evaluation of medical devices - Part 4 : Selection of tests for interactions with blood, 1992, p. 1-20.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5 : Tests for citotoxicity: in vitro methods, 1992, p. 1-8.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 10993-9: Biological evaluation of medical devices - Part 9: Degradation of materials related to biological testing, 1994, p. 1-35.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 8296, Second edition, Plastics - Film and Sheeting - Determination of wetting tension, 1987, p. 1-4.

KESTENBACH, H.J., BOTTA, W.J.F, **Microscopia Eletrônica Transmissão e Varredura,** Apostila de Aperfeiçoamento oferecido através da Associação Brasileira de Metais, Universidade Federal de São Carlos, 1989.

KIRK –OTHMER, Encyclopedia of Chemical Technology, v. 6, p 335-490, 1979.

MALCZEWSKI, R., Designing and Evaluating a Biocompatibility Test Program, **Medical Plastics and Biomaterials**, 1994, p. 1-6.

PADILHA, A.F., AMBROZIO, F.F., **Técnicas de Análise Micro Estrutural,** p.85-86, 1987.

ROSA, D. S. **Correlação entre Envelhecimentos Acelerado e Natural do polipropileno Isotático.** Campinas,SP. FEQ, UNICAMP, 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 232 p. 1996.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SCHUTT, W. , THOMANECK, U. , GRUNNER, G. , KRAEFT, S. , REINHOLZ, F. AND WALDSCHLAGER, U., New methods for the investigation of Blood-Biomaterial Interaction, **Artificial Organs**, 19(8), 1995, p. 847-851.

VAN VLACK, L. H. **Princípios da Ciência dos Materiais.** São Paulo: Edgard Blücher, 1970. Cap.1: Características exigidas nos materiais usados em engenharia. p. 1-11.