

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS MATERIAIS**

**TRATAMENTOS QUÍMICOS DE SUPERFÍCIES DE POLIURETANO DE
GRAU MÉDICO PARA IMOBILIZAÇÃO DE COMPONENTES NÃO
TROMBOGÊNICOS.**

Autora: Inês Lopes Garcia

Orientadora: Prof. Dr^a. Lúcia H. Innocentini Mei

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.**

Janeiro de 1995

Campinas - SP

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	F/UNICAMP
	G165t
V. E.	
PREÇO	R\$ 279,87
	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/03/96
N.º CPD	

CM-00089458-1

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

G165t Garcia, Inês Lopes
Tratamentos químicos de superfícies de poliuretano de grau médico para imobilização de componentes não trombogênicos / Inês Lopes Garcia.--Campinas, SP: [s.n.], 1995.

Orientador: Lúcia H. Innocentini Mei.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Heparina. 2. Polímeros. 3. * Tratamento superficial.
I. Mei, Lúcia H. Innocentini. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Aos meus pais, por todo amor e incentivo. Que seus exemplos sirvam-me sempre de estímulo.

Agradecimentos

À Profª. Drª. Lúcia Helena Innocentini Mei pela orientação dedicada a este trabalho.

À Dow Chemical Co., Ultraquímica e Bayer S.A., pelos reagentes doados.

Ao Departamento de Bioengenharia do Instituto do Coração pela doação dos filmes de poliuretano, em especial:

À Engª. Marina Maizato.

Ao Instituto de Química, à Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp e à Telebrás pela disponibilidade de equipamentos para a realização das análises, em especial :

À Rita, pelo auxílio nas análises de MEV,

À Márcia, pelo auxílio nas análises de MIR e

À Lúcia, pelo auxílio no uso do Microscópio Ótico.

Ao Hemocentro do Hospital de Clínicas da Unicamp pela realização dos testes de biocompatibilidade, em especial:

À Drª. Joyce M. A. Bizzachi.

Ao Dr. Valder R. Arruda.

Às técnicas Carla, Daniela, Veruska, Stella e Daniela, pelo auxílio no laboratório e pela amizade.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química, em especial ao Departamento de Tecnologia de Polímeros.

À CAPES pela bolsa de estudo oferecida.

Às minhas irmãs Nancy e Simone pelo incentivo.

Aos amigos do Grêmio, pelos anos de apoio, carinho e discussões sem os quais algumas etapas deste trabalho pareceriam impossíveis.

À todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Inês

Resumo

O poliuretano segmentado é muito utilizado na área médica, principalmente em dispositivos em contato com o sangue.

Visando aumentar a tromboresistência deste polímero, neste trabalho foram utilizados dois métodos de tratamento superficial para imobilização de heparina. O primeiro tratamento incluiu o uso de poli(óxido de etieno) como espaçador para aumentar a acessibilidade da sequência ativa da molécula. O segundo método usou a heparina parcialmente degradada evitando sua inativação durante o procedimento de imobilização.

Como comparação utilizou-se os mesmos métodos para imobilizar albumina, que atua como passivadora da superfície, evitando a adesão de plaquetas.

As superfícies foram avaliadas por métodos colorimétricos, testes de biocompatibilidade *in vitro*, medidas de ângulo de contato e técnicas espectroscópicas.

Os resultados demonstraram a ligação efetiva da heparina e albumina e um significativo aumento da tromboresistência das superfícies.

Abstract

In order to create more thromboresistant surfaces, we modified segmented polyurethane films immobilizing heparin by two different methods. The first treatment used polyethylene oxide as a spacer to increase the accessibility of the active sequence of the molecule. The second one includes the use of heparin partially degraded avoiding the decrease of its anticoagulant activity in the immobilization procedure.

To compare the efficiency of the treatments, the same methods were used to graft albumin, a passivating protein, on the polymer surface.

The surfaces were evaluated by colorimetric methods, *in vitro* biocompatibility measurements and spectroscopical techniques.

The results demonstrated the effective linkage of the molecules and significant improvement of the thromboresistance.

Sumário:

Capítulo 1. Introdução	1
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Conceitos básicos	3
2.1.1. Biomateriais e biocompatibilidade	3
2.1.1.1. Durabilidade mecânica e biológica	3
2.1.1.2. Compatibilidade com os tecidos e com o sangue	4
2.1.2. Formação de trombos	5
2.1.2.1. Hemostase, coagulação e trombogênese	6
2.1.2.2. Trombogênese em superfícies artificiais	9
2.1.3. Polímeros biomédicos	10
2.2. Poliuretano	11
2.2.1. Histórico do poliuretano	11
2.2.2. Elastômeros de poliuretano	12
2.2.3. Química do isocianato	13
2.2.3.1. Reações principais	14
2.2.3.2. Reações laterais	15
2.2.4. Matérias-primas na síntese do poliuretano	17
2.2.4.1. Isocianatos	17
2.2.4.2. Extensores de cadeia	18
2.2.4.3. Polióis	19
2.2.5. Síntese do poliuretano	22
2.2.5.1. Química	22
2.2.5.2. Meio reacional	24
2.3. Poliuretanos biomédicos	25
2.3.1. Poliuretanos comerciais	25
2.3.2. Poliuretanos modificados superficialmente	28
2.4. Heparina	30
2.4.1. Química da heparina	30

2.4.2. Mecanismo de ação da heparina	31
2.4.3. Métodos de imobilização da heparina	31
2.5. Propriedades superficiais e caracterização	34
2.5.1. A superfície	34
2.5.2. Métodos de caracterização	35
2.5.2.1. Ângulo de contato e molhabilidade	35
2.5.2.2. Espectroscopia de infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR)	37
2.5.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
Capítulo 3. Materiais e métodos	42
3.1. Materiais	42
3.2. Métodos	42
3.2.1. Método 1: Enxertia do PEO e imobilização de heparina e albumina	43
3.2.2. Método 2: Imobilização de heparina parcialmente degradada e albumina utilizando-se o PEI como agente de ligação	44
3.2.3. Método 3: Concentração de heparina imobilizada	46
3.2.4. Método 4: Concentração de albumina imobilizada	46
3.2.5. Método 5: Teste de adesão de plaquetas	46
3.2.6. Método 6: Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA)	47
3.2.7. Método 7: Tempo de protrombina (TP)	47
3.2.8. Método 8: Espectroscopia de infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR)	47
3.2.9. Método 9: Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
3.2.10. Método 10: Medidas de ângulo de contato	48
Capítulo 4. Resultados e discussão	49
Capítulo 5 . Conclusões e sugestões	68

Capítulo 1. Introdução

No campo médico, os materiais poliméricos vêm 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 específicas dessa área. Assim, eles podem apresentar a moldabilidade necessária para os dispositivos de filtração, flexibilidade, transparência para facilitar observações, rigidez, resistência à rachaduras ou quebras, além de outras propriedades de interesse.

Os polímeros podem ser usados como dispositivos descartáveis para reduzir riscos de contaminação e desenvolvimento de infecções, bem como serem esterilizados e reutilizados. Pode-se encontrá-los em vários setores da área médica, nas enfermarias, nos laboratórios e nas salas de cirurgia, para os mais variados fins.

Uma das áreas de extrema importância dentro da medicina está relacionada ao uso de implantes e dispositivos para diversos fins. O uso de materiais poliméricos para várias aplicações como a substituição de ossos e/ou tecidos, a circulação extracorpórea em cirurgias cardíacas ou hemodiálises, os diversos tipos de endoscopia, a implantação de marcapassos, a liberação controlada de drogas e o desenvolvimento de kits para diagnóstico, dentre outras, têm sido alvo de muitas pesquisas nos centros mais renomados do exterior.

Dentre os polímeros mais usado na área médica estão o poliuretano e o silicone, conhecidamente os mais biocompatíveis, seguidos por poliestireno, polietileno, polipropileno, epoxi, teflon e outros.

O poliuretano é muito utilizado em dispositivos em contato com o sangue, como por exemplo o coração artificial, válvulas cardíacas, equipamentos de circulação extracorpórea, entre outros.

Apesar de apresentar relativamente boa biocompatibilidade, se faz necessária a administração de anticoagulantes por via venosa nos pacientes que necessitam utilizar algum desses dispositivos para evitar a formação de coágulos. Isso limita o tempo de utilização, pois pode ocasionar problemas, como por exemplo hemorragias.

Com o avanço das técnicas cirúrgicas, o desenvolvimento de materiais compatíveis com o organismo humano se tornou uma necessidade para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que necessitem a utilização de implantes, sejam eles definitivos ou temporários.

No Brasil, as pesquisas nessa área são muito recentes, existindo poucos grupos que se dedicam ao estudo de materiais para a área médica. No Departamento de Tecnologia de Polímeros, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, os primeiros trabalhos foram feitos pela equipe do Prof. Dr. Edison Bittencourt sobre o desenvolvimento de materiais para teste Elisa [1], bolsas de sangue [2] e seringas [3].

Dando continuidade a essa linha de pesquisa, este trabalho teve por objetivo a imobilização de macromoléculas na superfície do poliuretano, aumentando a sua biocompatibilidade. A contribuição esperada é iniciar na FEQ um grupo de pesquisa sobre materiais compatíveis com o organismo humano e/ou tromboresistentes, com o aprendizado de métodos de tratamento superficial e de técnicas de análise específicas para materiais biocompatíveis com posterior utilização destes conhecimentos por institutos médicos e/ou de pesquisas, como por exemplo, o Instituto do Coração do Hospital de Clínicas de São Paulo.

Capítulo 2. Revisão bibliográfica

2.1. Conceitos básicos

2.1.1. Biomateriais e biocompatibilidade

A história dos biomateriais, isto é, o uso de materiais naturais ou artificiais na restauração das funções de tecidos ou partes de órgãos, começa em tempos remotos. Porém, foi somente a partir de 1800 que iniciou-se realmente a utilização de metais em cirurgias de reconstrução óssea e nos anos 30, com o começo da indústria de plásticos, iniciou-se o uso de polímeros em uma variedade de aplicações de reconstituição. Com o advento da 2ª Guerra Mundial iniciaram-se as pesquisas de implantes e dispositivos extracorpóreos. Em quase todos os casos, utilizou-se inicialmente um material desenvolvido para uso industrial [4].

Atualmente, os materiais biomédicos incluem os metais, os cerâmicos e os polímeros naturais, sintéticos e seus compósitos [5]. As principais exigências para que os biomateriais sejam aceitos podem ser divididas em duas categorias:

- Durabilidade mecânica e biológica;
- Compatibilidade com os tecidos e com o sangue.

2.1.1.1. Durabilidade mecânica e biológica [6]

Os dispositivos utilizados para implantes podem sofrer muita tensão, dependendo da natureza da substituição. Isto se torna mais crítico no caso de implantes por tempo prolongado e envolve

propriedades do material como módulo de elasticidade, tensão de escoamento e tensão de ruptura, resistência ao impacto e outras.

O projeto do dispositivo também pode afetar a sua durabilidade, pois ele determinará a configuração e severidade de deformação que a peça irá sofrer. Adicionalmente, o material poderá ser reforçado com outros materiais mais resistentes, como é o caso da fibra de carbono, obedecendo os critérios adequados para sua aceitação.

Os fatores que afetam a durabilidade do material no sistema biológico podem ser físicos (movimentos de flexão e compressão) e químicos, como corrosão, por exemplo. Um tempo prolongado em contato com o sangue e tecidos também pode provocar uma redução da estabilidade do material .

2.1.1.2. Compatibilidade com os tecidos e com o sangue

Geralmente o organismo reage a materiais estranhos a fim de eliminá-los ou isolá-los. Se o implante é química e fisicamente inerte ao tecido, somente uma fina camada de colágeno encapsula o material estranho; caso contrário, ocorre inflamação no local, atrasando o processo de cicatrização normal, o que resultará na formação de tecido granular. A espessura dessa camada pode ser utilizada como medida da rejeição do material. Em relação ao grau de resposta do tecido, este pode variar com a natureza física e química dos implantes [7].

É importante salientar que a absorção gradual dos materiais ou de seus produtos de degradação também pode causar efeitos sistêmicos indesejáveis, ou seja, efeitos antigênicos ou tóxicos como anemia, ascite, hipertensão, nefrite e tumorigenicidade [6].

Os efeitos locais e sistêmicos dos materiais são muito importantes, mas assim como no caso

da durabilidade, os efeitos críticos podem levar algum tempo para aparecer. Entretanto, a compatibilidade com o sangue é imediatamente aparente, podendo ocorrer dois problemas; o sangue coagular causando trombose e as células vermelhas serem danificadas (hemólise) [8,9]

2.1.2. Formação de trombos [10]

O sangue é um fluido complexo composto de células vermelhas, células brancas e plaquetas, suspensos em uma porção líquida, o plasma, que consiste de uma solução de proteínas, moléculas inorgânicas e eletrólitos.

1. Proteínas

Muitas proteínas estão envolvidas nos processos de hemostase e trombose, incluindo algumas proteínas principais como a albumina, a γ -globulina e o fibrinogênio, e algumas secundárias como a fibronectina, a α_2 -macroglobulina e o fator de von Willebrand. Algumas proteínas plasmáticas também são conhecidas por participarem da cascata de coagulação, levando à polimerização do fibrinogênio gerando fibrina, cuja reação pode ser representada por:

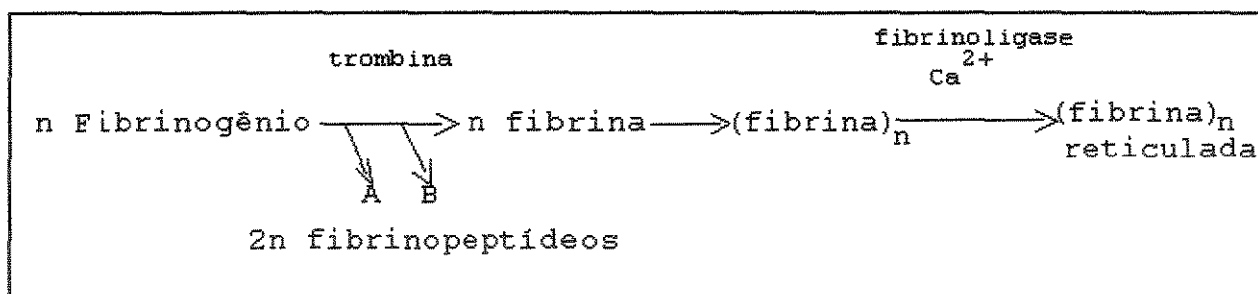


Figura 2.1. Polimerização do fibrinogênio dando origem à fibrina [10]

2. Plaquetas

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, não são células, mas fragmentos de células da medula óssea (megacariócitos). Possuem a forma de disco sob condições fisiológicas normais. Quando ativadas por estímulos fisiológicos ou externos, as plaquetas podem sofrer transformação espacial, liberando agentes agregadores como o difosfato de adenosina (ADP) ou a serotonina.

3. Células vermelhas e células brancas

As células vermelhas do sangue, também conhecidas como eritrócitos, têm o formato de disco bicôncavo. Traumas mecânicos ou mudanças na pressão osmótica podem causar ruptura ou hemólise das mesmas. Por sua vez, as células brancas ou leucócitos podem ser divididas em dois grupos principais: granulócitos, ou leucócitos polimorfonucleares, que exibem a propriedade de fagocitose (ingestão de materiais) e os leucócitos não-granulares, incluindo os linfócitos e os monócitos, que também realizam fagocitose.

2.1.2.1. Hemostase, coagulação e trombogênese [11]

- Hemostase

Hemostase é a interrupção espontânea da hemorragia de vasos sanguíneos danificados, os quais se contraem imediatamente, promovendo em segundos a adesão de plaquetas pela ligação de trombócitos ao colágeno exposto. Por sua vez, as plaquetas também se ligam entre si formando agregados de plaquetas, as quais perdem suas membranas individuais. Uma massa viscosa é então

trombócitos ao colágeno exposto. Por sua vez, as plaquetas também se ligam entre si formando agregados de plaquetas, as quais perdem suas membranas individuais. Uma massa viscosa é então formada, denominada metamorfose viscosa. Esse "tampão" de plaquetas pode parar a hemorragia rapidamente, mas deve ser reforçado por fibrina para manter a eficiência por longo tempo. Esse reforço é iniciado pelo estímulo local do processo de coagulação através do colágeno exposto, do conteúdo e das membranas das plaquetas.

Dias depois, um crescimento de fibroblastos ao longo do reforço de fibrina repara o corte vascular permanentemente por meio de um acabamento de fibrose.

- Coagulação sanguínea

A coagulação do sangue está vinculada à formação de fibrina pela interação de doze proteínas em uma série de reações proteolíticas em cascata, também conhecida como cascata de coagulação, figura 2.2.

Em cada passo, um fator coagulante sofre proteólise limitada e se torna uma protease ativa. Esta enzima ativa o próximo fator até que finalmente um coágulo de fibrina insolúvel seja formado.

O precursor solúvel da fibrina circula no sangue como fibrinogênio (I). O fibrinogênio é um substrato para a enzima trombina (IIa), uma protease que é formada durante o processo de coagulação pela ativação de uma proenzima, protrombina (II). A protrombina é convertida a trombina pelo fator X ativado na presença do fator V, Ca^{2++} e fosfolípido.

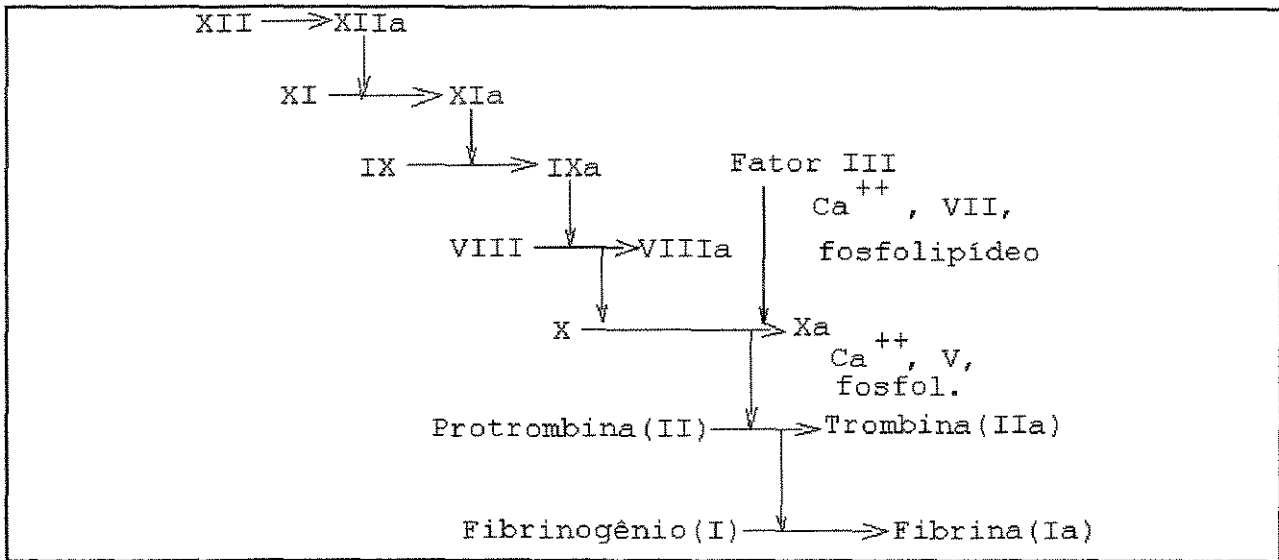


Figura 2.2. Esquema simplificado da coagulação sanguínea [11].

Dois caminhos distintos levam à formação do fator X ativado. No sistema intrínseco, todos os fatores protéicos necessários à coagulação estão presentes no sangue. No sistema extrínseco, lipoproteínas denominadas tromboplastinas (fator III), que não estão presentes no sangue, ativam a coagulação ao nível do fator X.

No sistema intrínseco, o princípio ativador da protrombina, fator Xa, requer alguns minutos para a sua formação, enquanto que o sistema extrínseco é ativado em segundos, pois as primeiras reações que consomem tempo são contornadas.

O sistema intrínseco é ativado quando as estruturas subendoteliais são expostas ao sangue durante a lesão do vaso sanguíneo. O sistema extrínseco é ativado por danos ao tecido, levando à liberação de tromboplastina.

Ao nível do fator X, os dois processos convergem.

- Trombogênese

A trombogênese é um estado alterado da hemostase. Um trombo intravascular resulta de um distúrbio patológico da hemostase, enquanto que um trombo arterial ou branco é iniciado pela adesão das plaquetas circulantes à parede do vaso sanguíneo. Esta adesão inicial e a liberação do difosfato de adenosina (ADP) das plaquetas é seguido pela agregação ou interação plaqueta-plaqueta. O trombo cresce a proporções oclusivas nas áreas de fluxo sanguíneo mais lento. Quando o trombo obstrui o vaso sanguíneo, ocorre estase, ou interrupção do fluxo sanguíneo no local e um trombo vermelho se forma ao redor do trombo branco.

O trombo vermelho se desenvolve nas áreas de estase, ou baixo fluxo sanguíneo em veias, e se assemelha ao coágulo sanguíneo formado *in vitro*. A maior parte é uma rede de fibrina misturada com células vermelhas e plaquetas.

2.1.2.2. Trombogênese em superfícies artificiais [12,13]

O primeiro evento que ocorre após o sangue entrar em contato com uma superfície estranha é a deposição de uma camada de proteína na interface sangue-material. Existem diversas pesquisas sobre o estudo da adsorção de proteínas em diferentes superfícies [14,15,16]. Fibrinogênio é a principal proteína adsorvida na superfície, mas muitas outras proteínas plasmáticas também podem ser depositadas, incluindo albumina e γ -globulina. Em geral, fibrinogênio e γ -globulina se adsorvem mais fortemente a superfícies que apresentam trombogênicidade, enquanto a albumina tende a se adsorver em superfícies tromboresistentes.

À adsorção de proteínas na superfície, segue-se a deposição de plaquetas. Um estágio crítico

é atingido aproximadamente um minuto após o contato com o sangue, quando as plaquetas têm seu primeiro contato de adesão.

O trombo formado em superfícies artificiais possui os mesmos componentes (plaquetas, fibrina, células vermelhas e células brancas) que o formado em superfícies naturais, entretanto o tamanho, a estrutura e a relação dos componentes podem ser diferentes. A formação e o crescimento de trombos é influenciada pelo tipo da superfície e pela taxa do fluxo sanguíneo. Superfícies estranhas podem levar aos mesmos efeitos de estase e embolia que ocorrem no processo de trombogênese no organismo.

2.1.3. Polímeros biomédicos

Os polímeros vêm sendo cada vez mais utilizados na área médica. Eles apresentam as mais variadas propriedades mecânicas, indo de materiais rígidos a flexíveis, de termoplásticos a termorrígidos, dependendo de suas características químicas e estruturais. Eles também podem ser naturais, como a borracha natural e a celulose, ou sintéticos, como a borracha de silicone, o poliuretano e os hidrogéis.

O polímero sintético mais utilizado na área médica é a borracha de silicone, que é composta de aproximadamente 65% de polidimetilsiloxano e 35% de sílica como carga. Outros polímeros também muito utilizados são o policloreto de vinila (PVC), o polietileno (PE), o politetrafluoroetileno (Teflon®), o poliéster termoplástico ou PET (Dacron®) e o nylon. O PVC é provavelmente o polímero mais usado em dispositivos de implantes [17].

Dentre os polímeros restantes, os poliuretanos formam uma classe de materiais muito especiais, sendo utilizados em próteses vasculares, filtros de sangue, catéteres, válvulas cardíacas e

órgãos artificiais, incluindo o coração artificial.

Essa diversidade de aplicações se deve tanto à ampla faixa de propriedades mecânicas que o poliuretano apresenta, bem como a sua relativamente boa compatibilidade com o sangue e tecidos.

Essa variedade é resultado da combinação de diferentes componentes do poliuretano, como será visto a seguir, tornando-o amplamente utilizável na área médica [18].

2.2. Poliuretano

2.2.1. Histórico do Poliuretano

O poliuretano forma uma classe de polímeros sintéticos que tanto podem ser macios e borrachosos como podem ser rígidos, dependendo da natureza química e das quantidades dos reagentes utilizados em sua síntese.

Desenvolvido por Otto Bayer em 1937, no ano seguinte este polímero despertou o interesse da Du Pont Company que começou a trabalhar com a química do mesmo [19].

Em 1962, Mirkovitch e col. [20] usaram o poliesteruretano (Estane®) como material para órgãos artificiais. Entretanto, esse material era facilmente degradado *in vivo*. Algum tempo depois, Boretos e Pierce [21] introduziram o uso de polieteruretano como biomaterial, o qual já fora desenvolvido em 1959 por químicos textéis que estavam procurando materiais mais resistentes que a borracha natural à óleos, à hidrólise, à oxidação e à degradação térmica.

O poliuretano segmentado, baseado na tecnologia de fabricação da Lycra®, foi patenteado pela Ethicon Inc. como Biomer®. Desde então, vários implantes foram feitos com polieteruretano.

2.2.2. Elastômeros de Poliuretano

Os copolímeros em bloco de poliuretano são uma importante subclasse da família dos elastômeros termoplásticos. Eles são compostos de blocos alternados de segmentos rígidos e segmentos flexíveis. O segmento flexível é um poliéster, poliéter ou um polialquil-diol, com peso molecular entre 500 e 5000. O segmento rígido é, normalmente, um diisocianato aromático que foi polimerizado com um diol ou uma diamina de baixo peso molecular, chamado extensor de cadeia, para produzir um segmento uretano aromático ou uretano-uréia de peso molecular entre 300 e 3000. O macroglicol e o diisocianato se combinam para formar um copolímero em bloco tipo $(AB)_n$ (Figura 2.3).

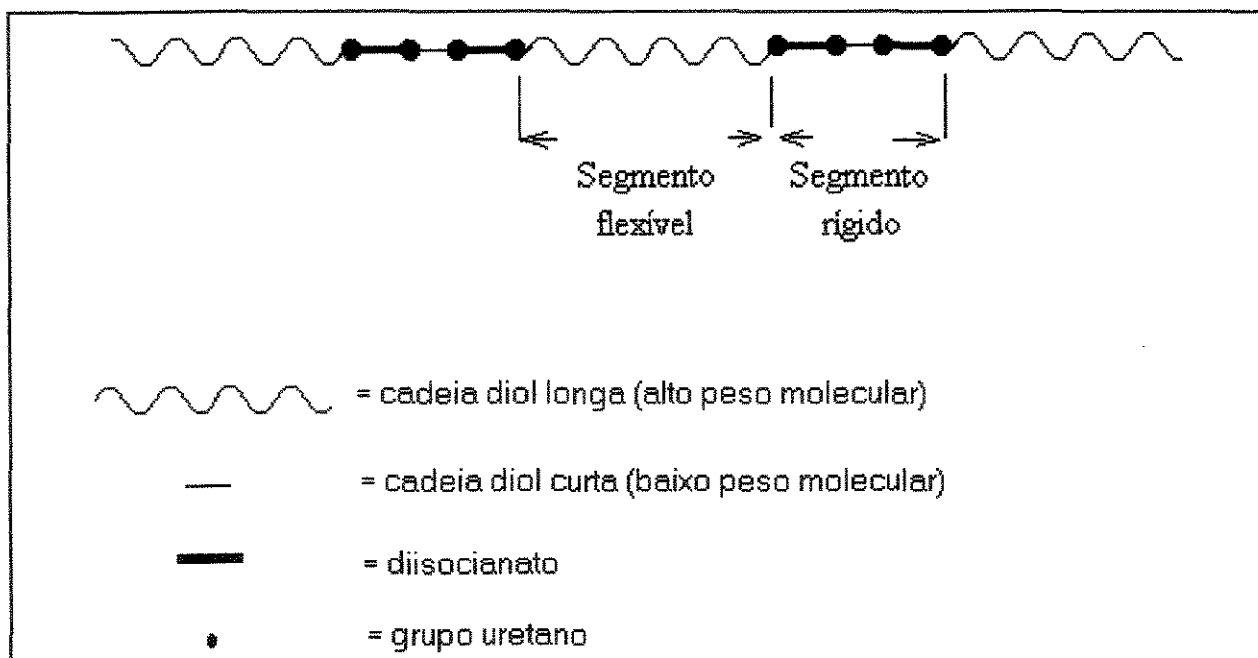


Figura 2.3. Estrutura do poliuretano segmentado [22].

Devido às diversas possibilidades de pesos moleculares e razões molares possíveis para cada tipo de segmento, uma ampla faixa de propriedades físicas pode ser encontrada. Esses materiais podem ser quebradiços e duros, podem ser macios e flexíveis, ou alguma coisa intermediária.

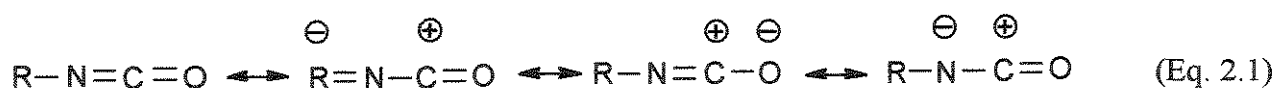
Os poliuretanos tipicamente exibem uma morfologia com duas fases, com as seguintes propriedades:

1. Os segmentos rígidos de isocianatos se separam em domínios semicristalinos.
2. Os segmentos flexíveis, macroglicóis, formam uma matriz amorfa na qual os domínios rígidos podem estar parcialmente dispersos.
3. Os domínios rígidos podem agir como sítios multifuncionais de ligações cruzadas e como reforços, resultando em materiais que possuem comportamento elastomérico e alto módulo.
4. A força motriz para a separação em domínios é fornecida pela incompatibilidade química dos segmentos rígidos e flexíveis.

Os fatores que afetam o grau de separação das fases incluem a formação de pontes de hidrogênio, comprimento dos segmentos, polaridade, cristalinidade e composição.

2.2.3. Química do Isocianato [22,23]

A química envolvida na síntese do poliuretano está baseada nas reações envolvendo o grupo isocianato. Sua estrutura eletrônica consiste de diversas estruturas de ressonância, as quais podem ser vistas pela equação 2.1 abaixo:



Por causa da existência de estruturas múltiplas, diversas classes de reações envolvendo o grupo isocianato são possíveis. A reação pode ocorrer nas ligações C=N de várias maneiras, incluindo a formação de adutos, oligomerização e reações de adição. Destas reações, somente oligomerização e adição são importantes na formação de poliuretanos.

2.2.3.1. Reações Principais

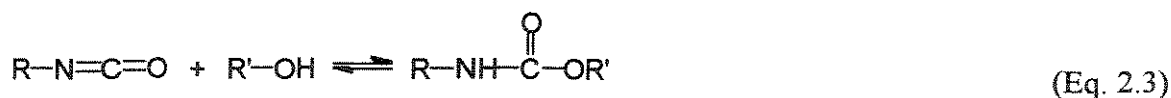
A reação mais importante dos isocianatos é a formação de derivados de ácido carbâmico pelo ataque nucleofílico de X no carbono do grupo isocianato, como segue:



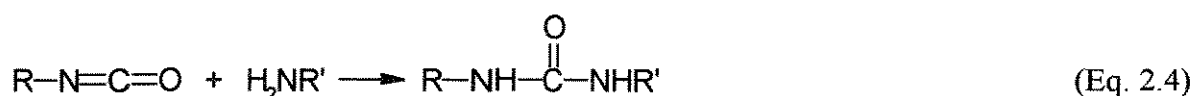
A reação nucleofílica pode ser fortemente influenciada por catalisadores; enquanto os compostos ácidos retardam a reação, os compostos básicos a aceleram. Os compostos metálicos também têm um efeito de aceleração.

Os reagentes mais utilizados nas reações com o isocianato são os compostos contendo grupos OH. Eles são adicionados aos isocianatos sob condições brandas, formando ésteres de ácidos carbâmicos, mais conhecidos como grupos uretano (Equação 2.3).

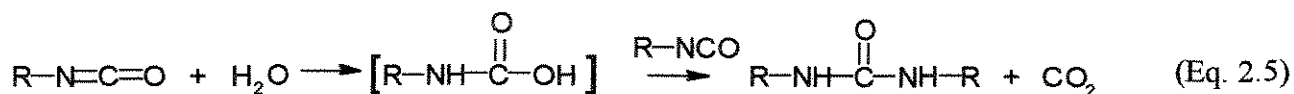
Álcoois primários, álcoois secundários e fenóis mostram uma reatividade decrescente nessa ordem.



Aminas primárias e secundárias também reagem com os isocianatos, para formar uréia, de acordo com a equação abaixo:

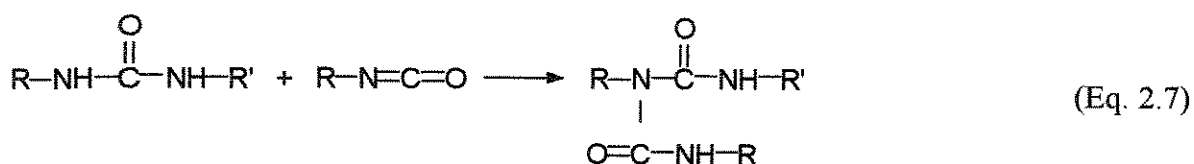
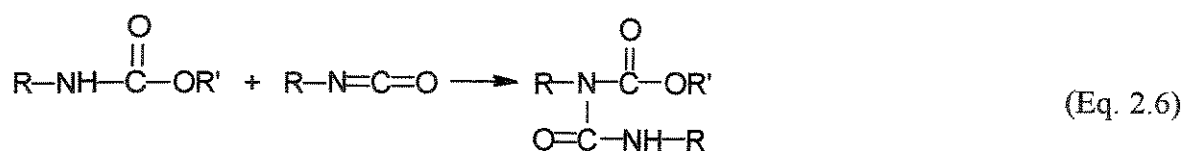


Ao lado dessas duas reações básicas, há uma terceira fundamental. É a reação dos isocianatos com água que é essencial para a formação de espumas de poliuretano. Nesta reação, o primeiro produto é o ácido carbâmico que, não sendo estável, libera dióxido de carbono, formando a amina correspondente, que imediatamente reage com o isocianato ainda presente no meio reacional, formando a uréia simétrica:



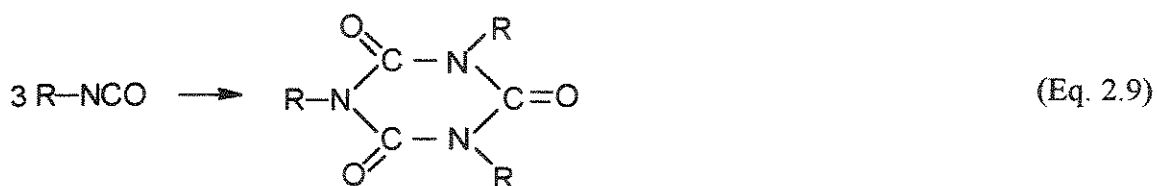
2.2.3.2. Reações Laterais

As ligações uretano e uréia também reagem com o isocianato, particularmente em temperaturas elevadas. Os produtos dessas reações são chamados alofanatos e biuretos, respectivamente, como mostrado nas equações 2.6 e 2.7.



A formação de alofanato ou biureto resulta em ligações cruzadas na cadeia polimérica.

O segundo tipo de reação lateral envolvendo o grupo isocianato é a formação, sob condições especiais, de espécies oligoméricas. Dímeros podem ser formados de isocianatos aromáticos e trímeros podem ser produzidos de isocianatos alifáticos e aromáticos. A reação do dímero é facilmente reversível acima de 150°C, enquanto que o trímero é um complexo estável mesmo a temperaturas relativamente altas. As reações de formação dos dímeros e trímeros podem ser vistas nas equações 2.8 e 2.9, a seguir:



2.2.4. Matérias-Primas na Síntese do Poliuretano

2.2.4.1. Isocianatos

Os dois isocianatos mais utilizados são o diisocianato de tolueno (TDI) e o bis(p-fenil diisocianato) de metileno ou 4,4' diisocianato de difenilmetano (MDI). O TDI é mais barato que o MDI, porém é menos reativo e mais tóxico, e o polímero baseado no MDI possui propriedades físicas superiores. O TDI é, normalmente, preparado como uma mistura isomérica de 2,4-TDI e 2,6-TDI. O MDI é cristalizável, enquanto que o TDI não cristaliza no estado sólido.

Outros diisocianatos aromáticos como o diisocianato de naftaleno (NDI) e o 3,3' diisocianato de bitolueno (TODI) também podem resultar em polímeros de alto desempenho, mas a um custo mais alto.

Como os diisocianatos aromáticos e os polímeros feitos a partir deles são instáveis quando expostos à luz, os isocianatos alifáticos encontram ampla utilização em aplicações de revestimentos. Isocianatos alifáticos típicos incluem 1,6-diisocianato de hexano (HDI), diisocianato de isoforona (IPDI) e bis p-ciclohexil diisocianato de metileno (H_{12} MDI).

Além de serem mais estáveis à luz, os poliuretanos baseados em isocianatos alifáticos apresentam uma maior resistência à hidrólise e à degradação térmica. Porém isso pode provocar um decréscimo nas propriedades mecânicas do material.

As estruturas químicas dos isocianatos comerciais são mostradas na figura 2.4.

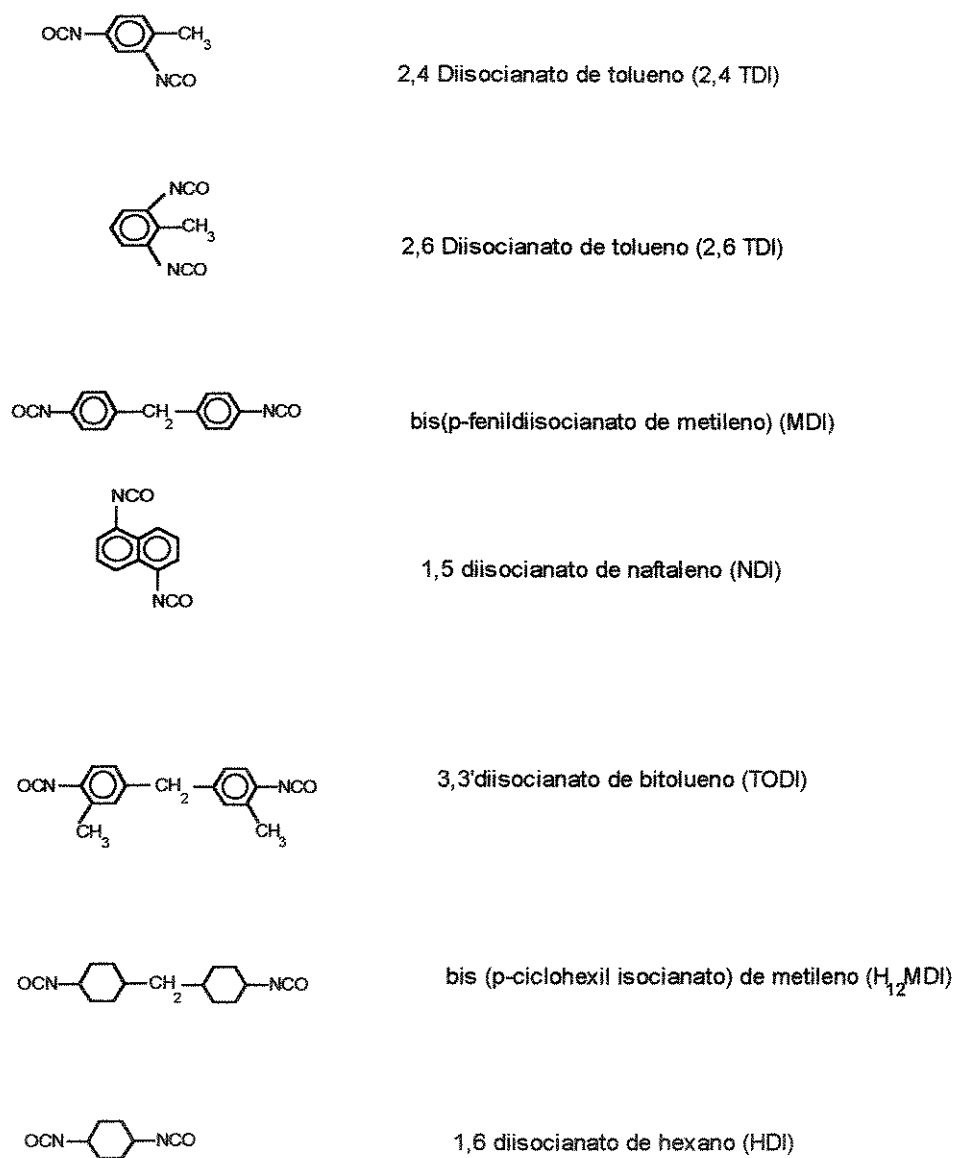


Figura 2.4. Isocianatos típicos usados na síntese do poliuretano.

2.2.4.2 Extensores de Cadeia

A reação de quantidades equimolares de macroglicol e diisocianato normalmente resulta em um polímero que não apresenta separação de microfases e pode possuir propriedades físicas pobres. Um

extensor de cadeia difuncional de baixo peso molecular, quando reage com um diisocianato, resulta em um segmento rígido, produzindo um poliuretano cuja microestrutura apresenta duas fases e propriedades físicas desejáveis. Normalmente, um domínio rígido altamente cristalino leva a um poliuretano com melhores propriedades físicas.

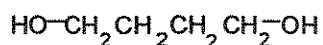
A proporção de macroglicol para extensores de cadeia pode ser variada para produzir polímeros com propriedades mecânicas diferenciadas, devido a variação na fração em peso do segmento rígido no copolímero em bloco.

Os extensores de cadeia do poliuretano podem ser separados em duas classes gerais: os dióis e diaminas aromáticas e os dióis e diaminas alifáticas correspondentes. Em geral, extensores de cadeia alifáticos produzem materiais mais flexíveis do que os aromáticos. Também os materiais obtidos de diaminas geralmente possuem propriedades superiores quando comparados com polímeros similares preparados com extensores de cadeia dióis equivalentes.

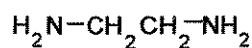
Os extensores de cadeia mais utilizados comercialmente incluem o butanodiol, a etilenodiamina, o 4,4'-bis(2-cloroanilina) de metileno (MOCA), o etileno glicol e o hexanodiol, cujas estruturas estão representadas na figura 2.5.

2.2.4.3. Polióis

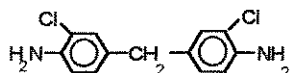
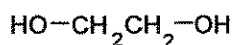
Os polióis disponíveis para a síntese de elastômeros incluem poliéteres, poliésteres, polialquilas e polidimetilsiloxanos. Tradicionalmente, os poliuretanos têm sido produzidos com segmentos flexíveis de poliéter ou poliéster. Os poliuretanos baseados em poliésteres possuem propriedades físicas relativamente boas, entretanto, ao contrário dos poliuretanos de poliéter, são suscetíveis à quebra hidrolítica.



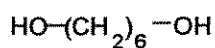
1,4-butanodiol



etileno diamina

bis (2-cloroanilina) de 4,4' metileno
(MOCA)

Etileno glicol



Hexanodiol

Figura 2.5. Extensores de cadeia típicos para o PU.

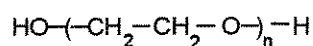
Os materiais derivados de poli(óxido de etileno) ou PEO mostram baixa resistência à água devido a natureza hidrofílica do segmento flexível. Os poliuretanos baseados no poli(óxido de propileno) são muito flexíveis, sendo usados como selantes e gaxetas flexíveis. O poliéter que resulta em um poliuretano com as melhores propriedades físicas é o poli(óxido de tetrametileno) ou (PTMO ou PTMEG). Os poliuretanos preparados com este segmento mostram um nível de resistência mecânica comparável ao poliésteruretano e possuem estabilidade hidrofílica relativamente boa e portanto resulta em uma maior resistência à água.

Os poliuretanos produzidos a partir de poliisobutileno e polibutadieno hidroxilados hidrogenados mostram excelente resistência à luz, degradação térmica e hidrólise. Infelizmente, a síntese desses materiais é difícil e as propriedades físicas do polímero resultante são pobres quando

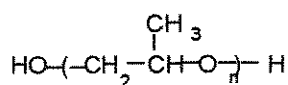
comparadas aos poliuretanos convencionais.

O uso de polidimetilsiloxano glicol (PDMS) como segmento flexível leva a poliuretanos com boas propriedades a baixas temperaturas. A temperatura de transição vítrea do PDMS é cerca de -123°C, o que permite o uso destes elastômeros a temperaturas muito baixas.

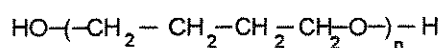
As estruturas dos polióis discutidos acima estão mostradas na figura 2.6.



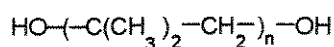
Poli (óxido de etileno) (PEO)



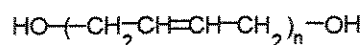
Poli (óxido de propileno) (PPO)



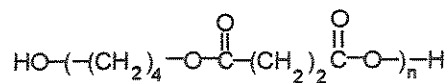
Poli (óxido de tetrametileno) (PTMO)



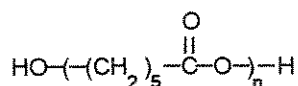
Poliisobutileno hidroxilado (PIB)



1,4-Polibutadieno hidroxilado (PBD)



Poli (adipato de etileno)



Policaprolactona

Figura 2.6. Estruturas químicas de polióis usados como segmentos flexíveis.

2.2.5. Síntese de Poliuretano

2.2.5.1. Química

O processo mais comum de síntese de poliuretano é a preparação do pré-polímero, que está ilustrado na figura 2.7.

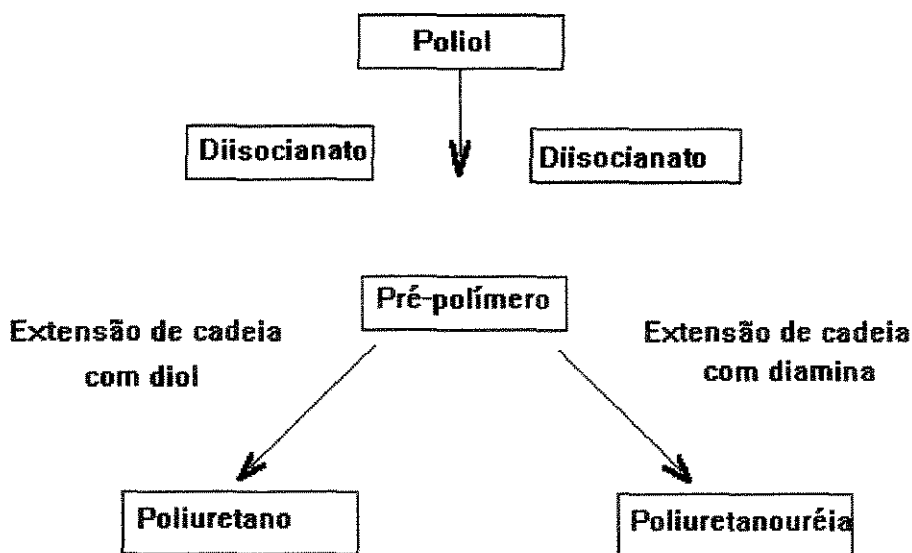
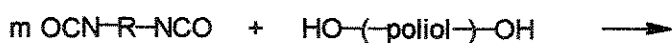
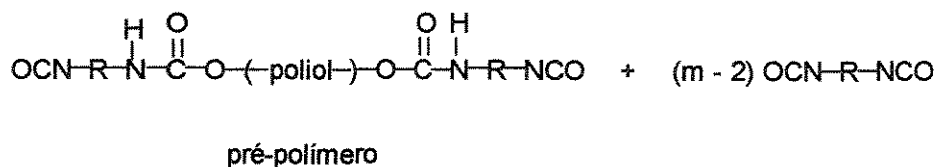


Figura 2.7. Processo de dois estágios para a síntese do poliuretano e poliuretanoúria.

Neste método, o polímero é formado em dois estágios. Inicialmente, o diisocianato e o polioli reagem entre si para formar um oligômero intermediário de peso molecular entre 100 e 5000, segundo a equação abaixo:



(Eq. 2.10)

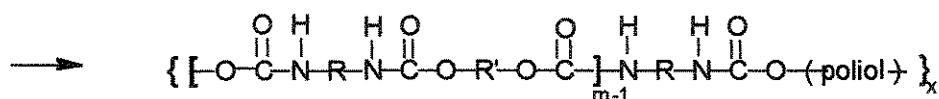


O pré-polímero, que é formado normalmente, é um líquido viscoso espesso, ou um sólido de baixo ponto de fusão. Este pré-polímero pode ser estabilizado com 0,01 a 0,1% de cloreto ácido e é então convertido ao polímero final de alto peso molecular por reação posterior com um extensor de cadeia diol ou diamina. Esta etapa é chamada de estágio de extensão de cadeia, embora o termo cura seja usado industrialmente algumas vezes por representar melhor a característica elastomérica do polímero final.

A reação de extensão de cadeia para um diol é mostrada na equação 2.11:



(Eq. 2.11)



Um procedimento alternativo para a síntese do poliuretano é o processo de um estágio. Nesse método, a formação do polímero é efetuada misturando-se simultaneamente o poliol, o diisocianato e o extensor de cadeia, na presença de um catalisador apropriado.

2.2.5.2. Meio Reacional [23]

Algumas sínteses do poliuretano em pequena escala são efetuadas em solução. A escolha do solvente pode afetar tanto a taxa de reação não-catalisada quanto a eficiência do catalisador. Em geral, solventes que se complexam imediatamente com o composto de hidrogênio ativo ou com o catalisador, via ponte de hidrogênio ou interações de dipolo, por exemplo, irão resultar em uma reação mais lenta que os solventes que não se associam imediatamente com o reagente ou com o catalisador.

Os solventes mais utilizados em sínteses incluem N,N-dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF) e dimetilsulfóxido (DMSO).

Na produção comercial, utilizam-se técnicas de polimerização sem solvente. Esta diferença nas condições de síntese altera a taxa e o rendimento da reação, resultando em um processo geralmente muito rápido. A reação é exotérmica e, dependendo do catalisador, leva de 2 a 30 minutos.

Este processo requer reatividades similares dos diferentes hidroxicompostos. As diaminas só podem ser usadas como correagentes se a uréia-isocianato formada inicialmente permanece dissolvida e pode reagir posteriormente.

2.3. Poliuretanos biomédicos

2.3.1. Poliuretanos comerciais

A. Biomer®

Em 1967 foi introduzido o uso médico do poliuretano segmentado, um poliéter uretano-uréia (Lycra® T-126). Esse polímero possuía uma combinação de propriedades não disponíveis em outros poliuretanos, tais como alto módulo de elasticidade, compatibilidade fisiológica, resistência à fadiga e excelente estabilidade por longos períodos de implantação [18].

O Biomer®, fornecido pela Ethicon, Inc., é baseado na formulação da Lycra® T-126 e é composto de segmentos flexíveis derivados de politetrametileno éter glicol $\text{HO}-(\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-})_n\text{H}$, de segmentos rígidos de 4,4' difenilmetano diisocianato (MDI), e de uma mistura de diaminas como extensores de cadeias. É usado em dispositivos em contato com o sangue como catéteres, bombas de assistência cardíaca e ventrículos artificiais [24]. Sua estrutura pode ser vista na figura 2.8.

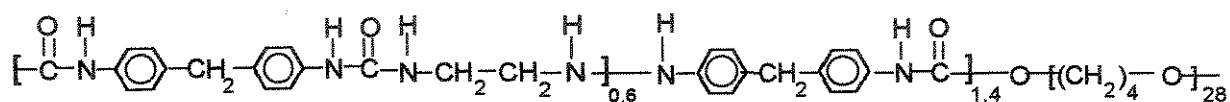


Figura 2.8. Unidade repetitiva da estrutura química do Biomer®.

B. Cardiothane® (Avcothane®) [25,26]

Originalmente desenvolvido pela Avco-Everett Research Lab., sob o nome de Avcothane® 51, este polímero é agora chamado Cardiothane® 51 para enfatizar seu uso em dispositivos

cardiovasculares, sendo atualmente comercializado pela Kontron Cardiovascular, Inc. Possui um grau de compatibilidade com o sangue satisfatório e é utilizado no coração artificial, balões intra-aórticos, catéters e tubos para o sangue.

O Cardiothane® 51 é composto de polieteruretano (90%) e polidimetilsiloxano (10%) com pelo menos três grupos acetoxi por cadeia. Quando filmes deste material são expostos ao ar sofrem uma cura úmida, resultando em um copolímero com ligações cruzadas cuja análise da superfície do filme mostra anisotropia na distribuição dos segmentos poliméricos. É possível observar que os segmentos flexíveis de uretano e silicone são distribuídos mais em direção a interface do polímero em contato com o ar do que o lado em contato com o molde.

C. Cardiomat® [18]

Dentre os poliuretanos desenvolvidos pela Kontron Cardiovascular, Inc., incluem-se o Cardiomat® 610 e o Cardiomat® 40.

O Cardiomat® 610 é um elastômero transparente, com propriedades similares ao Biomer®. O Cardiomat® 40 é um sistema contendo silicone, vulcanizável a temperatura ambiente, ultra-puro e sem sílica, dissolvido em uma mistura de solventes.

D. Pellethane® 2363 [27]

O Pellethane® 2363 foi desenvolvido pela UPJOHN, Co. nos anos 70. Baseado no MDI, PTMO e 1,4 butanodiol, esse material apresenta a vantagem de poder ser fabricado por injeção, compressão, ou por evaporação do solvente.

Embora especificamente preparado para uso médico, o Pellethane® contém aditivos de baixo peso molecular que podem aflorar à superfície com o calor, ou serem extraídos por solventes

orgânicos. Sua compatibilidade com o sangue tem se mostrado menor que a do Biomer® e do Avcothane®. Tem sido usado em conectores de marca-passos cardíacos, bolsas de sangue e outros dispositivos.

E. Tecoflex® [28]

Em 1979 a Thermo Electron Corp. desenvolveu um elastômero termoplástico de poliuretano de grau biomédico de segunda geração.

O Tecoflex® como é conhecido, é um elastômero alifático, polimerizado de MDI hidrogenado, PTMO de peso molecular 1000 e de 1,4 butanodiol. Esse polímero não amarela quando exposto a luz ultravioleta e não se decompõe a 4,4' metilenedianilina (MDA), um reconhecido carcinogênico.

F. Mitrathane® [29]

É um polieteruretano-uréia desenvolvido para aplicações biomédicas pela Mitral Medical International, Inc, com estrutura química similar ao Biomer®.

Resultados experimentais obtidos *in vivo*, com animais, demonstram potencial para aplicações deste material em contato com o sangue.

Experimentos, *in vitro*, de adesão de células endoteliais humanas ao Mitrathane® mostraram que essas células crescem bem neste poliuretano sob condições estáticas e apresentam forte adesão sob condições de fluxo.

G. Rimplast® [30]

Rimplast® é uma série de reticulados poliméricos interpenetrantes (IPN) de silicones

modificados usando poliuretano éster/éter e alifático/aromático. Esses polímeros são uma extensão dos copolímeros Avcothane® ou Cardiothane® que são usados com sucesso em dispositivos em contato com o sangue, sendo fabricados com uma nova tecnologia por Petrarch Systems, Inc. Na síntese dos silicones IPN, uma poliblenada de silicone de alto peso molecular reativo e poliuretano é convertida a IPN durante o processamento por extrusão ou injeção. As tensões de ruptura são de 3 a 5 vezes superiores às do silicone.

H. Toyobo® [31]

A Toyobo Co. desenvolveu uma série de poliuretano-uréia biomédica. Esses polímeros contém segmentos flexíveis de diferentes pesos moleculares. Dentre eles, tem-se o Toyobo® TM-5 que possui tensão de ruptura e alongação máxima similares ao Biomer®, embora sua flexibilidade seja inferior.

2.3.2. Polímeros modificados superficialmente

No desenvolvimento de polímeros para aplicações biomédicas, uma das linhas de pesquisa envolve a modificação da superfície para alterar a interface de contato com o sistema biológico.

Para as aplicações em contato com o sangue, o objetivo desta técnica é o aumento da tromboresistência.

A modificação da superfície permite a preparação separada do substrato e da superfície, conferindo propriedades específicas diferentes a cada uma das partes. Outra vantagem é a possibilidade de incorporar substâncias biologicamente ativas como heparina, albumina,

prostaglandinas e outras drogas que não podem ser utilizadas como substrato.

As pesquisas nessa área estão divididas em quatro categorias:

1. Modificação química da superfície para obtenção de superfícies hidrofílicas ou com carga negativa [32,33,34];
2. Polímeros heparinóides, representados pelos poliuretanos sulfonados [35,36];
3. Hibridização com substâncias biologicamente ativas: utilização de heparina [37,38,39,40], uroquinase [41] e prostaciclina [42];
4. Endotelialização [43].

O tratamento escolhido para este trabalho, a imobilização de heparina em poliuretano, inclui-se na categoria 3 vista anteriormente, e será visto em detalhes a seguir.

2.4. Heparina

A heparina é um mucopolissacarídeo ácido que impede a coagulação do sangue. Ocorre naturalmente no organismo, sendo encontrada nos pulmões e nas paredes das artérias, age tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Dada a sua crescente importância e comprovada eficiência como inibidor da formação de trombos, falaremos a seguir um pouco mais sobre essa macromolécula.

2.4.1. Química da heparina [44,45]

A heparina é um polissacarídeo sulfatado com peso molecular em torno de 15000 daltons representado pela figura 2.9. Tem como constituintes: Glucosamina - 6 - sulfato, ácido glucurônico - 2 - sulfato e ácido idurônico.

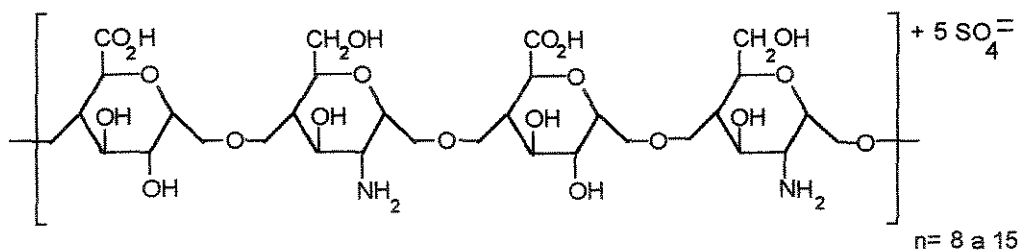


Figura 2.9. Estrutura da heparina

Muitas amostras de heparina contêm de 8 a 15 sequências de cada unidade, mas não necessariamente em proporções iguais, podendo, portanto, variar sua composição dependendo da fonte da qual foi extraída.

A heparina é fortemente ácida devido aos grupos ácido 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.

2.4.2. Mecanismo de ação da heparina

A antitrombina III, também denominada cofator da heparina, se liga a trombina formando um complexo estequiométrico estável inibindo, portanto, sua atividade enzimática. A heparina age como anticoagulante catalisando a formação desse complexo [46,47]. Possivelmente, também se forma um complexo ternário entre a heparina, a antitrombina III e os outros fatores de coagulação [48,49].

2.4.3. Métodos de imobilização da heparina

O primeiro processo de heparinização de polímeros foi efetuado por Gott e col. em 1963 [50]. As superfícies grafitadas eram tratadas com "zephiran" e então com heparina (GBH). Esse tratamento, porém, só se aplicava a plásticos rígidos.

Em 1964, Leininger e col. [51] ligaram heparina a diversas superfícies poliméricas através da formação de sítios amônios quaternários.

Na década de 70, diversos pesquisadores se empenharam em aumentar a tromboresistência de biomateriais através de heparinização, com vários trabalhos publicados sobre o assunto, como será visto a seguir:

Labarre e Josefowicz [52], por exemplo, prepararam um copolímero 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.

Stewart e Wilkov [53] estudaram superfícies com heparina ligada ionicamente através da exposição do polímero a uma solução de um sal amônio quaternário (cloreto de tridodecilmetilamônio). 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 serviam 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.

A fim de solucionar esse problema, Larsson e col. [54] 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.

Schmer [55] ligou covalentemente a heparina através da ativação da agarose com brometo de cianogênio, da ativação dos aminossubstituintes com tiosfogênio e da ativação dos ácidos carboxílicos substituintes com carbodiimida. Os resultados mostraram um aumento no tempo de coagulação em relação ao padrão.

Cholakis e Sefton [56] prepararam um hidrogel de PVAI (álcool polivinílico)-heparina através de uma reação de ligação cruzada da hidrólise do álcool polivinílico com glutaraldeído, produzindo uma ponte acetal (Fig. 2.10). O material resultante apresenta compatibilidade com o sangue *in vitro*, sem perda significativa da heparina.

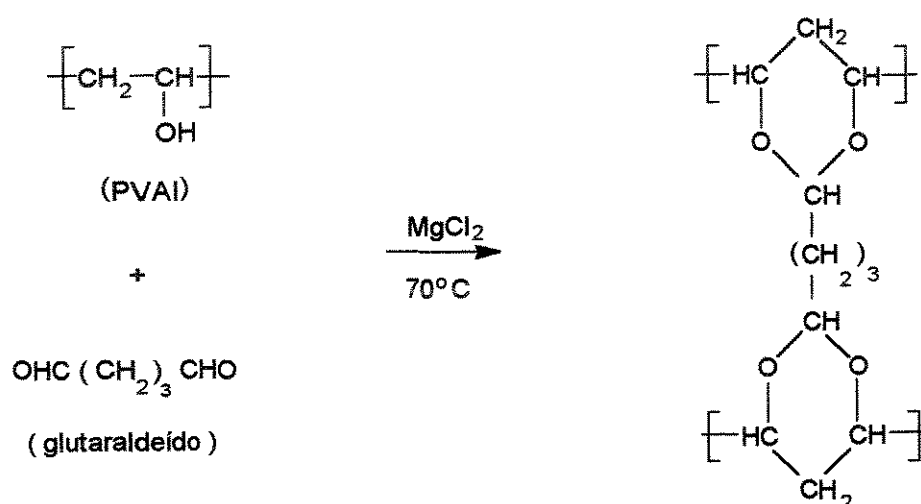


Figura 2.10. Formação da ponte acetal na reação do álcool polivinílico com glutaraldeído.

Mais recentemente, os processos de heparinização vêm incluindo o uso de espaçadores a fim de aumentar a mobilidade da heparina e, conseqüentemente, sua atividade [57].

Especificamente para imobilização de heparina em poliuretano, os trabalhos mais recentes utilizam espaçadores alquílicos e hidrofílicos.

Heyman e col. [37], por exemplo, utilizaram dimetilacetamida como espaçador, porém o espaçador mais utilizado é o PEO ou poli(óxido de etileno), que atua na redução da adesão de plaquetas devido a sua baixa energia livre interfacial e sua mobilidade dinâmica [58,59].

2.5. Propriedades superficiais e caracterização

2.5.1. A superfície

A interface entre duas fases é uma descontinuidade onde uma fase termina e outra começa. Existem cinco tipos de interfaces, porém nos sistemas biológicos as mais importantes são sólido-gás, sólido-líquido e líquido-gás.

Andrade [60] sugeriu que a região interfacial para interações biológicas seja dividida em quatro níveis: (1) o nível molecular, de 3-15Å da superfície, onde os efeitos da água, íons e moléculas pequenas ocorrem; (2) o nível macromolecular, de 10 a algumas centenas de ângstrons da superfície, onde podem ocorrer interações entre o material e proteínas, polissacarídeos e micelas; (3) o nível celular, na faixa de 2µm onde se encontram as plaquetas, até 20µm onde estão as células grandes; e (4) o nível de tecido, a partir de 0,1mm. 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.

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 [61]. Se essa quantidade termodinâmica for positiva, o efeito das flutuações poderá levar à completa dispersão de um material no outro. Essa 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 diferentes.

Tabela 2.1. Técnicas de caracterização de superfície e suas profundidades de atuação [22].

Técnica	Profundidade
Ângulo de contato	Superfície
Microscópio eletrônico, ótico	Superfície
Espectroscopia de espalhamento de íon (ISS)	1-10Å
Espectroscopia de massa de íon secundário (SIMS)	1-10Å
Espectroscopia eletrônica para análises químicas (ESCA)	3-100Å
Espectroscopia no infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR)	1000-10000Å

Além dessas dificuldades relativas à natureza intrínseca das interfaces, a determinação das propriedades superficiais usando métodos externos deve levar em consideração que cada técnica atinge profundidades diferentes, como podemos constatar na tabela 2.1.

2.5.2. Métodos de caracterização

Em princípio, pode-se assegurar, com base na literatura corrente que todas as técnicas citadas na tabela 2.1 constituem ferramentas valiosas para a caracterização de superfícies. Assim, é de fundamental importância que se aborde um pouco mais sobre as mais utilizadas.

2.5.2.1. Ângulo de contato e molhabilidade [62]

A energia livre interfacial ou tensão interfacial é o excesso de energia livre devido à existência de uma interface, onde existem forças moleculares não balanceadas. A energia livre interfacial específica é este excesso de energia livre por unidade de área de superfície e no caso de interfaces líquido-vapor ou sólido-vapor, é conhecida como energia livre específica de superfície ou tensão superficial, entendida como uma força interna que tende a reduzir a área superficial a um mínimo [63].

O equilíbrio sólido-líquido-vapor pode ser representado, em termos de tensões interfaciais, pela equação de Young (Eq. 2.12):

$$\gamma_{LV}\cos\theta = \gamma_{SV_0} - \gamma_{SL} \quad (\text{Eq. 2.12})$$

onde θ é o ângulo de contato de equilíbrio,

γ_{SV_0} é a tensão interfacial sólido-vapor saturado,

γ_{SL} é a tensão interfacial sólido-líquido e

γ_{LV} é a tensão interfacial líquido-vapor.

A figura 2.11 representa uma visão esquemática do perfil de uma gota de um líquido espalhado sobre a superfície de um sólido e as energias livres associadas.

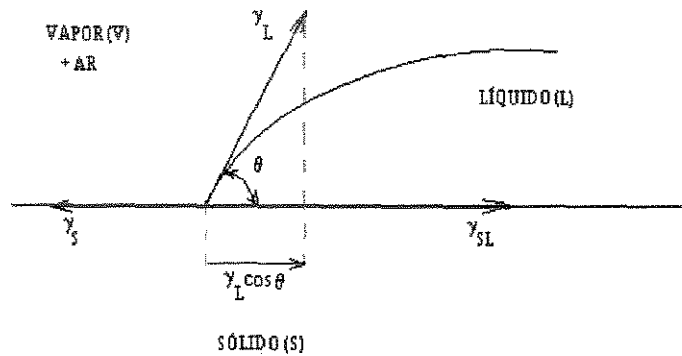


Figura 2.11. Representação vetorial do equilíbrio sólido-líquido-vapor em uma superfície planar.

Para um ângulo de 180° , a gota assume uma forma esférica e não ocorre molhamento; um ângulo de 0° representa molhabilidade perfeita. Para um ângulo entre 0° e 90° , ocorre molhamento parcial.

Quando o líquido é a água e o ângulo de contato for mais próximo de 0° , então o sólido é hidrofílico; se o ângulo de contato for mais próximo de 180° , o sólido é hidrofóbico.

A medida do ângulo de contato tem sido adotada para a caracterização da superfície do material, pois diversos autores relacionam hidrofiliicidade e tromboresistência. Os polímeros hidrofílicos reduzem a energia livre interfacial no sangue, cujo principal componente é a água e, em geral, superfícies hidrofílicas são mais tromboresistentes que as superfícies hidrofóbicas [64,65,66].

2.5.2.2. Espectroscopia no infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR) [67]

A espectroscopia no infravermelho com reflexão interna múltipla refere-se a 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 (Figura 2.12), 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 10000Å na amostra, mas essa profundidade pode ser variada utilizando-se cristais com índices de refração diferentes (p. ex. germânio e KRS-5 cujos índices de refração são 4,0 e 2,4, respectivamente). 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°.

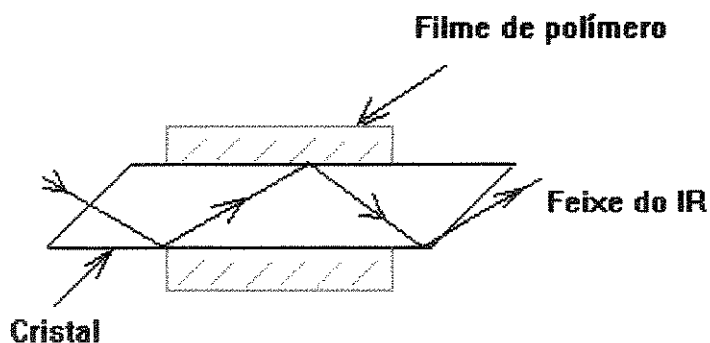


Figura 2.12. Espectroscopia MIR mostrando reflexão interna múltipla em uma interface cristal-polímero.

Como ilustração, a figura 2.13 mostra um espectro de um poliéter-uretano típico.

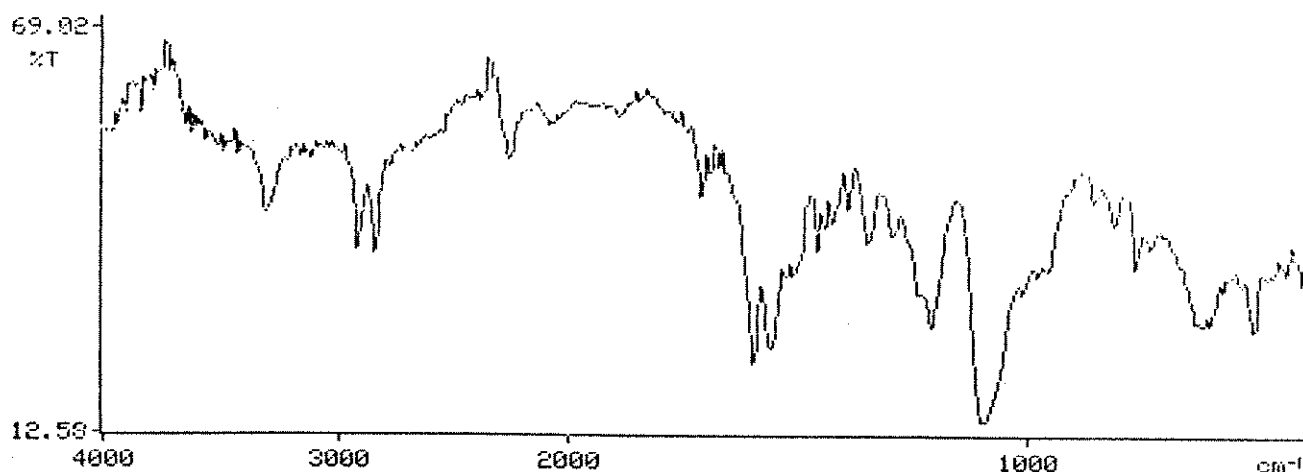


Figura 2.13. Espectro MIR de um poliéter-uretano.

2.5.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) [68]

A morfologia ou forma física da superfície pode ser classificada de acordo com a rugosidade, textura e porosidade. Diferenças na morfologia das superfícies poliméricas são devido a diferenças na composição e métodos de fabricação do polímero, ou no caso de tratamentos químicos, da formação de adutos acompanhando a reação ou por danos causados pelo solvente [22].

O microscópio eletrônico de varredura permite a observação e análise das características microestruturais de objetos sólidos. Um aspecto importante do MEV é a alta resolução que pode ser obtida na observação tanto de área quanto de microvolumes.

No MEV, um feixe de elétrons, gerado por um filamento de tungstênio, é acelerado pela aplicação de alta voltagem (1-30kV) e direcionado através de uma série de lentes eletromagnéticas. O sistema de lentes reduz o diâmetro do feixe de elétrons para 5-10nm e o focaliza sobre a superfície da amostra. Um conjunto de espirais de varredura ("scanning coils"), localizados entre as lentes

condensadoras finais, faz com que o feixe de elétrons colimados rastreie a superfície da amostra. A interação do feixe de elétrons com a amostra produz uma série de fenômenos, como a emissão de elétrons retroespalhados, de raios-X, de luz visível e mais comumente, de elétrons secundários, de baixa energia, que são coletados pelos detectores.

O sinal de um detector de elétrons secundários é amplificado e levado a um tubo de raios catódicos. Como o feixe de elétrons varre a superfície da amostra, a informação coletada modula a intensidade do feixe no tubo de raios catódicos, que varre a tela em sincronismo com o feixe de elétrons que varre a amostra. Cada ponto na tela do tubo corresponde a um ponto da superfície da amostra, e o brilho da imagem varia com a intensidade de elétrons secundários produzidos pelos elétrons do feixe primário. A figura 2.14 mostra um MEV esquematizado:

Quanto à preparação das amostras para MEV, se estas não forem boas condutoras de eletricidade, é necessário o revestimento com uma fina camada (100-500Å) de um material condutor como ouro, carbono ou liga de ouro e paládio. Este revestimento é feito em um evaporador a vácuo ou em um equipamento de "sputtering". No primeiro, o ouro ou ouro-paládio é aquecido sobre um filamento de tungstênio, e a amostra é recoberta com o metal evaporado. Deste modo, a superfície da amostra torna-se condutora e previne-se o acúmulo de elétrons do feixe sobre a amostra no microscópio.

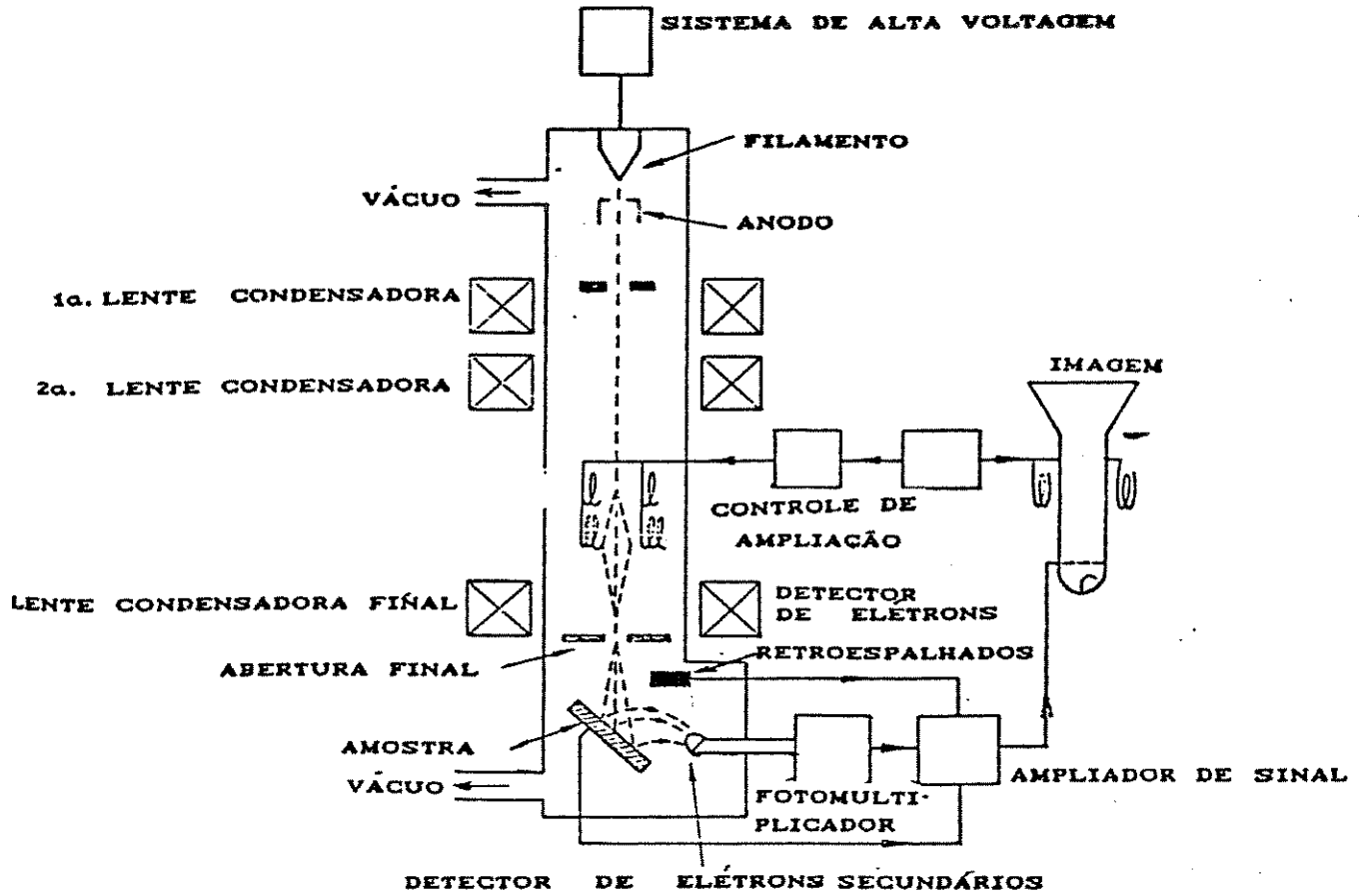


Figura 2.14. Diagrama esquemático do MEV

Capítulo 3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Os filmes de poliuretano (PU, Biomer® - Ethicon, Inc.) foram fornecidos pelo Incor - Instituto do Coração - SP e usados após serem lavados com metanol por 24 horas a temperatura ambiente para remoção dos componentes de baixo peso molecular.

O poli(óxido de etileno) ou PEO (pesos moleculares 400, 900 e 1500) fornecido pela Dow Chemical e Ultraquímica foi usado como espaçador. Heparina (Liquemine® - Roche -50 mg/ml) e albumina bovina (Sigma) foram utilizadas para imobilização. Polietilenoimina (PEI) foi obtido da Sigma como uma solução aquosa 50% (p/v).

O diisocianato de hexametileno (HMDI - Desmodur H®) e o triisocianato com molécula em forma de Y (Desmodur N®) fornecidos pela Bayer S.A., foram separados em frascos menores nas quantidades a serem utilizadas e mantidos em dessecador para evitar umidade. O octoato de estanho (Plasteng), o glutaraldeído (GA - Riedel, 25% v/v), o tolueno, o benzeno e os outros reagentes foram utilizados sem nenhum tratamento adicional.

3.2. Métodos

O objetivo inicial do trabalho era somente a enxertia da heparina na superfície dos filmes de poliuretano. A enxertia de albumina foi feita para fazermos uma comparação já que essa molécula tem a propriedade de formar uma camada passivadora na superfície do polímero [69].

No início do trabalho, tivemos alguns problemas com umidade nos reagentes, o que resultou

em algumas tentativas de reações sem sucesso, o que nos levou a fracionar o isocianato em frascos menores, assim que o reagente era recebido. As condições de reação descritas abaixo foram definidas após uma série de testes preliminares.

3.2.1 Método 1: Enxertia do PEO e imobilização de heparina e albumina

A figura 3.1 ilustra o esquema de reação da enxertia do PEO e imobilização da heparina na superfície do filme de poliuretano. Cada etapa da funcionalização foi acompanhada através de espectros de infravermelho de refletância.

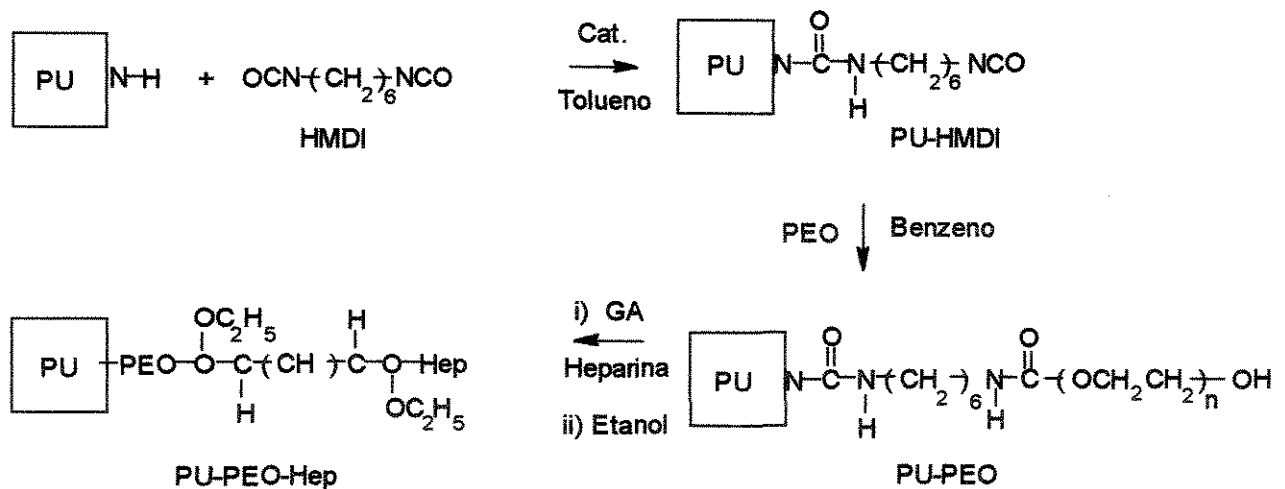


Figura 3.1. Esquema da reação para enxertia do PEO e imobilização de heparina na superfície do PU.

1. Reação do HMDI na superfície do PU (PU-HMDI)

Os filmes de PU (2 x 5 cm e 1 x 2 cm) foram imersos em uma solução contendo 200 ml de tolueno, 0,7 ml de octoato de estanho e 10 ml de HMDI. Após reagir por 1 h a 40°C sob atmosfera de nitrogênio, os filmes foram lavados com tolueno e éter anidro.

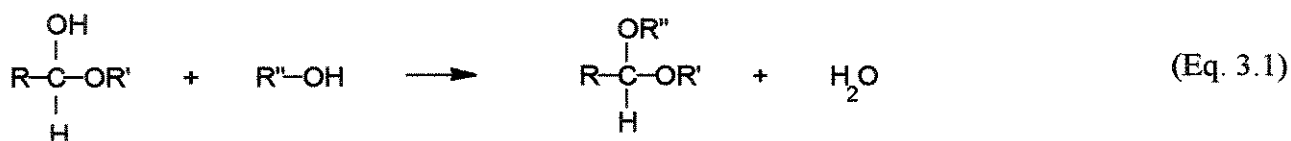
2. Enxertia do PEO (PU-PEO)

Os filmes PU-HMDI reagiram com 45 g de PEO, independente do seu peso molecular, em 300 ml de benzeno e 0,8 ml de octoato de estanho por 24 h a 40°C. Os filmes foram então lavados com benzeno e etanol absoluto.

3. Imobilização de heparina em PU-PEO via ligação GA (PU-PEO-Hep)

A heparina foi imobilizada usando glutaraldeído (GA) como agente acoplador entre os grupos terminais -OH do PEO enxertado e os grupos -OH ou NH₂ da heparina.

O filme PU-PEO foi colocado em 100 ml de uma solução aquosa contendo 12 ml de heparina e 24 ml de GA em pH 5,2 por 1 h a 85°C e então colocado para reagir por 30 min a 35°C em etanol 80% para transformar os grupos hemiacetais instáveis em ligações acetais estáveis (Eq. 3.1).



4. Imobilização de albumina (PU-PEO-Alb)

Utilizou-se uma modificação do método anterior para fazer a imobilização da albumina bovina através de seus grupos -NH₂ terminais.

O filme PU-PEO foi colocado para reagir em uma solução aquosa de glutaraldeído 6% por 1 h a 70°C e depois em uma solução aquosa de albumina 0,625 g/ml a 40°C por 24 h.

3.2.2. Método 2: Imobilização de heparina parcialmente degradada e albumina utilizando-se o PEI como agente de ligação [40].

1. Degradação parcial da heparina

A heparina foi parcialmente degradada para evitar a inativação de seus sítios ativos no procedimento de imobilização.

Preparou-se uma solução contendo 5 mg/ml de heparina, nitrito de sódio (NaNO_2 , 0,06 mg/ml), ajustando-se o pH para 2,7 com ácido clorídrico 1 M. A reação foi agitada por 2 h a 0°C e o pH foi então ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio 1M.

2. Ligação do polietilenoimina ao filme de PU (PU-PEI3 e PU-PEI9)

Os filmes de PU foram colocados por 5 s em ácido sulfúrico concentrado contendo permanganato de potássio (KMnO_4 , 2 g/l) e lavados cuidadosamente com água destilada.

Os filmes foram então incubados por 5 min a temperatura ambiente em uma solução de PEI 0,05% (p/v) em dois pHs, pH = 3,0 e pH = 9,0 para testar a influência do pH na ligação do PEI.

3. Ligação covalente de heparina (PU-PEI-Hep)

Os filmes PU-PEI3 e PU-PEI9 foram tratados com uma solução aquosa contendo heparina parcialmente degradada (1 mg/ml), cianoborohidreto de sódio (NaBH_3CN - 0,01 mg/ml) e NaCl 0,15 M por 2h a pH = 3,5 e a 50°C .

4. Imobilização de albumina (PU-PEI-Alb)

Os filmes PU-PEI3 e PU-PEI9 foram tratados com uma solução aquosa contendo albumina (10 mg/ml), cianoborohidreto de sódio (NaBH_3CN - 0,01 mg/ml) e NaCl 0,15 M por 2h a pH = 3,5 e a 37°C .

3.2.3. Método 3: Concentração de heparina imobilizada

O método descrito por Smith e col. [70] foi utilizado para estimar-se a concentração de heparina na superfície dos filmes.

A heparina imobilizada forma um complexo com o corante, retirando-o da solução. Essa alteração da concentração da solução pode ser medida através de leituras de absorvância a 631 nm no espectrofotômetro (Espectrofotômetro Micronal UV - B382) e comparada com uma curva de calibração.

3.2.4. Método 4: Concentração de albumina imobilizada

O método utilizado é uma adaptação do método descrito por Bradford [71] para quantificação de albumina em solução, utilizando o corante azul de Coomassie.

A curva de calibração foi construída variando-se a concentração de albumina e medindo-se a absorvância no comprimento de onda do corante (465 nm) ao invés do comprimento de onda do complexo proteína-corante (595 nm) como descrito no método original.

3.2.5. Método 5: Testes de adesão de plaquetas

Sangue humano, tratado com ácido cítrico, foi centrifugado a 800 rpm por 12 min para a obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP).

Amostras dos filmes (1 x 1 cm) foram imersos no PRP por 4 h a 37°C, lavados com tampão fosfato pH 7,4 com ligeira agitação para remover plaquetas fracamente aderidas. As plaquetas foram então fixadas com solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato por 2 h a temperatura ambiente. A seguir, as mesmas foram tingidas utilizando-se o corante azul de Coomassie, lavadas com etanol

50%, colocadas para secar no dessecador e observadas no microscópio ótico (Olympus CBA-K) com aumento de 1000 vezes [72].

3.2.6 Método 6: Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Os filmes (1 x 2cm) foram colocados em 100 μ l de plasma controle (Plasma Controle N, Beohring Co.) e incubados por 1 h a 37°C. Num volume de 100 μ l do reagente TTPA, pré-aquecido por 2 min, adicionou-se o plasma obtido anteriormente, seguido pela adição de 100 μ l de CaCl_2 (0,025 M) exatamente 30 s depois. O tempo de coagulação foi então medido [73].

3.2.7. Método 7: Tempo de protrombina (TP)

Após tratar o filme polimérico da mesma maneira que para o método do TTPA, a mistura de 0,1 ml de tromboplastina (Sigma) e 0,1 ml de solução de CaCl_2 0,025 M foi pré-aquecida a 37°C. O plasma teste (0,1 ml) foi adicionado imediatamente à mistura e o tempo de coagulação foi medido [73].

3.2.8. Método 8: Espectroscopia no infravermelho com reflexão interna múltipla (MIR)

Os espectros MIR foram obtidos das superfícies dos filmes poliméricos usando um espectrofotômetro FT-IR Perkin-Elmer 1600, acoplado ao acessório MIR usando cristal KRS-5 com ângulo de 45°.

3.2.9. Método 9: Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia superficial dos filmes de PU foi examinada usando um microscópio eletrônico de varredura (Cambridge modelo Sterescan 54-10), com voltagem de 25 KV, com inclinação de 35°.

As amostras foram anteriormente metalizadas com ouro.

3.2.10. Método 10: Medidas de ângulo de contato

A hidroflicidade das amostras foi seguida utilizando-se medidas de ângulo de contato (Goniômetro para ângulo de contato NRL modelo 100).

Capítulo 4. Resultados e discussão

Enxertia do PEO no poliuretano

Para introduzir grupos isocianato livres (-NCO) na superfície do filme polimérico, o grupo uretano reage com o HMDI para produzir um alofanato, como mostrado pela eq. 2.6.

O grupo -NCO pode ser, então, utilizado na enxertia do PEO.

A figura 4.1 mostra os espectros das superfícies do PU não tratado (a), do PU-HMDI (b) e do PU-PEO (c), respectivamente. Na superfície do PU-HMDI pode-se observar um pico agudo a 2250 cm^{-1} , característico de -NCO. Esse pico é substituído por uma banda larga a $3300\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ no espectro do PU-PEO, característica da presença de grupos -OH. Isto sugere que os grupos -OH do PEO formaram ligações covalentes com os grupos -NCO da superfície do PU-HMDI.

Enxertia do PEI no poliuretano

As reações para enxertia do PEI foram seguidas através da exposição das superfícies ao corante azul de toluidina.

Após o tratamento com ácido sulfúrico, o filme com cargas negativas se tingiu intensamente, sugerindo a introdução de grupos carboxílicos [40]. Após a reação com o PEI, a superfície aminada não adsorve corante.

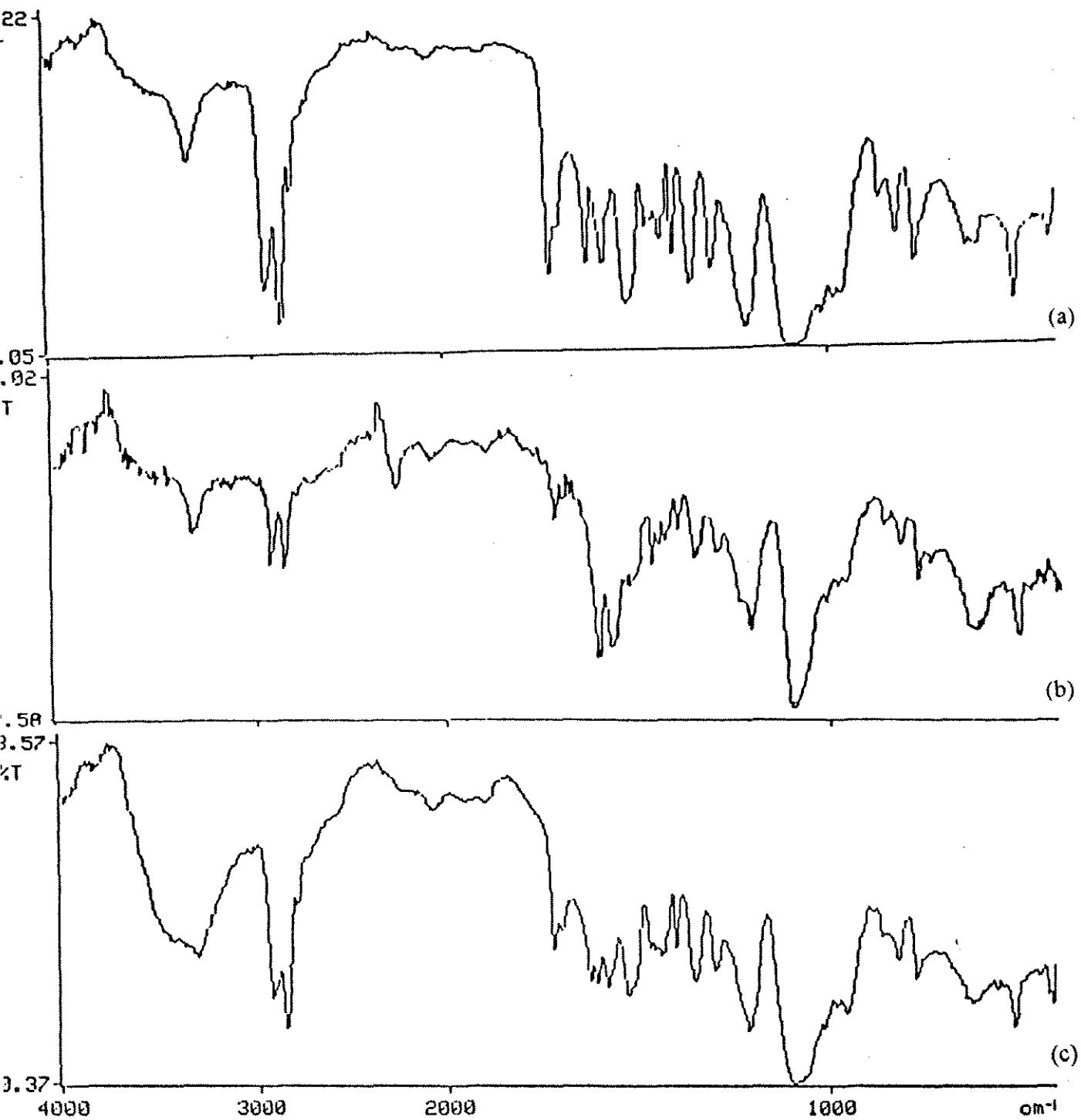


Figura 4.1. Espectros de MIR das superfícies de PU modificadas: PU não tratado (a), PU-HMDI (b), PU-PEO (c).

Imobilização de heparina e albumina

A tabela 4.1 mostra os resultados obtidos para a imobilização de heparina na superfície do PU.

Tabela 4.1. Concentração de heparina nos filmes tratados.

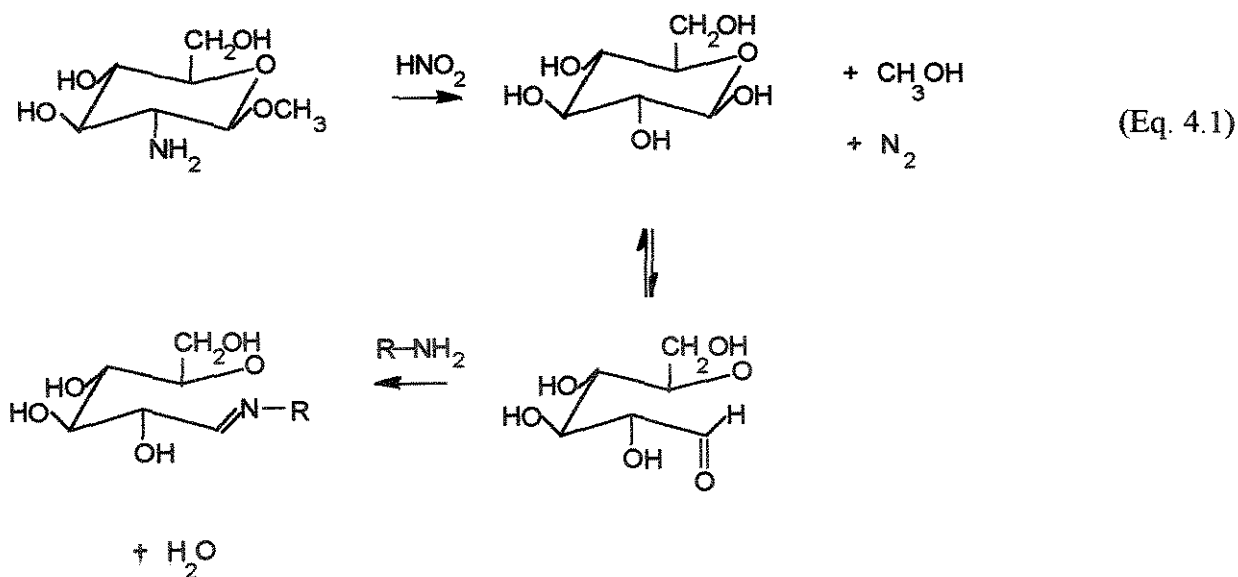
Amostra	Concentração de heparina imobilizada
	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PU-PEO400-Hep	1,30
PU-PEO900-Hep	0,86
PU-PEO4500-Hep	0,90
PU-PEI3-Hep	1,74
PU-PEI9-Hep	0,30

Para a imobilização da heparina observa-se que, quando utilizou-se o PEO como espaçador, o melhor resultado é obtido para o menor peso molecular. Isso parece resultar do decréscimo da reatividade e/ou solubilidade do PEO no solvente da reação (benzeno) com o aumento do seu peso molecular [57]. Esse efeito parece não ser significativo quando o peso molecular vai de 900 para 4500. Os valores de concentração de heparina imobilizada obtidos foram menores do que os obtidos na literatura (entre 1,45 e 1,84 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para PEO com pesos moleculares 200, 1000 e 2000. Porém Han e col. [57] usaram o diisocianato linear e os resultados mostrados anteriormente são para o triisocianato em forma de Y. Quando o diisocianato linear (HMDI) foi utilizado nos testes preliminares os resultados obtidos foram superiores (em torno de 2,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Essa queda do rendimento da reação pode ser explicada, possivelmente, pela reação lateral entre o excesso de isocianato remanescente na solução com os grupos -NCO ligados à superfície pois espera-se que a

reatividade do isocianato trifuncional seja maior do que o isocianato linear ou pelo impedimento estérico da molécula em forma de Y.

Quando o PEI foi utilizado como agente de ligação para imobilização de heparina (tabela 4.1) e de albumina (Tabela 4.2), esperava-se que as duas superfícies tratadas a pH 3,0 e pH 9,0, apresentassem características diferentes pois a adsorção do mesmo é fortemente influenciada pelo pH. Para valores de pH 3,0 as moléculas de PEI formam cadeias relativamente planas devido à alta repulsão intramolecular e podem ser adsorvidas na superfície como uma monocamada. A pH 9,0 a repulsão intramolecular decresce e o PEI forma agregados globulares [40], esando menos disponível para o acesso da própria heparina e albumina.

Nesse método a heparina é parcialmente degradada pelo ácido nítrico, que converte o resíduo 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosil a 2,5-anidro-D-manose (Eq. 4.1) [74,75].



O fragmento de heparina resultante possui funções aldeído terminais que não estão envolvidas na formação hemiacetal intramolecular e são mais reativas que os grupos terminais da heparina não modificada. Compostos contendo funções aldeído reagem com aminas primárias, produzindo bases

de Schiff que podem ser convertidas a amins secundárias estáveis por redução (Eq. 4.2).

Pode-se observar nas tabelas 4.1 e 4.2 que o tratamento a pH 3,0 é mais eficiente tanto para a imobilização da heparina quanto para a albumina, quando se utiliza o PEI como agente espaçador.

Tabela 4.2 Concentração de albumina nos filmes tratados.

Amostra	Concentração de albumina * ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PU-PEO400-Alb	0,56
PU-PEI3-Alb	11,40
PU-PEI9-Alb	0,30

* Os resultados de albumina imobilizada são estimativas pois o método utilizado ainda não está satisfatoriamente desenvolvido.

A figura 4.2 mostra um esquema da reação de imobilização da albumina.

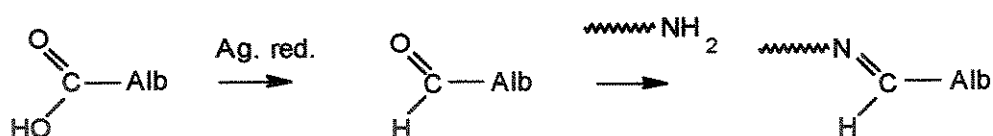


Figura 4.2. Representação esquemática da reação de imobilização da albumina.

Avaliação da bioatividade das superfícies *in vitro*

Geralmente o teste de Tempo de Trombina Parcial Ativado representa a bioatividade em relação aos fatores de coagulação do sistema intrínseco enquanto o teste de Tempo de Protrombina é relacionado aos fatores de coagulação do sistema extrínseco [76].

Como pode ser visto na tabela 4.3, os resultados do teste de TTPA mostram um aumento significativo do tempo de coagulação para as amostras contendo heparina imobilizada em relação ao padrão e ao PU-PEO, demonstrando assim a bioatividade da heparina imobilizada. Observando-se os valores do TTPA para as amostras PU-PEO400-Hep e PU-PEI3-Hep, nota-se que apesar de ter-se obtido o melhor resultado em termos de concentração de heparina para a última, o maior valor de TTPA foi obtido para a primeira. Isto provavelmente pode ser explicado pelo fato de que, apesar da heparina parcialmente degradada possuir maior reatividade, a utilização do PEO como espaçador torna a heparina não modificada mais bioativa.

Os dados de TP não mostram qualquer prolongamento significativo do tempo de coagulação. Isto demonstra que a heparina imobilizada tem mais influência nos fatores de coagulação do sistema intrínseco do que nos fatores do sistema extrínseco.

Tabela 4.3. Dados de bioatividade *in vitro* para várias superfícies de PU modificadas.

Amostra	TTPA (s)	TP (s)
Padrão	32,6	13,0
PU-PEO	39,0	12,6
PU-PEO400-Hep	72,8	15,2
PU-PEO900-Hep	54,0	14,7
PU-PEO4500-Hep	50,6	14,4
PU-PEI3-Hep	64,0	14,9
PU-PEI9-Hep	56,0	14,0
PU-PEO400-Alb	35,6	12,8
PU-PEI3-Alb	36,0	13,0
PU-PEI9-Alb	36,4	12,7

Nas amostras contendo albumina e no PU-PEO não foram observadas alterações consideráveis nos tempos de coagulação, o que já era esperado pois tanto a albumina quanto o PEO agem preferencialmente na diminuição da adesão de plaquetas.

Adesão de plaquetas *in vitro*

As figuras 4.3 e 4.4 mostram as fotografias das plaquetas aderidas às diferentes superfícies vistas ao microscópio ótico. A superfície do padrão (4.3a) exibe muitas plaquetas enquanto o PU-PEO (4.3b) mostra uma diminuição da quantidade de plaquetas aderidas. Isto pode ser explicado pelo fato de que as longas cadeias de PEO hidratadas previnem a estagnação e a adesão de plaquetas devido ao efeito de restrição volumétrica, grande mobilidade das cadeias moleculares e repulsão devido às cargas [76].

As superfícies com heparina imobilizada também mostram diminuição da adesão de plaquetas (figuras 4.3c e 4.3d), embora na literatura não haja um consenso sobre a heparina aumentar [77], diminuir [78] ou não afetar a adesão e/ou ativação de plaquetas [79].

A amostra PU-PEI9-Hep (figura 4.2e) não se mostrou muito eficaz na prevenção da adesão de plaquetas, porém a concentração de heparina na superfície é muito pequena para relacionarmos o tratamento com a eficiência da superfície.

Nas amostras contendo albumina observa-se diminuição significativa da adesão de plaquetas para o PU-PEI3-Alb (figura 4.4a), enquanto que as amostras PU-PEI9-Alb e PU-PEO-Alb (figuras 4.4b e 4.4c) aparentemente não foram eficientes para prevenir esse efeito. Isso demonstra que a forma com que a molécula de PEI se liga à superfície influencia na imobilização da albumina como pode ser observado na tabela 4.2.

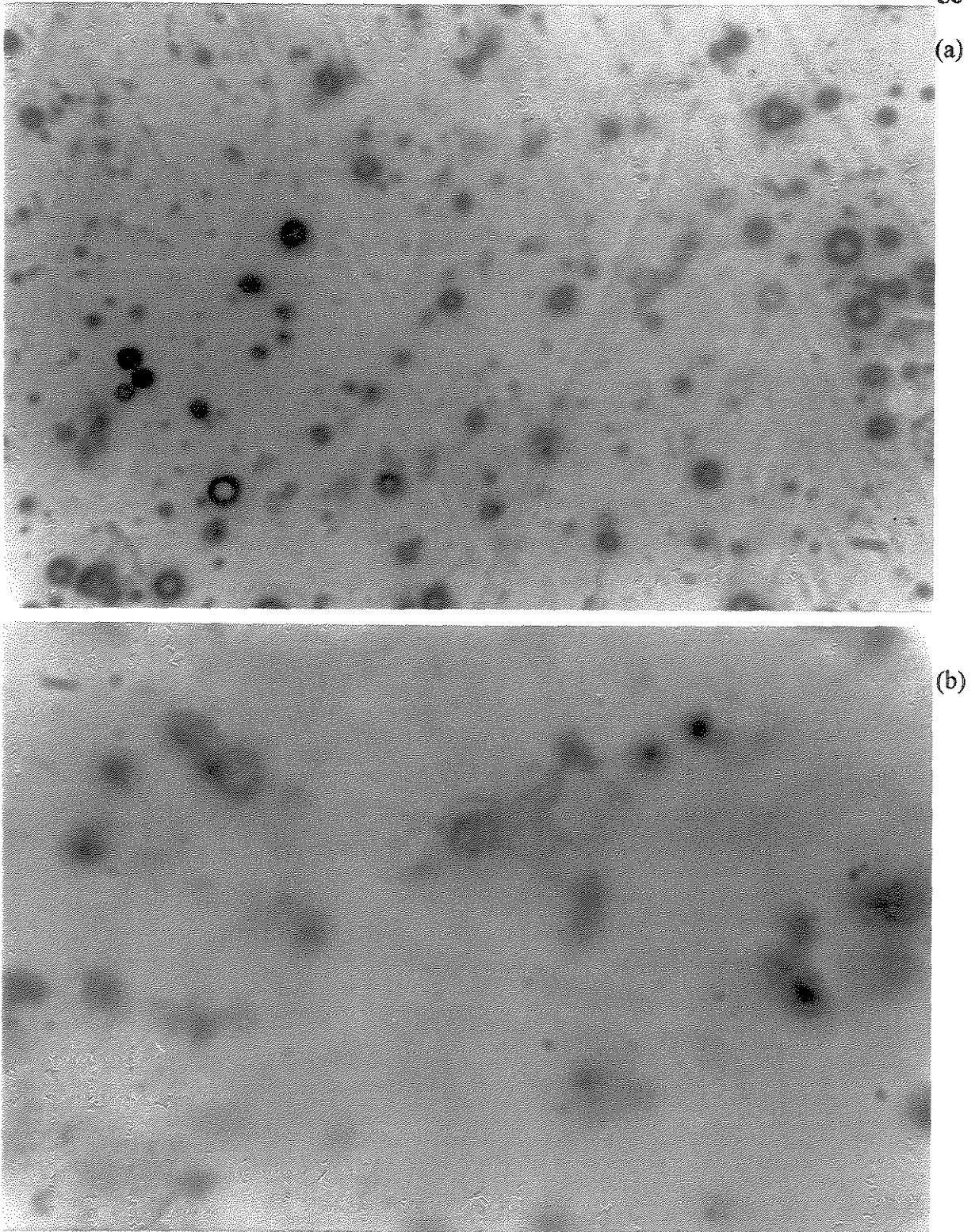
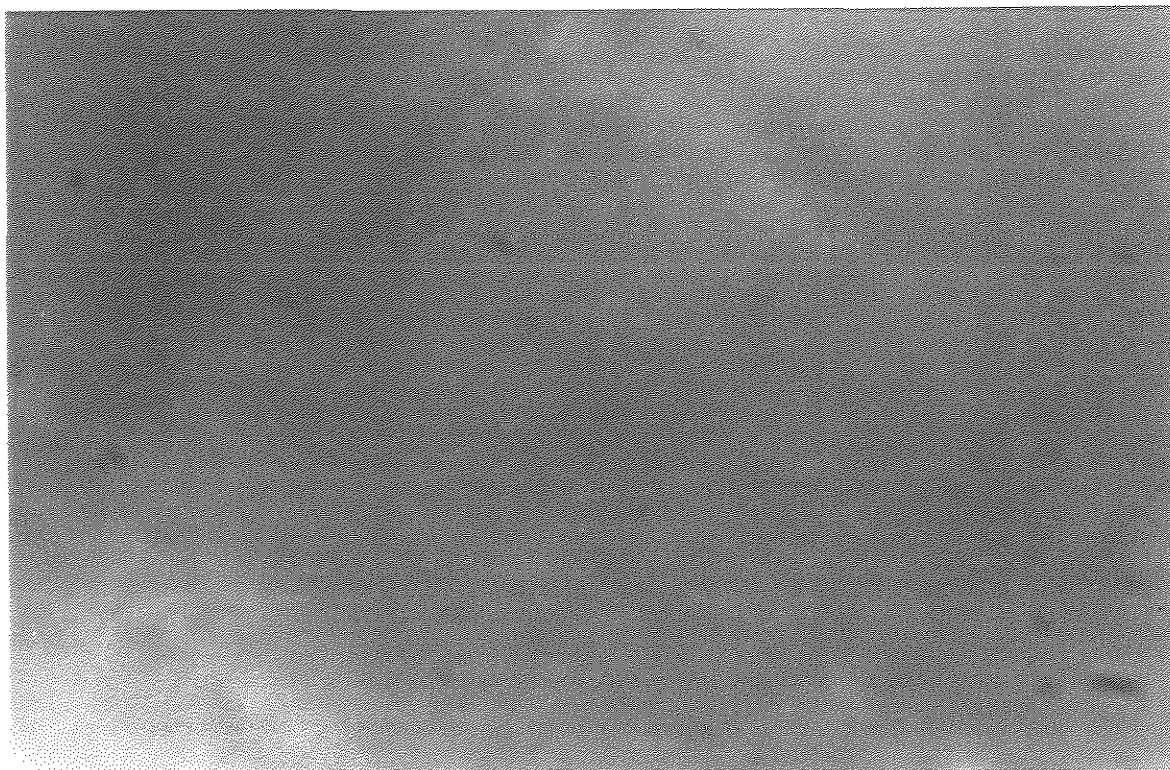


Figura 4.3. Fotografias das superfícies com plaquetas aderidas observadas ao microscópio ótico (x 1000): (a) Padrão, (b) PU-PEO, (c) PU-PEO-Hep, (d) PU-PEI3-Hep, (e) PU-PEI9-Hep.

(c)



(d)

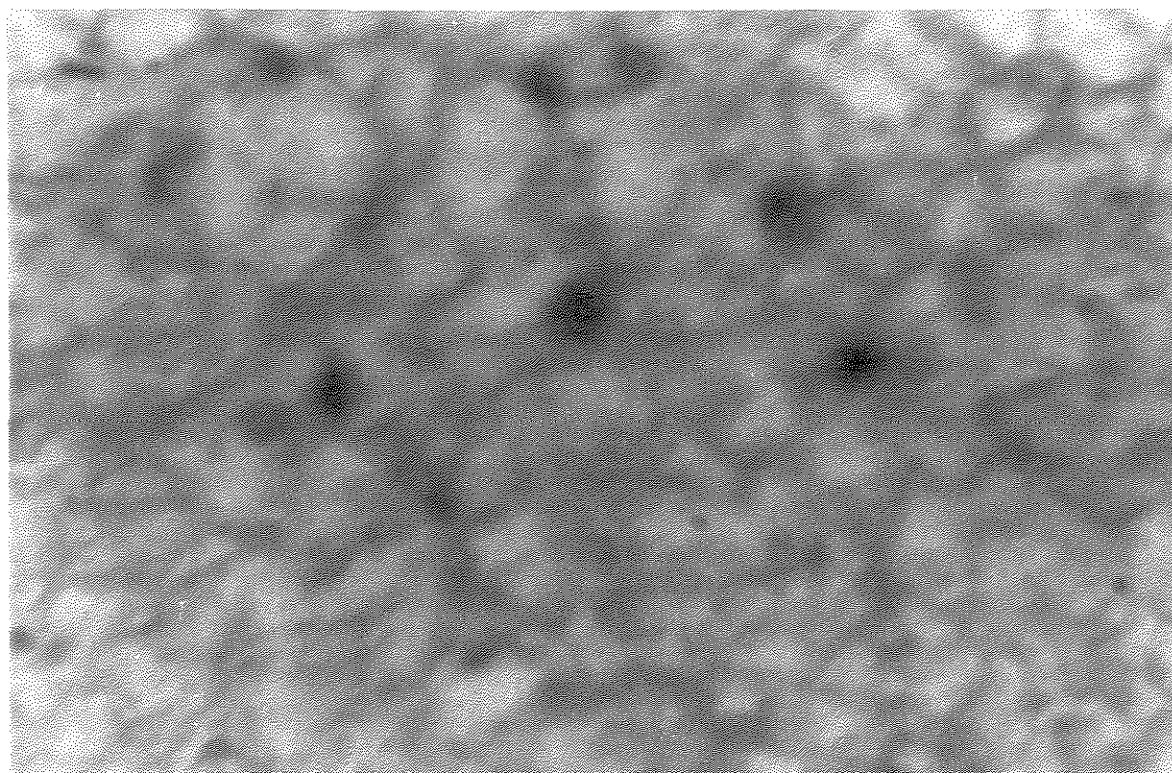


Figura 4.3. Continuação da página anterior

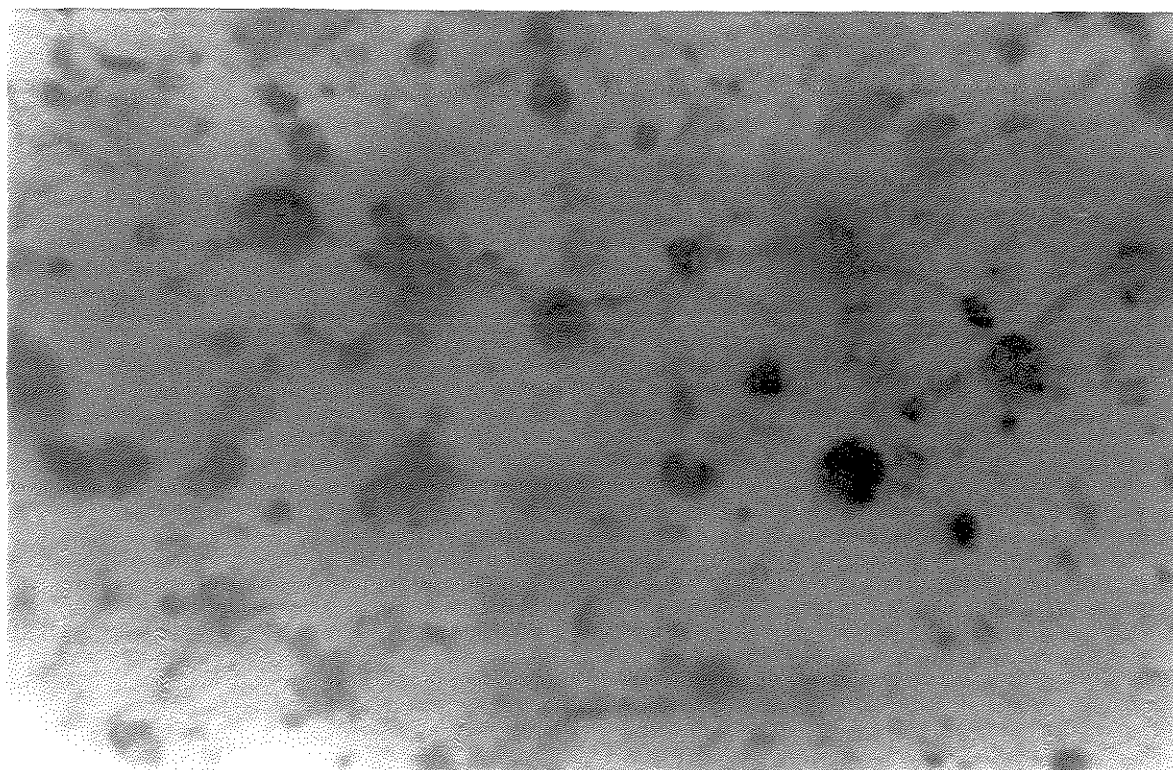
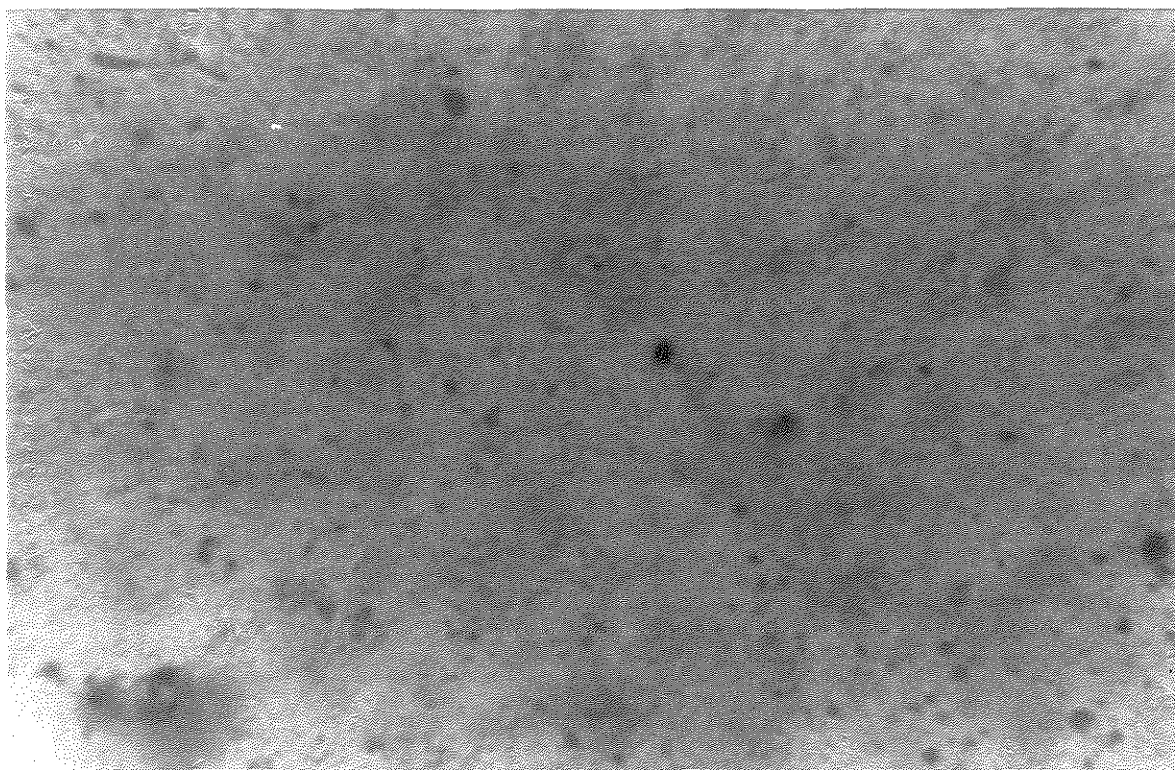
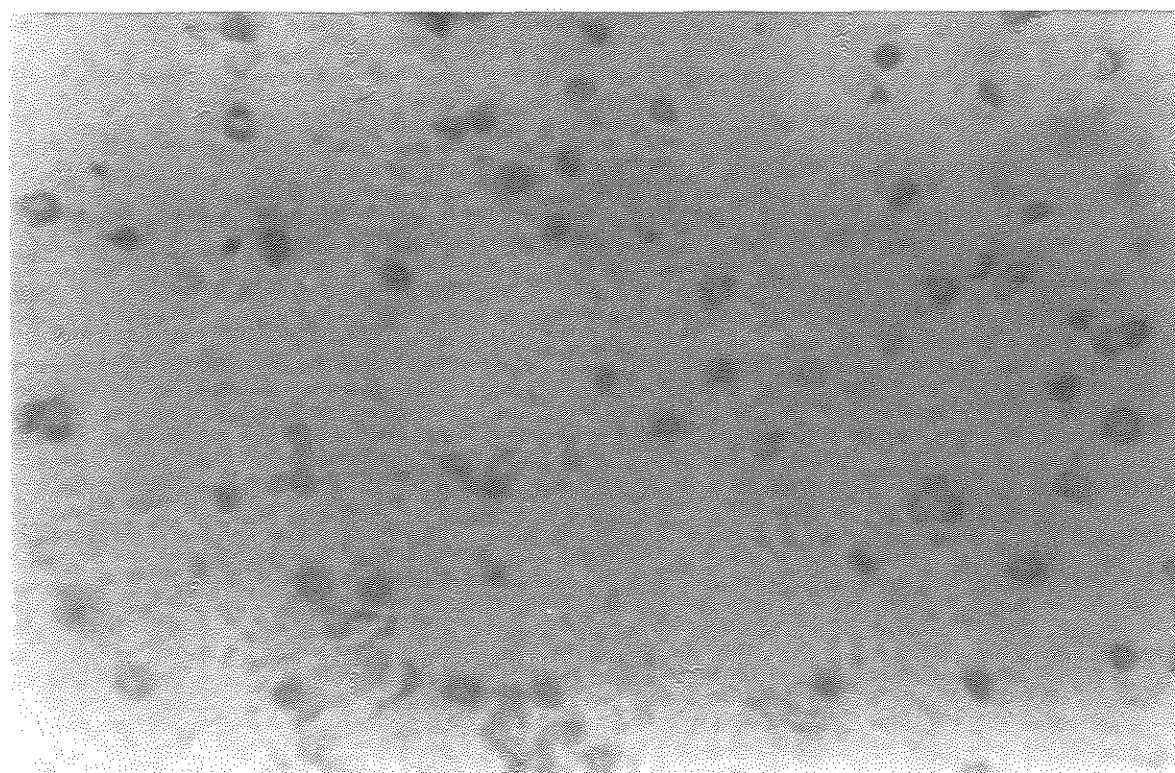


Figura 4.3. Continuação da página anterior.

Na figura 4.5 podemos observar as diferenças nas formas das plaquetas aderidas às superfícies do poliuretano (4.5a) e de uma amostra de polietileno de baixa densidade (4.5b). No polietileno nota-se a formação de pseudopodos, indicando a ativação das plaquetas, enquanto que no poliuretano as plaquetas não apresentam deformação. Isso demonstra que mesmo sem nenhum tratamento o PU já exibe uma razoável compatibilidade com o sangue.



(a)



(b)

Figura 4.4. Fotografias das superfícies com plaquetas aderidas observadas ao microscópio ótico (x 1000): (a) PU-PEI3-Alb, (b) PU-PEI9-Alb, (c) PU-PEO-Alb.

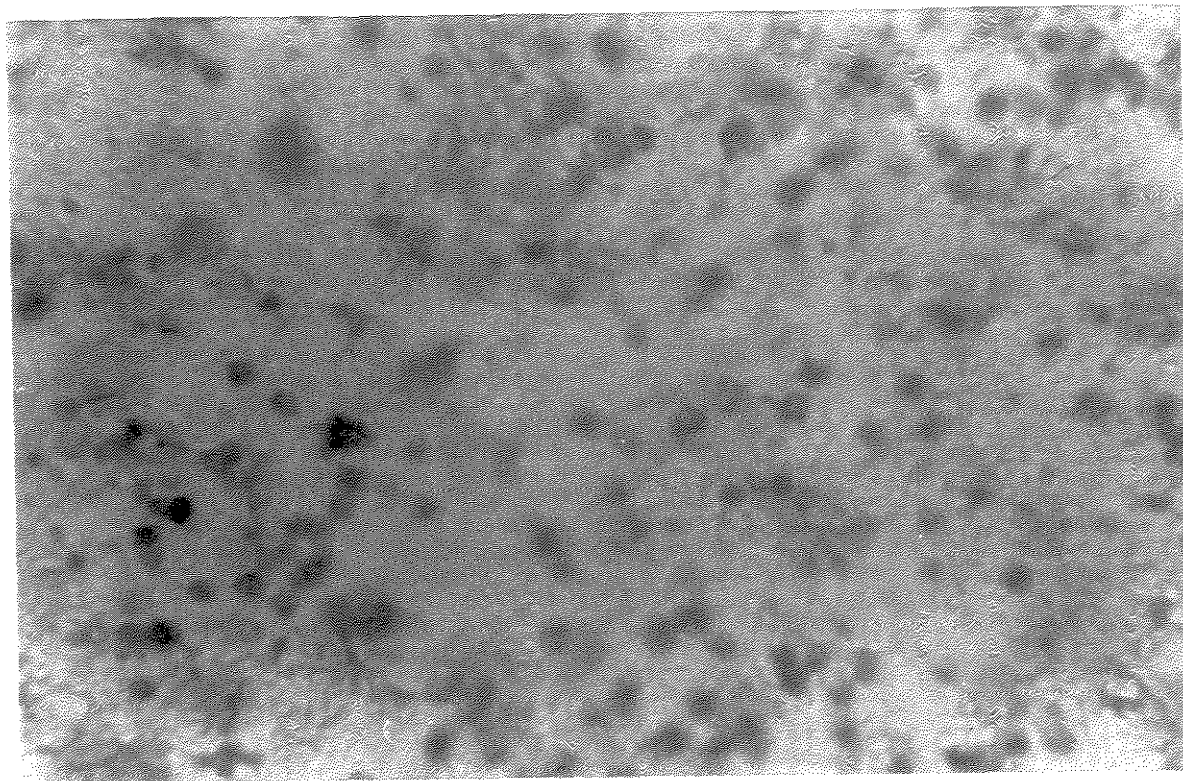


Figura 4.4. Continuação da página anterior

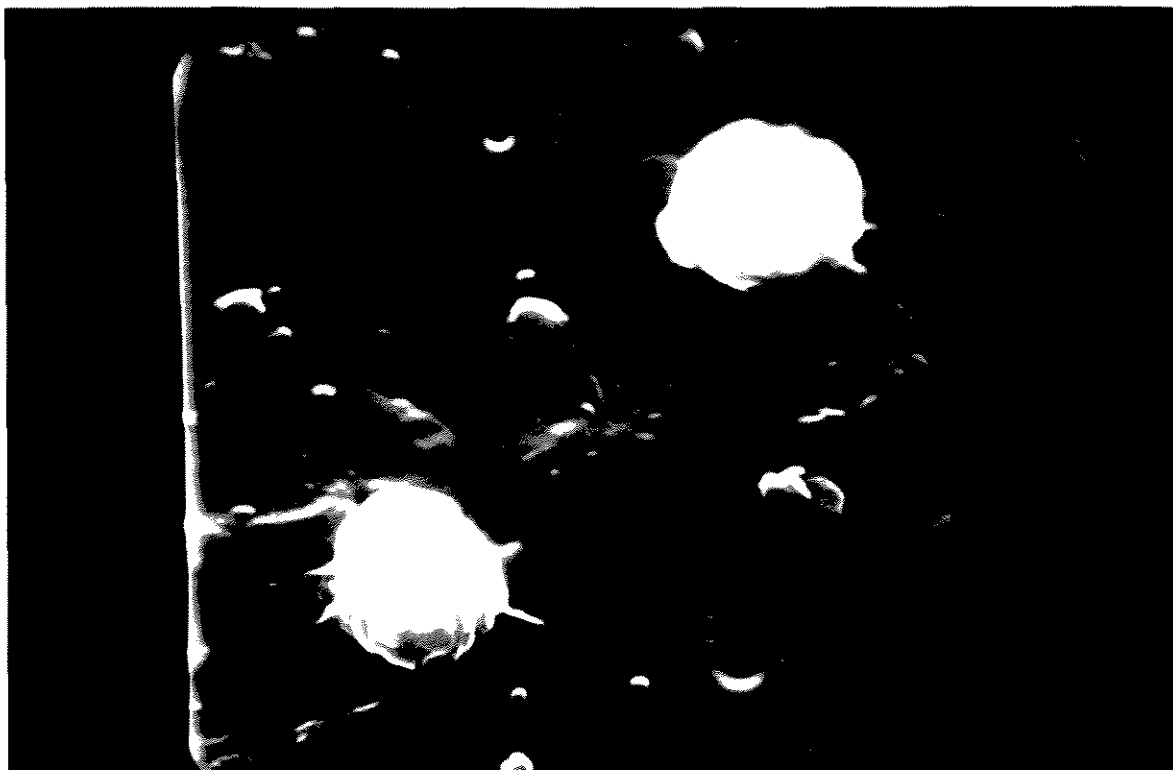
Morfologia superficial

A compatibilidade dos biomateriais depende não só da composição química, mas também da morfologia de sua superfície. A figura 4.6 e 4.7 mostram as fotografias da microscopia eletrônica de varredura dos diferentes tratamentos efetuados na superfície do poliuretano.

A superfície do padrão é relativamente lisa (4.6a), enquanto a do filme tratado com o PEO é bastante rugosa (4.6b). Essa rugosidade aumenta para o filme tratado com heparina (4.6c), porém diminui para a amostra PU-PEO-Alb (4.6d).

Com o tratamento utilizando-se PEI (figura 4.7a) observa-se que aparentemente a superfície encontra-se danificada. Esse tratamento é muito agressivo ao poliuretano devido ao uso do ácido sulfúrico concentrado que chega a causar a hidrólise do material.

(a)



(b)

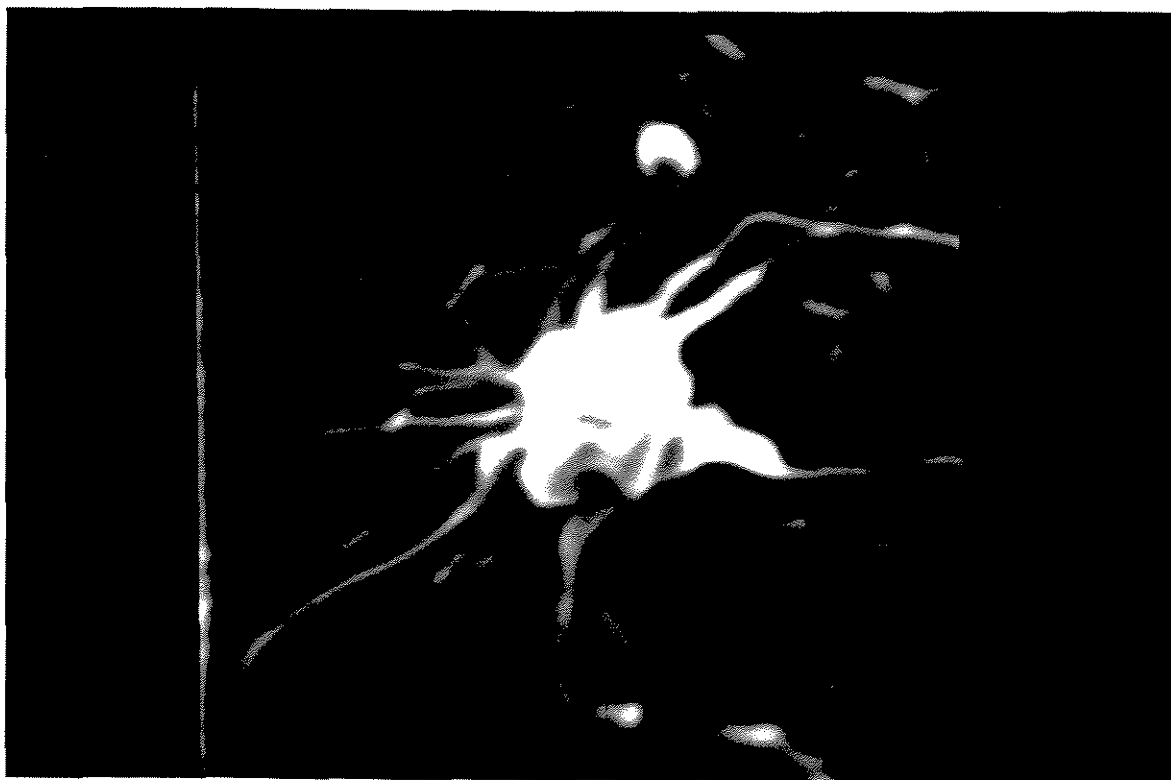


Figura 4.5. Fotografias das plaquetas aderidas às superfícies de poliuretano (a) e polietileno de baixa densidade (b) observadas no MEV (x 10000).

Na amostra PU-PEI-Alb (4.7b) observa-se uma diminuição da rugosidade. Na superfície do PU-PEI-Hep (4.7c) não se observa o aumento de rugosidade observado para o PU-PEO-Hep, porém percebe-se uma mudança da textura.

Medidas de ângulo de contato

A tabela 4.4 mostra os valores de medidas de ângulo de contato para as diversas superfícies estudadas.

Observa-se que as amostras contendo PEO mostram ângulos de contato significativamente menores que o padrão sem tratamento, o que já era esperado devido ao caráter altamente hidrofílico deste. Nota-se que o ângulo de contato aumenta com o aumento do peso molecular do PEO. Esta relação pode ser explicada pelo efeito de reorientação das cadeias poliméricas na superfície. Os grupos hidrofóbicos dos polímeros se orientam em direção à interface com o ar, minimizando a energia livre superficial. Quando o filme PU-PEO inicialmente seco entra em contato com a água, o tempo de reorientação das cadeias de PEO se torna maior com o aumento do peso molecular, devido a sua menor mobilidade, resultando em um ângulo de contato maior [57].

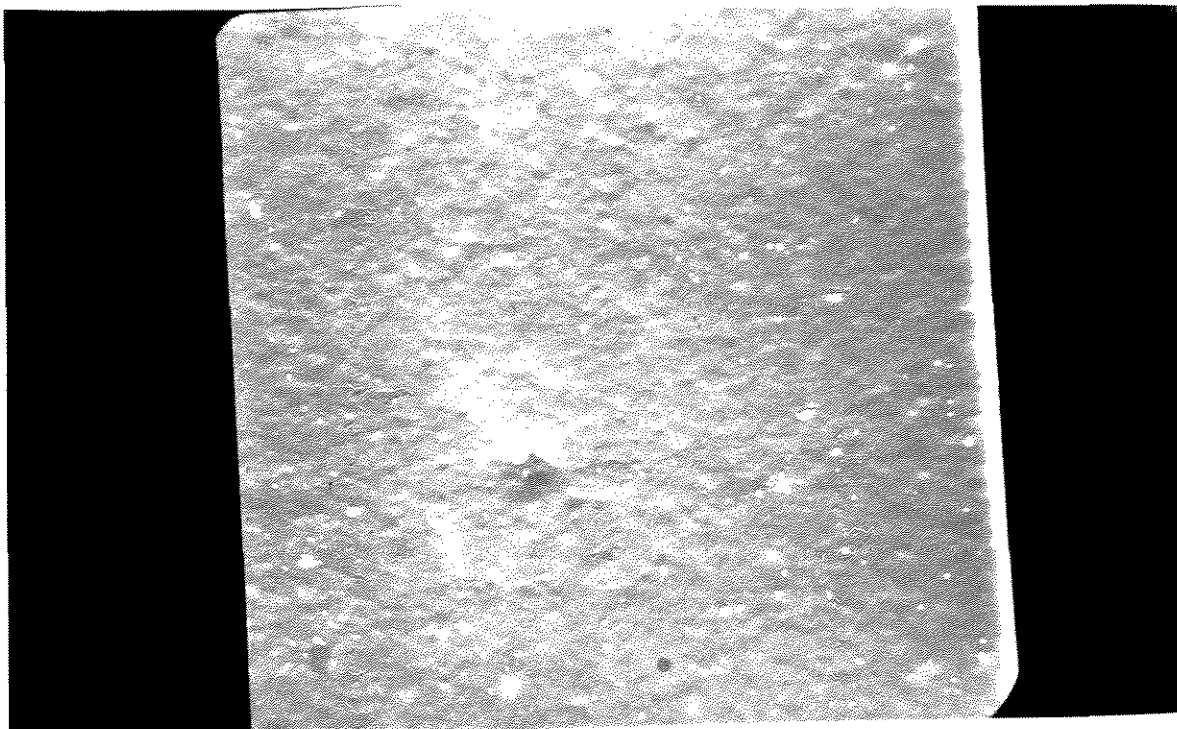
Esperava-se que as amostras contendo heparina apresentassem ângulo de contato menor que o PU-PEO devido à presença de grupos $-SO_3H$ iônicos, porém o que se verifica é que o efeito do PEO parece predominar.

As amostras tratadas com PEI apresentam ângulos de contato ligeiramente menores que o padrão, mas muito superiores aos valores para as superfícies tratadas com PEO. Isso pode ser explicado pelo caráter menos hidrofílico da polietilenoimina. Porém, como visto nas fotos da microscopia eletrônica as amostras apresentam diferenças de rugosidade, o que dificulta uma análise mais precisa sobre os ângulos de contato.

Tabela 4.4. Valores das medidas de ângulo de contato para as superfícies de PU modificadas.

Amostra	Ângulo de contato (°)
Padrão	86,0
PU-PEO400	37,0
PU-PEO400-Hep	36,0
PU-PEO900-Hep	40,0
PU-PEO4500-Hep	47,5
PU-PEO400-Alb	41,5
PU-PEI3	78,0
PU-PEI3-Hep	75,5
PU-PEI9-Hep	74,0
PU-PEI3-Alb	76,0
PU-PEI9-Alb	80,5

(a)



(b)

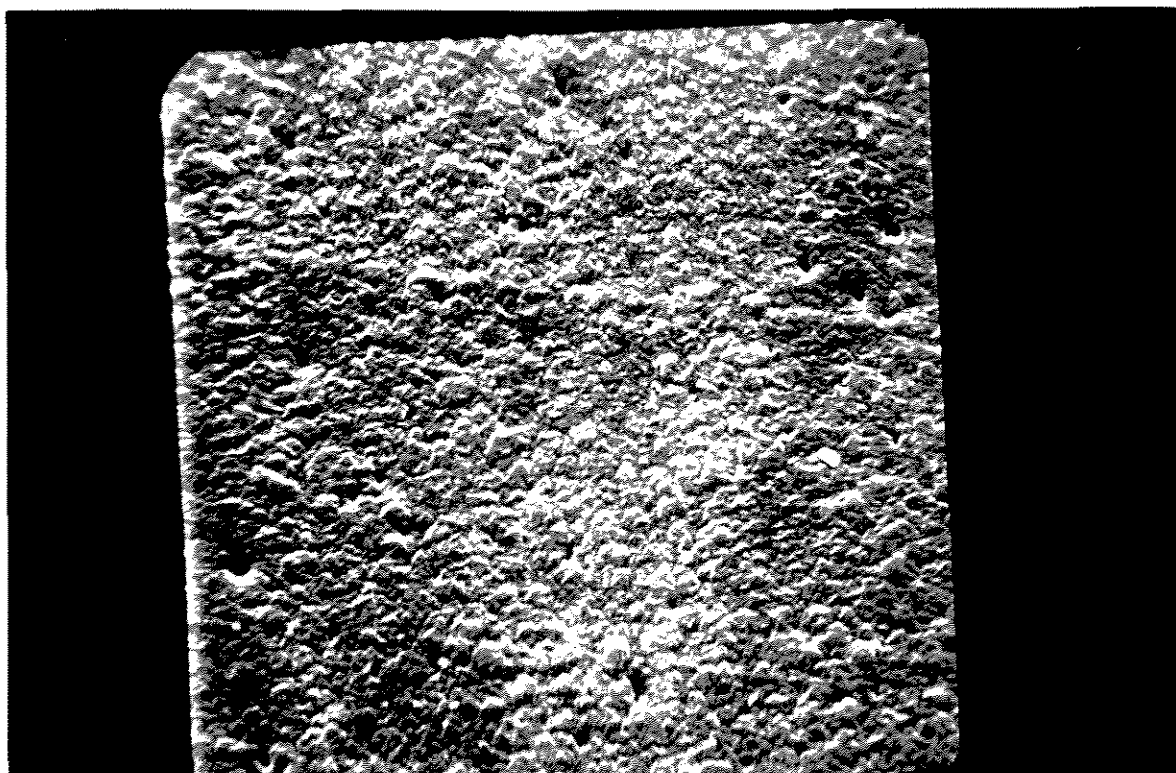
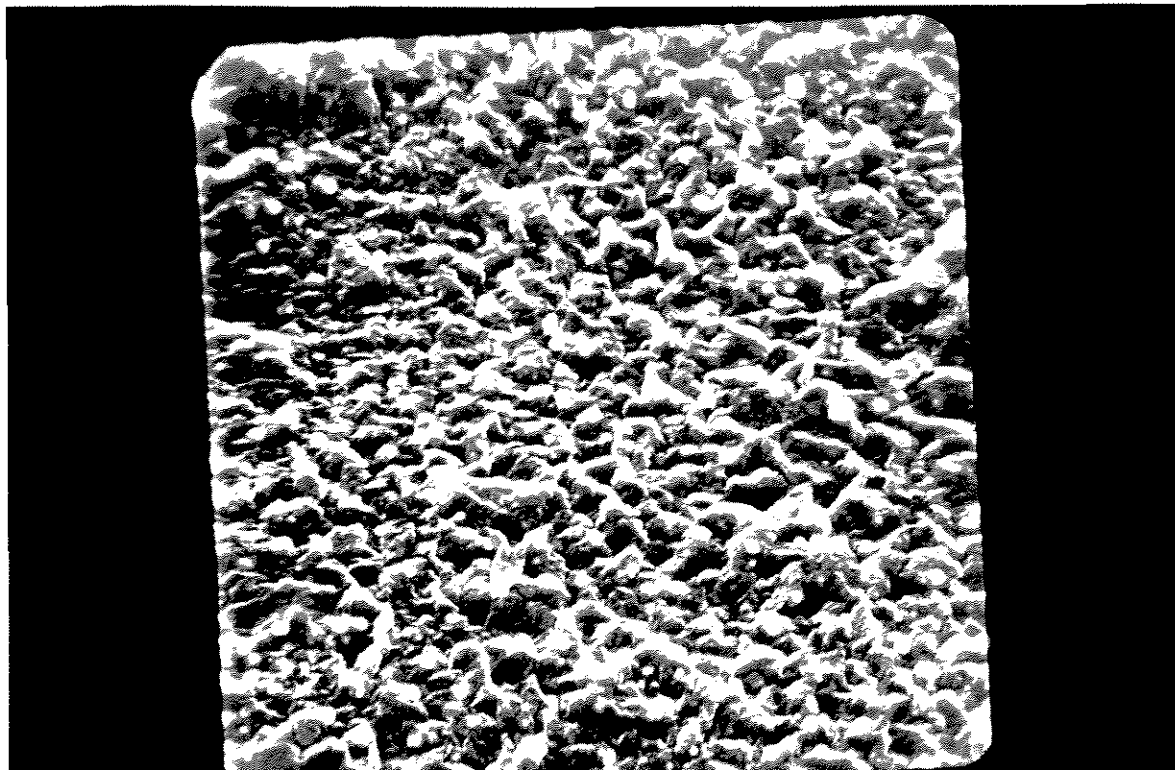


Figura 4.6. Fotografias das diversas superfícies observadas no MEV (x1000): (a) Padrão, (b) PU-PEO, (c) PU-PEO-Hep,(d) PU-PEO-Alb.

(c)



(d)

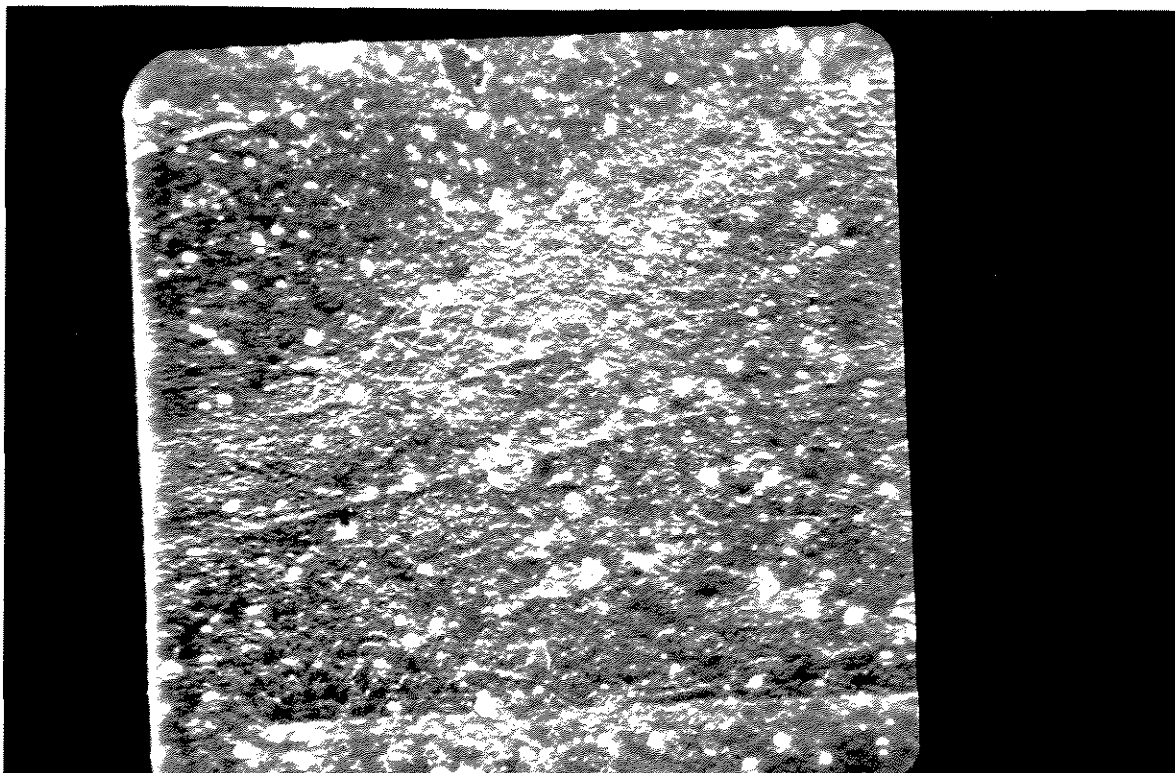
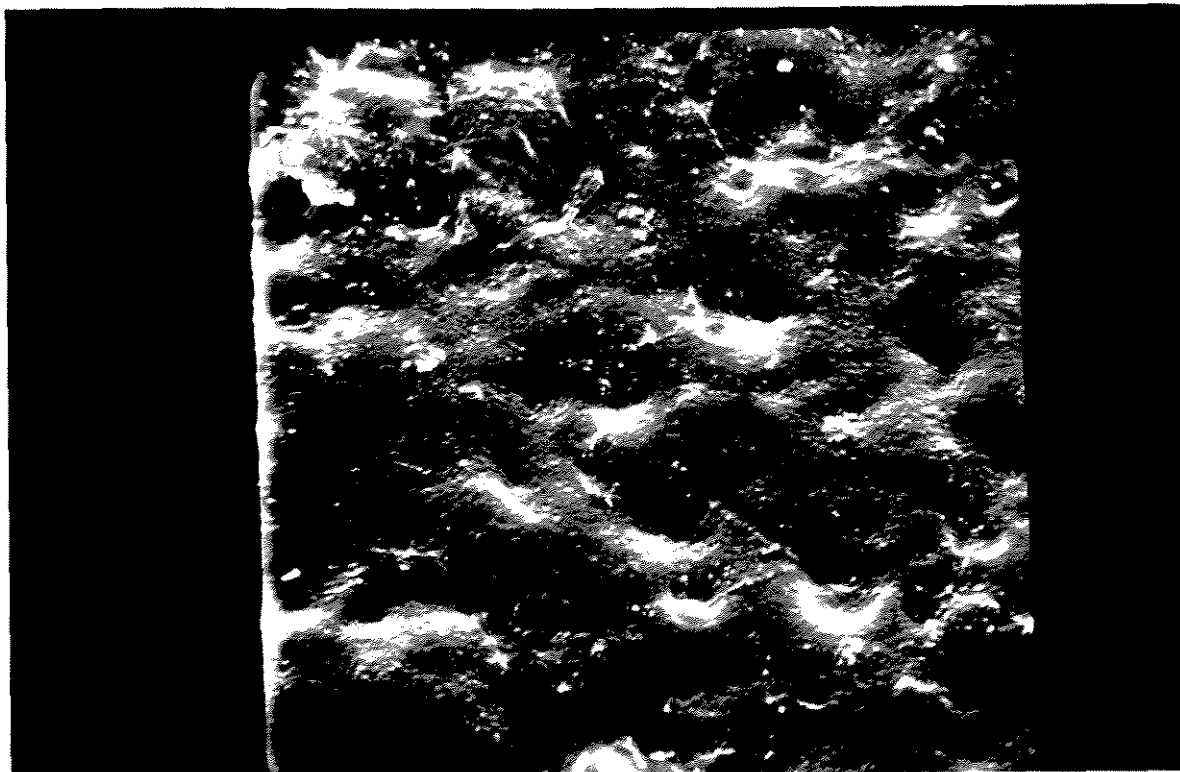


Figura 4.6. Continuação da página anterior.

(a)



(b)

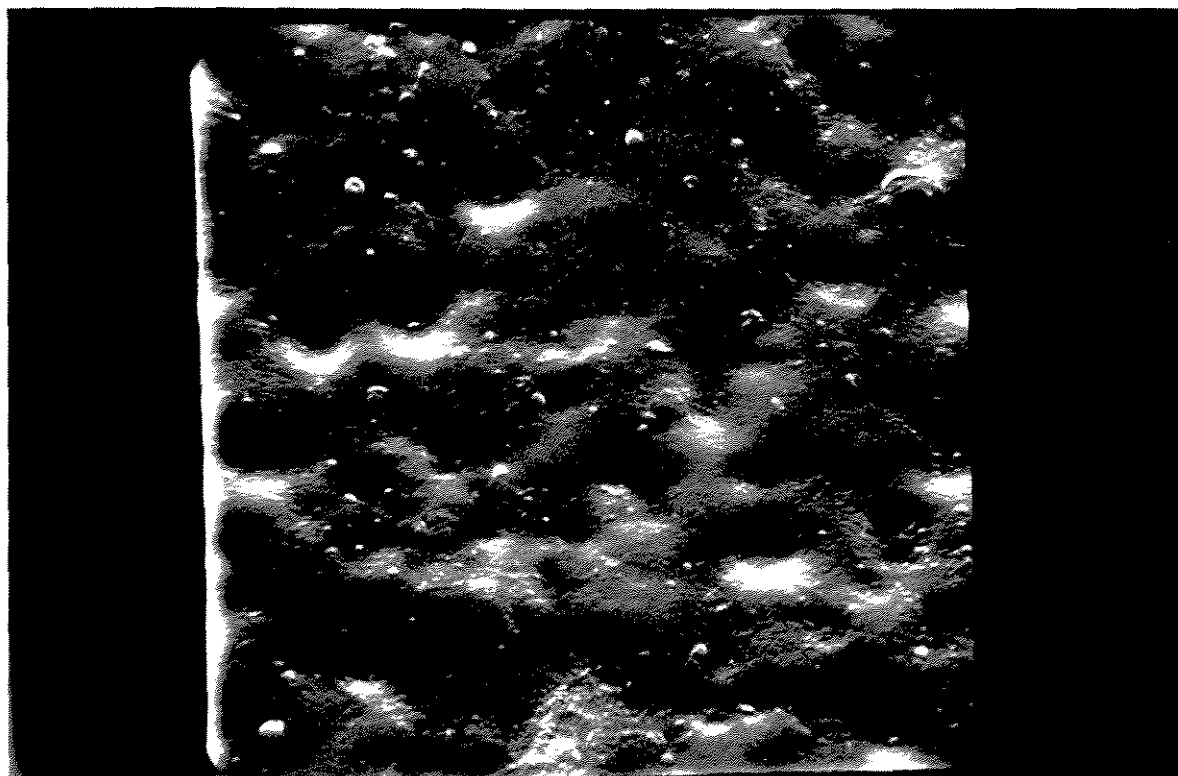


Figura 4.7. Fotografias das diversas superfícies observadas no MEV (x1000): (a) PU-PEI, (b) PU-PEI-Hep, (c) PUPEI-Alb.

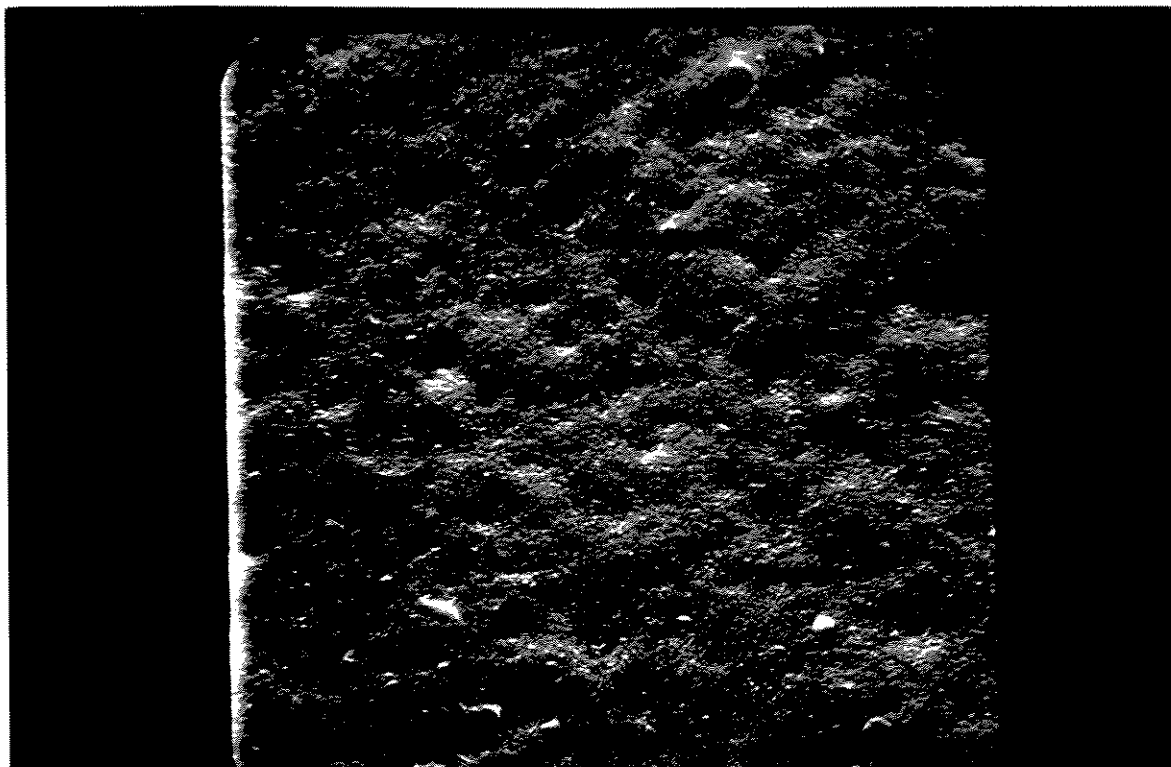


Figura 4.7. Continuação da página anterior.

Capítulo 5. Conclusões e sugestões

Conclusões

1. Todos os tratamentos propostos foram capazes de imobilizar heparina e albumina na superfície do poliuretano.
2. O peso molecular do poli(óxido de etileno) utilizado influencia na quantidade de heparina imobilizada.
3. Para o tratamento com PEI, o pH 3,0 é mais eficiente tanto para a imobilização de heparina quanto de albumina.
4. A hidrofiliçidade da superfície do poliuretano foi significativamente aumentada após a enxertia do PEO.
5. A amostra PU-PEO mostra uma diminuição do número de plaquetas aderidas. As amostras tratadas com PEI e heparinizadas também diminuíram a adesão de plaquetas em relação ao padrão, porém a superfície PU-PEO-Hep se mostrou mais eficaz quando comparada às anteriores.
6. A heparina imobilizada na superfície do poliuretano aumentou o tempo de coagulação do sangue *in vitro* quando comparado com o padrão e demais tratamentos. A albumina não produz nenhum efeito significativo nos fatores de coagulação.

7. Todos os tratamentos provocaram um aumento na rugosidade da superfície polimérica. Um efeito mais acentuado foi observado para a amostra PU-PEO-HEp.

Sugestões

1. Testar o tempo ótimo de reação do isocianato trifuncional em comparação ao isocianato linear.
2. Testar como o processamento do filme (acabamento superficial) influencia no tratamento superficial.
3. Comparar a imobilização da heparina de baixo e alto peso molecular em termos de eficiência do tratamento e de atividade anticoagulante
4. Fazer estudos comparativos da reatividade dos isocianatos lineares e trifuncionais.
5. Testar outros polióis.
6. Testar e avaliar a imobilização do conjugado de heparina-albumina.
7. Estudar a síntese do poliuretano segmentado com os grupos funcionais responsáveis pela atividade antitrombogênica da heparina.

Capítulo 6. Referências bibliográficas

1. Peres, L.//- Desenvolvimento e caracterização de imunosorvente e avaliação de desempenho em ensaios imunoenzimáticos.// Campinas, 1986.// Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia de Campinas - Universidade Estadual de Campinas.
2. Oliveira, Y. M. B.// Estudo de propriedades de filmes de PVC submetidos a processos de esterilização visando sua utilização em bolsas de sangue.// Campinas, 1991.// Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas.
3. Bettini, S. H. P.// Estudo do efeito da radiação gama sobre as propriedades de blendas baseadas em PP isotático, Campinas, 1992.// Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas.
4. Lyman, D. J.//- Polymers in medicine, an overview.//em Chiellini, E.; Giusti, P., eds.// Polymers in medicine - Biomedical and pharmacological applications.// New York, Plenum Press, 1982.// p. 215-218.
5. Hench, L. L.//- Biomaterials.//Science, 208(23): 826-831, 1980.
6. Akutsu, T.; Kantrowitz, A.//- Problems of materials in mechanical heart systems.//J. Biomed. Mat. Res. 1: 33-54, 1967.
7. Park, J.B.//- Biomaterials - An introduction.//New York, Plenum Press, 1980, p. 131-185.
8. Lee, H.; Neville, K.//- The challenge for high polymers in medicine, surgery, and artificial internal organs.//In Rembaum, A.; Shen, M., eds.// Biomedical polymers.// New York, Marcel Dekker, 1971.// p. 263-279.
9. Zweifach, B. W.//- Problems in blood-tissue reactions to polymeric materials.//In Rembaum, A.; Shen, M., eds.// Biomedical polymers.// New York, Marcel Dekker, 1971.// p. 5-15.
10. Biggs, A.D.//- Human blood, coagulation, haemostasis e 15-27.
11. Medtronic/ Carmeda bioactive surface - An overview, Compendium of scientific information, não publicado.
12. Horbett, T. A.//- Protein adsorption on biomaterials.//In: Cooper, S. L.; Peppas, N., eds.// Biomaterials, interfacial phenomena and applications.// New York, American Chemical Society, 1982.// p. 233-244.
13. Colman, R. W.; Scott, C. F.; Schmaier, A. H. et al.//- Initiation of blood coagulation at artificial surfaces.//In: Leonard, E. F.; Turitto, V. T.; Vroman, L., eds.// Blood in contact with

natural and artificial surfaces.// New York, Annals of the New York Academy of Sciences, 516, 1987.// p. 253-267.

14. Jozefonvicz, J.; Jozefowicz, M.// Interactions of bioespecific funtional polymers with blood-proteins and cells.// J. Biomat. Sci. Polymer Edn., 1(3): 147-165, 1990.
15. Braatz, J. A.; Heifetz, A. H.; Kehr, C. L.// A new hydrophilic polymer for biomaterial coatings with low protein adsorption.// J. Biomat. Sci. Polymer Edn., 3(6): 452-462, 1992.
16. Chandy, T.; Sharma, C. P.// Effects of lipoproteins on protein/platelet interactions on polymers.// J. Biomed. Mat. Res., 25: 1085-1094, 1991.
17. Bruck, S. D.// Medical applications of polymeric materials.// Medical progress through technology, 9: 1-16, 1982.
18. Boretos, J. W.// The chemistry and biocompatibility of specific polyurethane systems for medical use.//In: Williams, D. F.// Biocompatibility of clinical implant materials, vol. II.// Boca Raton, CRC Press, 1981, p. 127-144.
19. Ito, Y.; Imanishi, Y.// Blood compatibility of polyurethanes.// Critical Reviews in biocompatibility, 5(1): 45-104, 1989.
20. Mirkovitch, V.; Akutsu, T.; Kolff, W. J.// Intracardiac thrombosis on plastics in relation to construction of artificial valves.// J. Appl. Physiol., 16: 2, 1961, apud Ito, Y.; Imanishi, Y.// Blood compatibility of polyurethanes.// Critical Reviews in biocompatibility, 5(1):45-104, 1989.
21. Boretos, J. W.; Pierce, W. S.// Segmented polyurethane: A new elastomer for biomedical.// Science, 158: 1481, 1967, apud Ito, Y.; Imanishi, Y.// Blood compatibility of polyurethanes.// Critical Reviews in biocompatibility, 5(1):45-104, 1989.
22. Lelah, M. D.; Cooper, S. L.// Polyurethanes in medicine.// Boca Raton, CRC Press, 1986.
23. Dieterich, D.; Grigat, E.; Hahn, W.// Chemical and physical-chemical principles of polyurethane chemistry.// In: Oertel, G., ed.// Polyurethane handbook.// New York, Hanser Publishers, p. 7-41.
24. Lelah, M. D.; Lambrecht, L. K.; Young, B. R.; Cooper, S. L.// Physicochemical characterization an *in vivo* blood tolerability of cast and extruded Biomer.// J. Biomed. Mat. Res., 17: 1-15, 1983.
25. Nyilas, E.; Ward, R. S. Jr.// Development of blood-compatible elastomers. V. Surface esturcture and blood compatibility of Avcothane® elastomers.// J. Biomed. Mat. Res., 8: 69-86, 1977.
26. Sung, C. S. P.; Hu, C. B.; Merril, E.W.; Salzman, E. W.// Surface chemical analysis of

- Avcothane® and Biomer® by fourier transform IR internal reflection spectroscopy// J. Biomed. Mat. Res., 12: 791-810, 1978.
27. Szycher, M.; Dempsey, D.; Poirier, V. L.// Surface fissuring of polyurethane-based pacemaker leads.// Trans. Soc. Biomat., 7: 24-36, 1984.
 28. Szycher, M.; Poirier, V. L.; Keiser, J.// Selection of materials for ventricular assist pump development and fabrication.// Trans. Am. Soc. Art. Int. Org., 23: 116-125, 1977.
 29. Gilding, D. K.; Reed, A. M.; Askill, I. N.; Briana, S.// Mitrathane® - a new polyetherurethaneurea for medical applications.// Trans. Soc. Biomat., 7: 13-31, 1984.
 30. Arkles, B. C.// IPN-modified silicone thermoplastics.// Med. Dev. Diag. Ind., 6: 66-83, 1983.
 31. Nojiri, C.; Aomi, S.; Yamagishi, M.; Koyanagi, H.; Kataoka, K.; Okano, T.// Experimental study of heparinless temporary shunt using TOYOBO-TM3-coated tube.// Trans. Soc. Biomat., 7: 359-370, 1984.
 32. Gombotz, W. R.; Guanghui, W.; Horbett, T. A. et al.// Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces.// J. Biomed. Mat. Res., 25: 1547-1562, 1991.
 33. Desai, N. P.; Hubbell, J. A.// Solution technique to incorporate polyethylene oxide and other water-soluble polymers into surfaces of polymeric biomaterials.// Biomaterials, 12: 144-152, 1991.
 34. Sederel, L. C.; van der Does, L.; van Duijl, J. F. et al.// Anticoagulant activity of a syntetic heparinoid in relation to molecular weight and N-sulfate content.// J. Biomed. Mat. Res., 15:819-827, 1981.
 35. Ito, Y.; Iguchi, Y.; Kashiwaghi, T. et al.// Synthesis and nonthrombogenicity of polyetherurethaneurea film grafted with poly(sodium vinyl sulfonate).// J. Biomed. Mat. Res., 25: 1347-1361, 1991.
 36. Ito, Y.; Sisido, M.; Imanishi, Y.// Synthesis and antithrombogenicity of anionic polyurethanes and heparin-bound polyurethanes.// J. Biomed. Mat. Res., 20: 1157-1177, 1986.
 37. Heyman, P. W.; Cho, C. S.; McRea, J. C. et al.// Heparinized polyurethanes: *In vitro* and *in vivo* studies.// J. Biomed. Mat. Res., 19: 419-436, 1985.
 38. Lin, S. C.; Jacobs, H. A.; Kim, S. W.// Heparin immobilization increased through chemical amplification.// J. Biomed. Mat. Res., 25:791-795, 1991.
 39. Elgue, G.; Blomback, M.; Olsson, P.; Riesenfeld, J.// On the mechanism of coagulation inhibition on surfaces with end point immobilized heparin.// Thrombosis and Haemostasis, 70 (2): 289-293, 1993.

40. Larm, O.; Larsson, R.; Olsson, P.// A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue.// *Biomater. Med. Dev., Art. Org.*, 11: 161-173, 1983.
41. Aoshima, R.; Kanda, Y.; Takada, A. et al.// Sulfonate poly(vinylidene fluoride) as a biomaterial: immobilization of urokinase and biocompatibility.// *J. Biomed. Mat. Res.*, 16: 289-299, 1982.
42. Jacobs, H. A.; Okano, T.; Kim, S. W. et al.// Antithrombogenic surfaces: characterization and bioactivity of surface immobilized PGE₁-heparin conjugate.// *J. Biomed. Mat. Res.*, 4: 611-630, 1989.
43. Burkel, W. E.; Graham, L. M.; Stanley, J. C.// Endothelial linings in prosthetic vascular grafts.// In: Leonard, E. F.; Turitto, V. T.; Vroman, L., eds.// *Blood in contact with natural and artificial surfaces*.// New York, Annals of the New York Academy of Sciences, 516, 1987, p. 131-144.
44. O'Reilly, R. A.// Anticoagulant, antithrombotic and thrombolytic drugs.// In: Gilman, A. G.; Goodman, L. S.; Rall, T. W. et al., eds.// *The pharmacological basis of therapeutics*.// 7. ed.// New York, MacMillan Publishing Company, 1985, p. 1338-1345.
45. Korolkovas, A.; Burckhalter, J. A.// *Química Farmacêutica*.// Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1982, p. 422-430.
46. Holmer, E.; Söderström, G.; Andersson, L. A.// Studies on the mechanism of the rate-enhancing effect of heparin on the thrombin-antithrombin III reaction.// *Eur. J. Biochem.*, 93: 1-5, 1979.
47. Oosta, G. M.; Gardner, W. T.; Beeler, D. L. et al.// Multiple functional domains of the heparin molecule.// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 829-833, 1981.
48. Rosenberg, R. D.// The function of heparin.// In: Kakkar, V. V.; Thomas, D. P.// *Heparin- Chemistry and clinical usage*.// London, Academic Press, 1976, p. 101-119.
49. Stead, N.; Kaplan, A. P.; Rosenberg, R. D.// Inhibition of activated factor XII by antithrombin-heparin cofactor.// *The J. of Biol. Chem.*, 251: 6481-6488, 1976.
50. Gott, V. L.; Whiffen, J. D.; Dutton, R. C.// Heparin bonding on colloidal surfaces.// *Science*, 142: 1297-1299, 1963.
51. Leininger, R. I.; Cooper, C. W.; Falbs, R. D. et al.// Nonthrombogenic plastic surfaces.// *Science*, 152: 1625-1626, 1966.
52. Labarre, D.; Jozefowicz, M.; Boffa, M. C.// Properties of heparin-poly(methyl methacrylate) copolymers. II.// *J. Biomed. Mat. Res.*, 11: 283-295, 1977.

53. Stewart, G. P.; Wilkov, M. A.// - Mechanism of failure of biocompatible-treated surfaces.// *J. Biomed. Mat. Res.*, 10: 413-428, 1976.
54. Larsson, R. L.; Hjelte, M. -B.; Eriksson, J. V. et al.// - The stability of glutardialdehyde-stabilized ³⁵-heparinized surfaces in contact with blood.// *Thrombos. Haemostas. (Stuttg.)*, 37: 262-273, 1977.
55. Schmer, G.// - The biological activity of covalently immobilized heparin.// *Trans. Am. Soc. Art. Int. Org.*, 18: 321-323, 1972.
56. Cholakis, C. H.; Sefton, M. V.// - Chemical characterization of an immobilized heparin: heparin-PVA.// In: Shalaby, S. W.; Hoffman, A. S.; Ratner, D. et al.// *Polymers as biomaterials.*// New York, Plenum Press, 1984, p. 305-315.
57. Han D. H.; Park, K. D.; Ahn, K. D. et al.// - Preparation and surface characterization of PEO-grafted and heparin-immobilized polyurethanes.// *J. Biomed. Mat. Res.: Applied Biomat.*, 23(A1): 87-104, 1989.
58. Nojiri, C.; Okano, T.; Park, K. D. et al.// - Suppression mechanisms for thrombus formation on heparin-immobilized segmented polyurethane-ureas.// *Trans. Am. Soc. Art. Int. Org.*, 34: 386-397, 1988.
59. Park, K. D.; Okano, T.; Nojiri, C. et al.// - Heparin immobilization onto segmented polyurethaneurea surfaces- effect of hydrophilic spacers.// *J. Biom. Mat. Res.*, 22: 977-992, 1988.
60. Andrade, J. D.// - Interfacial phenomena and biomaterials.// *Med. Instr. Baltimore*, 7: 110-121. 1973.
61. Adamson, A. W.// - Physical chemistry of surfaces.// New York, John Wiley & Sons, 1976,
62. Kaelbe, D. H.// - Physical chemistry of adhesion.// New York, John Wiley & Sons, 1971, p. 143.
63. Reggiani, A. E.// - Estudo da formulação de revestimentos fotocuráveis para fibras óticas sob o aspecto da adesão com a superfície vítrea.// *Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.*
64. Han D. K.; Jeong, S. Y.; Kim, Y. H. et al.// - Negative cilia concept for thromboresistance: Synergistic effect of PEO and sulfonate groups grafted onto polyurethanes.// *J. Biomed. Mat. Res.*, 25: 561-575, 1991.
65. Hoffman, A. S.// - Blood-biomaterial interactions: An overview.// In: Cooper, S. L.; Peppas, N., eds.// *Biomaterials, interfacial phenomena and applications*, New York, American Chemical Society, 1982.

66. Lee, J. H.; Kopecek, J.; Andrade, J. D.// Protein resistant surfaces prepared by PEO-containing block copolymer surfactants.// *J. Biomed. Mat. Res.*, 23: 352-368, 1989.
67. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.// Spectrometric identification of organic compounds.// 4. ed.// New York, John Wiley & Sons, 1981, p. 95-104.
68. Albuquerque, A. S.// Um estudo sobre a possibilidade de compatibilização em compósitos por siliconas.// Salvador, 1993.// Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal da Bahia.
69. Borgdorff, P.; Kok, W. E.M.; Van Der Bos, G. C.// Extracorporeal circuits and autoregulation: effect of albumin coating.// *Amer. J. Physiol.*, 261: H1397-H1401, 1992.
70. Smith, P. K.; Malia, A. K.; Hermanson, G. T.// Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparation.// *Anal. Biochem.*, 109: 466-473, 1980.
71. Bradford, M. M.// A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.// *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
72. Sharma, C. P.; Seycher, M.(Eds.)// Blood compatible materials and devices.// Lancaster - Basel, Technomic Publishing Co., Inc., 1991, p. 131-140.
73. Han, D. K.; Jeong, S. Y.; Kim, Y. H.// Evaluation of blood compatibility of PEO grafted and heparin immobilized polyurethanes.// *J. Biomed. Mat. Res., Apl. Biomaterials*, 23 (A2): 211-228, 1989.
74. Farfan, J. A.// Química de proteínas.// Campinas, Editora da Unicamp, 1990.
75. Allinger, N. L.// Química orgânica.// 4ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1978, p. 626-628.
76. Park, K. D.; Kim, W. G.; Jacobs, H.; Okano, T.; Kim, S. W.// Blood compatibility of SPUU-PEO-Heparin graft copolymers.// *J. Biomed. Mat. Res.*, 26: 739-756, 1992.
77. Goosen, M. A.; Sefton, M. V.// Heparinized styrene-butadiene-styrene elastomers.// *J. Biomed. Mat. Res.*, 13: 347-364, 1979.
78. Lagergren, H.; Olsson, P.; Swedenborg, J.// Inhibited platelet adhesion: a non-thrombogenic characteristic of a heparin-coated surface.// *Surgery*, 75: 43-650, 1974.
79. Edbert, C. D.; Kim, S. W.// Immobilized heparin: spacer arm effects on biological interactions.// *Thromb. Res.*, 26: 43-57, 1982.