

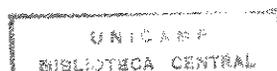
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Engenharia Química**  
**Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais**

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE POLIETILENO DE BAIXA  
DENSIDADE ATRAVÉS DE ENXERTIA QUÍMICA E  
FOTOQUÍMICA PARA FINS BIOMÉDICOS**

**AUTORA: MARIZA BATISTOM**  
**ORIENTADORA: Profa. Dra. LÚCIA H. INNOCENTINI MEI**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

**FEVEREIRO- 1995**  
**CAMPINAS-SP**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	B32m
V. E.	
TEMPO BC/	28.263
PREÇO	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 13,00
DATA	15/08/96
N.º CPD	

CM-00091263-6

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

B32m      Batistom, Mariza  
 Modificação superficial de polietileno de baixa densidade através de enxertia química e fotoquímica para fins biomédicos / Mariza Batistom.--Campinas, SP: [s.n.], 1995.

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

1. Polietileno. 2. \*Fotoenxertia. 3. Materiais biomédicos. 4. Biocompatibilidade. I. Mei, Lúcia Helena Innocentini. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese defendida e aprovada em 20 de fevereiro de 1995 pela banca examinadora constituída pelos professores:



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lúcia Helena Innocentini Mei



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Olga Zazuco Higa



---

Prof. Dr. Sergio Persio Ravagnani

Esta versão corresponde a redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela aluna Mariza Batistom e aprovada pela Comissão Julgadora em 20/02/95.



---

Prof. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei

Orientadora

**Aos meus pais,  
por todo amor e estímulo  
em todos os momentos.**

## AGRADECIMENTOS

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

À Poliolefinas pelo fornecimento dos filmes de polietileno de baixa densidade sem aditivos.

Ao Instituto de Química da Unicamp, pela realização das análises de ATR-IR e Microscopia Ótica, em especial:

Prof. Dr. Celso Davanzo, Márcia e Lúcia.

À Faculdade de Engenharia Mecânica, pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura, em especial:

Rita H. B. Jacon.

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

Dr. Valder Arruda, Dra. Joyce M. A. Bizzachi, Cristina e Sonia.

À Telebrás, pela realização das medidas de ângulo de contato.

Ao Departamento de Sistemas Químicos, da FEQ, pelo uso de seus microcomputadores.

Às meninas do laboratório: Carla, Veruska, Daniela, Stella e Daniela C., pela amizade e auxílio nos trabalhos de laboratório.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu irmão Júnior, pela amizade e apoio sempre.

Ao Madeireiro, aos meninos da Rhodia e à Cristiane pela amizade e companheirismo em todos os cursos que fizemos juntos.

À Prof. Dra. Sandra Lúcia da Cruz, pela amizade e apoio manifestados principalmente nas etapas finais deste trabalho.

Aos amigos do Grêmio, Maria Alice, Adriana, Rodinha, Cabral, Lulu, Jotinha, Peter, Lurdinha, Rodrigo e Nancy que participaram de todos os bons momentos nestes anos.

À Vera, pela amizade sempre.

À amiga Inês pelas proveitosas discussões e idéias e que, literalmente, deu o sangue por este trabalho.

*Mariza Batistom*

## TRABALHOS PUBLICADOS

Batistom, M. and Mei, L. H. I. - "Surface modification of polyethylene by photoinduced grafting for biomedical applications " apresentado e publicado no 4º Latin - American Polymer Symposium / 2º Ibero-American Polymer Symposium / 6º International Macromolecular Colloquium. Setembro , 1994 / Gramado - Brasil.

Batistom, M., Garcia, I. L. and Mei, L. H. I. - " Modification of polyethylene and polyurethane for biomedical use" publicado no 5º European Polymer Federation Symposium on Polymeric Materials. Outubro , 1994 / Basel - Switzerland.

## RESUMO

Na tentativa de aumentar a biocompatibilidade de polímeros, dois tipos de enxertia foram realizados utilizando-se polietileno de baixa densidade (LDPE) como substrato: enxertia química e fotoquímica.

No caso fotoquímico, desenvolveu-se um reator para a realização da enxertia de três monômeros: ácido acrílico, acrilamida e metacrilato de glicidila. No copolímero enxertado com metacrilato de glicidila imobilizou-se heparina, que é um anticoagulante, e albumina, uma proteína passivadora de superfície. A imobilização de heparina e albumina também foi realizada através de enxertia química usando um agente de ligação, o polietilenoimina.

As técnicas para caracterização de superfície utilizadas foram: Espectroscopia de Infravermelho de Reflexão Total Atenuada (ATR-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), medidas de ângulo de contato e métodos colorimétricos. Para a caracterização quanto à trombogenicidade foram realizados testes *in vitro* de adesão plaquetária e Tempo de Trombosplatina Parcial Ativado (TTPA).

Todas as reações de enxertia foram confirmadas através dos espectros de ATR-IR. A imobilização de albumina e heparina foram também confirmadas através de testes colorimétricos. Os tratamentos realizados foram eficientes para a inibição de adesão plaquetária, mas apenas o copolímero LDPE-g-ácido acrílico apresentou aumento no tempo de coagulação medido através do TTPA.

## ABSTRACT

In order to improve the thromboresistance of low density polyethylene (LDPE), we modified the surfaces of this material by chemical and photochemical grafting.

A photochemical reactor was developed to graft several monomers: acrylic acid, acrylamide and glycidyl methacrylate. Polyethylene grafted with glycidyl methacrylate was used to immobilize heparin which is an anticoagulant and albumin which is a passivating protein. Another method was used to bind heparin and albumin using the polyethylenimine as spacer.

For surface characterization different methods have been used: contact angle measurements, colorimetric methods, Scanning Electron Microscopy, Attenuated Total Reflection Infrared and *in vitro* biocompatibility tests.

The results confirmed all the grafting reactions. The platelets adhesion was inhibited in every treatments, but the sample that demonstrated the improvement of the thromboresistance was LDPE-AA.

# ÍNDICE

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Revisão bibliográfica.....</b>	<b>4</b>
3.1. Biomateriais.....	4
3.2. Polímeros como biomateriais.....	6
3.3. Aplicação específica do LDPE na área médica.....	7
3.4. Biocompatibilidade .....	8
3.4.1. Compatibilidade com os tecidos .....	9
3.4.2. Compatibilidade com o sangue.....	10
3.4.3. Fatores que afetam a compatibilidade com o sangue...	14
3.5. Modificação superficial de polímeros.....	16
3.6. Copolímeros em bloco e de enxerto.....	17
3.6.1. Fotoenxertia.....	18
3.7. Modificação superficial de polímeros para aplicações médicas..	20
3.7.1. Ligação de compostos farmacologicamente ativos.....	20
3.7.1.1. Heparina.....	20
3.7.1.2. Outros agentes anticoagulantes.....	24
3.7.2. Revestimento com materiais biológicos.....	24
3.7.2.1. Proteínas.....	24
3.7.3. Enxertia de monômeros para obtenção de copolímeros.	25
3.8. Reações fotoquímicas.....	25
3.8.1. Fotoquímica de solventes.....	26
3.9. Caracterização de superfície.....	28
3.9.1. Molhabilidade e ângulo de contato.....	29
3.9.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	30
3.9.3. Infravermelho de Reflexão Total Atenuada (ATR-IR)..	33

<b>4. Materiais e métodos.....</b>	<b>34</b>
4.1. Montagem do reator fotoquímico.....	35
4.2. Enxertia por fotosensibilização dos monômeros ácido acrílico, acrilamida e metacrilato de glicidila.....	36
4.3. Verificação de fotooxidação e termopolimerização .....	37
4.4. Reação de heparina em amostra de LDPE-g-GMA.....	37
4.5. Reação de albumina em amostra de LDPE-g-GMA.....	37
4.6. Enxertia química de polietilenoimina .....	37
4.7. Reação de heparina degradada em amostra de LDPE-g-PEI.....	38
4.8. Reação de albumina em amostra de LDPE-g-PEI.....	39
4.9. Análise quantitativa de heparina e albumina imobilizadas.....	39
4.10. Teste de adesão de plaquetas.....	40
4.11. Teste de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA....	41
4.12. Caracterização de superfície.....	41
<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>42</b>
5.1. Quanto ao reator fotoquímico.....	42
5.2. Quanto a fotooxidação e termopolimerização.....	44
5.3. Enxertia fotoquímica dos monômeros.....	45
5.4. Caracterização por ATR-IR.....	47
5.5. Porcentagem de enxertia.....	49
5.6. Reação de heparina e albumina em filmes de LDPE-GMA.....	50
5.7. Reação de heparina e albumina em filmes de LDPE-PEI.....	51
5.8. Caracterização quanto à trombogenicidade .....	54
5.8.1. Medidas de ângulo de contato.....	54
5.8.2. Teste de TTPA.....	55
5.8.3. Teste de adesão de plaquetas.....	57
5.9. Morfologia da superfície por MEV.....	62

<b>6. Conclusões.....</b>	<b>65</b>
<b>7. Sugestões para próximos trabalhos.....</b>	<b>66</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>67</b>

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**

---

Com o aprimoramento de novas técnicas cirúrgicas, recentes pesquisas visam desenvolver materiais compatíveis com o organismo humano. Essas pesquisas tentam melhorar a qualidade de vida de pacientes que necessitam de implantes ou dispositivos que, permanentes ou temporários, estarão em contato com seu organismo.

Neste campo, os materiais poliméricos vêm substituindo com vantagens outros materiais devido as suas propriedades físicas e mecânicas. Estes materiais podem ser usados para substituir ossos e/ou tecidos, fazer a circulação extracorpórea em cirurgias cardíacas, hemodiálises e endoscopias, construir marcapassos. Os polímeros podem ser usados também em aplicações como dispositivos descartáveis para reduzir os riscos de infecções, seringas, suportes para testes imunológicos e para os mais variados fins. Os polímeros mais utilizados em aplicações biomédicas são: poliuretano, silicone, poliestireno, polietileno, polipropileno, teflon®.

Visando melhorar as propriedades de superfície desses materiais, o grupo do Departamento de Tecnologia de Polímeros da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, iniciou suas pesquisas nesta área à algum tempo. Em contato com o INCOR, Instituto do Coração, algumas idéias foram colocadas no sentido de se modificar as propriedades de superfície de polímeros imobilizando algumas moléculas farmacologicamente ativas e já utilizadas em pacientes por injeção intravenosa, como por exemplo, a heparina, que é um anticoagulante administrado em pacientes com alguns tipos de implantes.

---

Neste trabalho, algumas técnicas de enxertia por vias químicas e fotoquímicas foram utilizadas para aumentar a biocompatibilidade do polietileno de baixa densidade não só imobilizando macromoléculas como também trabalhando com outras propriedades de superfície tais como: morfologia e hidrofiliabilidade.

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVO**

## OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo aumentar a biocompatibilidade do polietileno de baixa densidade para fins biomédicos através de vários tratamentos de superfície, tanto imobilizando macromoléculas com propriedades farmacológicas quanto enxertando monômeros hidrofílicos.

**CAPÍTULO III**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3.1. Biomateriais [1]

Os materiais usados para desenvolvimento de implantes ou interfaces no corpo humano são comumente chamados de biomateriais. Um biomaterial pode ser definido como um material que é usado no tratamento de pacientes e que, em algum estágio, interage com tecidos vivos por um significativo espaço de tempo. É este período de tempo que distingue um biomaterial de outros materiais usados somente temporariamente por um cirurgião, tal como um bisturi. De fato, a definição exclui todos os materiais que têm contato com tecidos por curtos períodos, mas inclui todos os que têm contato por mais de algumas horas de duração.

De acordo com a Clemson Advisory Board for Biomaterials, "um biomaterial é uma substância sistêmica e farmacologicamente inerte designada para implante ou para incorporação em sistemas vivos ". Assim, o termo biomaterial engloba todos os materiais usados para aplicações médicas que estejam em interfaces com sistemas vivos ou outros sistemas desenvolvidos para usos extracorpóreos. Os biomateriais incluem metais, cerâmicos, polímeros naturais ( biopolímeros ), polímeros sintéticos de estrutura simples ou complexas. A tabela 1 relaciona alguns dispositivos e suas funções, bem como o material mais utilizado em cada caso.

O controle da interface biomaterial-tecido e biomaterial-sangue é o principal problema no campo da ciência dos biomateriais. A interação de muitos fatores complexos como físicos, biológicos, clínicos e tecnológicos, devem ser considerados para se julgar o sucesso ou fracasso de um biomaterial.

**Tabela 1:** principais dispositivos que utilizam polímeros em sua fabricação [2]

Dispositivo	Função	Biomaterial
crystalino artificial	substituir a cavidade vítreo dos olhos	Silicone
próteses de córnea, lentes intraoculares	corrigir problemas causados por cataratas.	Polimetilmetacrilato
marcapassos	manter o ritmo do coração	fio e eletrodos de platina encapsulados com resinas epoxi e recobertos com borracha de silicone
catéteres e desvios extracorpóreos	desobstrução de veias e artérias, hemodiálises, endoscopias	polietileno com superfícies hidrofílicas, poliuretano, silicone
articulações artificiais como joelhos e quadris	reconstrução de articulações	polietileno de alta densidade
pele artificial	tratamento de queimaduras severas	membranas de silicone ultrafinas, poliuretano enxertado com colágeno

### 3.2. Polímeros como biomateriais [3, 4]

Nas últimas décadas a substituição de metais e cerâmicos por materiais poliméricos, utilizados como biomateriais, vem sendo um procedimento bastante comum. Isto se deve à grande variedade de propriedades mecânicas que os polímeros oferecem, por serem relativamente inertes no contato com o sangue, com os tecidos e pela sua pronta moldabilidade.

Os critérios básicos para o desenvolvimento de materiais para dispositivos biomédicos são muito rígidos, ou seja:

- eles devem ser não tóxicos e não devem produzir qualquer inflamação ou mudança clinicamente indesejáveis nos tecidos ou nos fluidos corpóreos;

- eles devem ser facilmente fabricados por métodos de fabricação disponíveis, reprodutíveis e capazes de fornecer produtos de boa qualidade com melhora nas suas propriedades mecânicas.

- devem ser esterilizáveis. A esterilização destes materiais é essencial; eles devem ser estáveis durante esterilização por todos os métodos utilizados;

- devem ser estáveis durante a implantação. Algumas mudanças nas propriedades físicas, mecânicas ou químicas que venham a ocorrer, não devem causar a perda de sua eficiência;

- não devem degradar liberando produtos prejudiciais, tanto locais como sistêmicos;

- não devem ser carcinogênicos;

Juntamente com estes critérios, o custo final do produto deve ser o mais baixo possível.

A seleção dos materiais para dispositivos depende principalmente de sua aplicação final, isto é, características do "design", duração do uso e natureza básica das aplicações.

Os polímeros se encaixam em quatro categorias diferentes no que diz respeito às aplicações biomédicas :

- aplicações descartáveis
- implantes
- usos farmacológicos
- sistemas biodegradáveis

Do ponto de vista quantitativo, a primeira categoria representa a parte mais significativa do mercado que inclui armazenagem de soluções intravenosas, bolsas de sangue, catéteres de vários tipos, membranas para hemodiálise e outras.

A segunda categoria inclui válvulas para coração artificial, órgãos artificiais, marcapassos cardíacos, próteses para ortopedia, etc.

As duas últimas categorias são de interesse mais recente e estão basicamente ligadas aos sistemas de liberação controlada de drogas e adesivos biodegradáveis para tecidos.

### **3.3. Aplicação específica de polietileno na área médica**

O polietileno é um polímero muito utilizado em catéteres, implantes vasculares, próteses de quadril e reconstrução de articulações, principalmente joelhos.

Os catéteres são utilizados em procedimentos rotineiros como por exemplo a deliberação e injeção de fluidos intravenosos, a compressão de placas em artérias coronárias e a desobstrução de veias em áreas específicas do corpo. Catéteres podem abrir caminhos alternativos em áreas do corpo antes inacessíveis reduzindo, muitas vezes, a necessidade de uma cirurgia [5].

Apesar das numerosas vantagens que o catéter de polietileno possui, sua aplicação por longos períodos ainda é restrito por causa do risco de trombose, flebite e infecções causadas por mecanismos mecânico - químicos [6].

Os três tipos de polietileno existentes, ou seja, o polietileno de baixa densidade, o de alta densidade e o de ultra alto peso molecular, têm aplicações como biomateriais. De acordo com as propriedades mecânicas desejadas, é definido o tipo de polietileno a ser utilizado em cada aplicação.

A polimerização do etileno, via mecanismo radicalar, foi introduzida em 1939 produzindo o que é hoje conhecido como polietileno de baixa densidade

(LDPE). A reação se dá em autoclaves sob pressões entre 15000 e 45000 psi (1000 a 3000 atm) utilizando oxigênio ou peróxidos como catalisadores. Sob tais condições, as moléculas de etileno reagem entre si formando polímeros que apresentam alto grau de ramificações.

Pouco antes de 1950, outro tipo de polietileno foi produzido e apresentou propriedades bem diferentes do polímero já conhecido. Este foi denominado polietileno de alta densidade ( HDPE ) e é produzido sob baixa pressão de polimerização, isto é abaixo de 1500 psi (100 atm ). Este polímero é formado substancialmente de moléculas lineares, com poucas ramificações. Consequentemente uma alta densidade é alcançada.

O polietileno que tem mostrado muita repercussão em cirurgias é o polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE). Este tem peso molecular de aproximadamente  $4 \times 10^6$  e está sendo usado ultimamente para substituição óssea [7].

Portanto, quanto às propriedades mecânicas, o polietileno de baixa densidade se aplica onde não se exige resistência mecânica e onde se necessita materiais flexíveis ou filmes como no caso de catéteres e membranas. Já os polietilenos de alta densidade e de ultra alto peso molecular são usados onde se exige resistência à carga como na reconstrução de quadris, joelhos e outras articulações [8, 9].

### **3.4. Biocompatibilidade**

Nos últimos 20 anos, o desenvolvimento de órgãos artificiais e dispositivos para manter funções vitais tem estimulado pesquisas sobre biocompatibilidade de materiais. Biocompatibilidade é a habilidade de um biomaterial existir dentro do organismo vivo sem afetar significativamente o corpo e sem sofrer nenhum efeito adverso. Um efeito adverso no material, por fluidos fisiológicos, pode levar à liberação de partículas ou materiais solúveis que resulta numa resposta indesejável

no tecido. Portanto, biocompatibilidade envolve principalmente interações químicas que ocorrem entre materiais e fluidos corporais, e as respostas fisiológicas dessas reações. Assim, é muito difícil definir este termo pois cada material é preparado com um objetivo definido.

#### 3.4.1. Compatibilidade com os tecidos

Um implante compatível não deve apresentar efeitos adjacentes, isto é, as células próximas ao implante não devem apresentar nenhuma anormalidade, nenhum tipo de célula diferente deve aparecer, não devem ser notadas reações inflamatórias nem necrose. Em resumo, a histologia ao redor do implante deve ser normal [10].

Na prática, nenhum material polimérico, cerâmico ou metálico é perfeitamente biocompatível. O corpo reconhece o implante como de origem externa e o isola através de uma cápsula de colágeno. Comumente a espessura dessa membrana de encapsulamento é utilizada como medida de compatibilidade com tecidos. Quanto mais fina essa membrana, melhor a compatibilidade [3].

Tradicionalmente, a medida de biocompatibilidade de materiais é de domínio dos patologistas. Os materiais a serem testados são implantados subcutaneamente ou intramuscularmente em animais. Para aplicações especializadas como as ortopédicas, em neurocirurgias ou cirurgias cardio-vasculares, os materiais devem ser implantados em órgãos ou sistemas vasculares. Após intervalos de tempo apropriados, a amostra é retirada juntamente com o tecido circundante. Técnicas de histologia macro e microscópicas são usadas para avaliar a intensidade da inflamação e o grau de formação de cápsulas fibrosas [11].

A tabela 2 mostra um resumo das respostas dos tecidos de acordo com o material implantado [12].

**Tabela 2:** Tipos de respostas dos tecidos aos vários materiais implantados.

Polímero	Tipo de resposta
Silicone, Poliolefinas, PMMA, Teflon	Resposta mínima, formação de fina camada de tecido fibroso.
Resinas termofixas	Resposta inflamatória, branda ou aguda
Nylon	Resposta inflamatória devido à partículas
Termoplásticos com aditivos tóxicos e materiais degradáveis	Resposta inflamatória crônica
Adesivos cirúrgicos e para ossos	Resposta necrótica

### 3.4.2. Compatibilidade com o sangue

A compatibilidade de biomateriais com o sangue depende basicamente de três fatores;

- velocidade do fluxo sanguíneo,
- conformação dos dispositivos, e
- propriedades de superfície, tais como:
  - morfologia
  - hidroflicidade
  - natureza elétrica
  - natureza química

A formação de trombos, induzida por uma superfície estranha, é o maior problema associado ao uso de próteses e outros dispositivos que estejam em contato

com o sangue. Corações, válvulas para coração, catéteres e outros dispositivos artificiais são comumente implantados hoje em dia. Esses órgãos são, em sua grande parte, constituídos de materiais poliméricos. Muitas mortes de animais em observação com órgãos artificiais são causadas, não pelo mau funcionamento do órgão, mas pela formação de coágulos de sangue como consequência da não compatibilidade [13]. Devido aos problemas interfaciais associados aos biomateriais, muitas pesquisas vem sendo direcionadas para estabilizar interfaces do tipo tecido-polímero e sangue-polímero, através do controle das reações químicas e microestrutura dos materiais [14].

Os polímeros biomédicos podem ser divididos em duas categorias quando se trata da interface sangue-polímero:

- implantes extracorpóreos de curta duração como as membranas para órgãos artificiais, tubos e catéteres para o transporte de sangue;
- implantes vasculares de longa duração e órgãos artificiais [15].

O contato do sangue com uma superfície estranha resulta numa deposição de proteínas, plaquetas e outros elementos formadores do sangue. As proteínas vão se depositar durante os primeiros segundos de contato entre o sangue e a superfície estranha, enquanto as plaquetas iniciam sua aderência após alguns minutos, quando a camada de proteína já é de aproximadamente de 200 Å. A polimerização de fibrinogênio à fibrina, a ativação e a agregação de plaquetas levam à formação de trombos aumentando a superfície artificial.

A química e a morfologia da superfície afetam a composição e a conformação das proteínas inicialmente depositadas. Este é um dos fatores determinantes da ativação de plaquetas, agregação e formação de coágulos [16].

Os coágulos podem ser chamados de trombos, se for um coágulo fixo (trombose), ou de êmbolo se for um coágulo desprendido (embolia) [12].

### 3.4.2.1. Mecanismo de Coagulação Sanguínea

O sangue é uma suspensão de células numa solução salina chamada de plasma, que também contém centenas de proteínas. A formação de coágulos é o resultado final de um evento catastrófico, no que diz respeito aos biomateriais, que é a cascata de coagulação. A cascata de coagulação é uma sequência de reações bioquímicas catalisadas enzimaticamente que envolve as células do sangue e as proteínas do plasma. Algumas destas proteínas são chamadas de fatores de coagulação, pois após uma quebra catalítica, estas dão origem às enzimas que agem diretamente na cascata de coagulação. A tabela 3 mostra a nomenclatura dos fatores de coagulação [17].

**Tabela 3: Nomenclatura dos fatores de coagulação.**

Fator I	Fibrinogênio
Fator II	Protrombina
Fator III	Tromboplastina tecidual
Fator IV	Cálcio
Fator V	Proacelerina
Fator VII	Proconvertina
Fator VIII	Globulina anti-hemofílica
Fator IX	Fator Christmas
Fator X	Fator Stuart-Prower
Fator XI	ATP
Fator XII	Fator Hageman
Fator XIII	Fibrinase

Quando a fator de coagulação vier acompanhado de um sub índice ( a ), este esta na forma ativada.

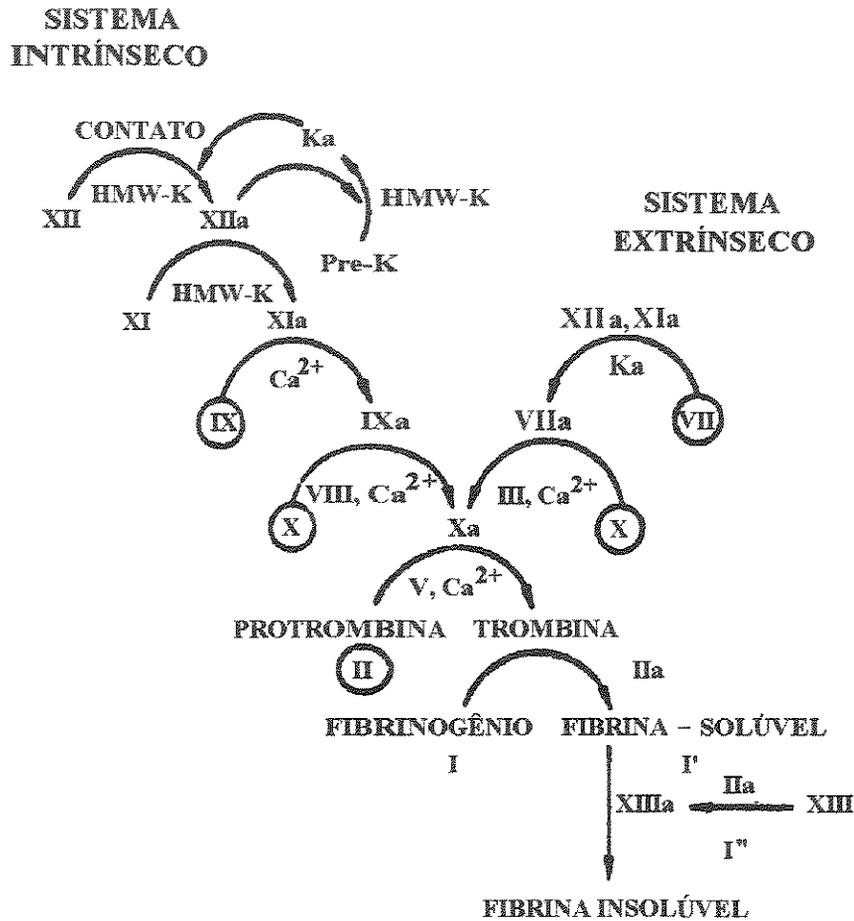
O processo de coagulação é controlado pelos fatores de inibição. Alguns destes fatores são enzimas do plasma capazes de formar complexos inativos com as enzimas de coagulação.

### Cascata de coagulação

As reações da cascata de coagulação podem ser desencadeadas através de dois caminhos diferentes: o caminho intrínseco que ocorre quando alguma superfície artificial entra em contato com o sangue, ativando o fator XII ( fator de Hageman ) e o caminho extrínseco que ocorre para produzir coágulos no caso de lesão traumática em algum tecido do corpo [17].

A figura 1 mostra que, independente do caminho ativado, a cascata leva à formação de trombina, a qual induz a adesão plaquetária e é capaz de ativar moléculas de fibrinogênio para produzir o polímero solúvel de fibrina. Novamente a trombina é responsável pela ativação do fator XIII que transforma as ligações cruzadas da fibrina solúvel em um coágulo de fibrina insolúvel.

Portanto, a inativação através da trombina é um ponto chave quando se deseja evitar que as reações da cascata de coagulação sejam completadas levando aos coágulos. Esta inativação interrompe as duas vias de formação de coágulos, a intrínseca e a extrínseca.



**Figura 1: Cascata de coagulação.**

### 3.4.3. Fatores que afetam a compatibilidade com o sangue [2]

#### Morfologia da superfície

A morfologia da superfície de biomateriais tem sido considerada um fator importante na formação de trombos. Uma superfície muito rugosa destrói as plaquetas e leva à uma formação bem mais rápida de coágulos. Pode parecer muito simples a solução para este problema, utilizando superfícies muito lisas. Entretanto, a utilização de superfícies polidas como as do vidro, metacrilato de metila e polietileno, apenas causa uma pequena prolongação no tempo de coagulação. Dentre as controvérsias existentes na literatura, existe um consenso de que, uma certa rugosidade é necessária para que o uso de biomateriais tenha sucesso.

### Molhabilidade da superfície

A molhabilidade da superfície, isto é, sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica é um fator importante no processo de coagulação. Como a membrana interna dos vasos sanguíneos é hidrofílica, os materiais com esta característica têm a tendência de aumentar o tempo de coagulação. Mas sabe-se também que nada se pode afirmar à respeito de um único fator isoladamente. O que desencadeia a cascata de coagulação é o efeito de todos os fatores em conjunto.

### Natureza elétrica da superfície

A superfície interna da membrana dos vasos sanguíneos é carregada negativamente. A este fato, atribui-se parcialmente o caráter não trombogênico ou tromboresistente da membrana, pois os elementos do sangue são também carregados negativamente e estes são repelidos pela superfície da mesma. Quando o vaso sanguíneo é destruído, ocorre uma mudança líquida de carga negativa para positiva até que o restabelecimento seja alcançado. Neste caso, a administração de compostos no sangue, carregados negativamente, aumenta a magnitude das cargas negativas da membrana. Entretanto, ainda não foi possível estabelecer uma relação direta entre o tempo de coagulação e o potencial zeta ( a magnitude de uma carga na superfície em contato com um líquido ).

### Natureza química da superfície

A natureza química da superfície exposta ao sangue está relacionada com a natureza elétrica pois os tipos de grupos funcionais presentes irão determinar a magnitude e o tipo de carga na superfície . A membrana interna dos vasos sanguíneos é carregada negativamente pela presença de mucopolissacarídeos, especialmente pelo sulfato de condroitina e sulfato de heparina.

### 3.5. Modificação superficial de polímeros

Existem vários métodos que podem produzir espécies reativas na superfície de polímeros. Destacam-se os seguintes [18].

- radiação ionizante;
- oxidação da superfície através de chama ou uso de ácidos fortes;
- tratamento por plasma ;
- uso de surfactantes ;
- enxertia ou grafitação com radiação UV.

Alguns desses métodos estão esquematizados na figura 2 [19]. Para este trabalho vamos considerar com mais profundidade o nosso tema de interesse, ou seja, enxertia ou grafitação por via química e fotoquímica.

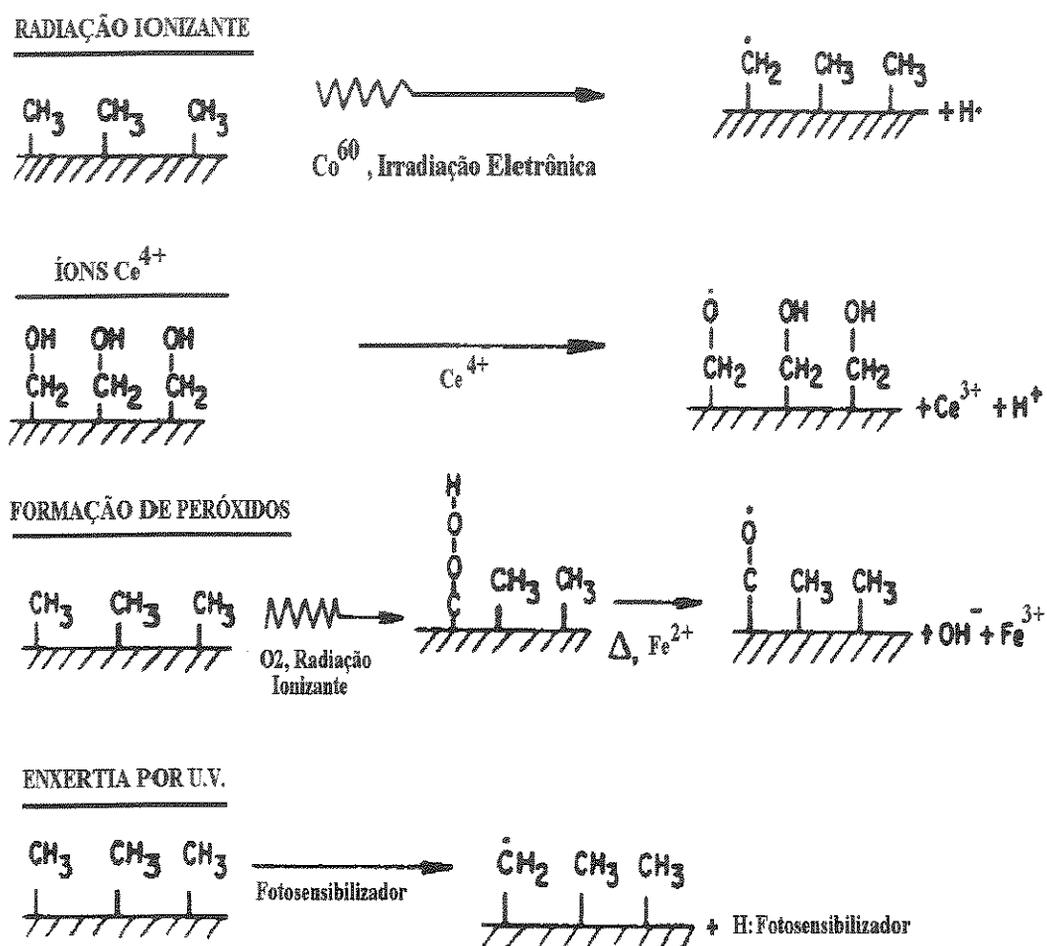


Figura 2: Espécies reativas através de vários tratamentos de superfície

### 3.6. Copolímeros em bloco e de enxerto

Nos últimos anos, a síntese de novos materiais poliméricos tem sido um campo atrativo para a ciência dos polímeros. Geralmente, esses novos materiais requerem propriedades que são conseguidas com a combinação de duas ou três unidades de monômeros diferentes. As combinações de propriedades físicas podem

ser mais facilmente alcançadas com a copolimerização em bloco ou por enxertia , que têm as seguintes estruturas gerais [20].

a) Copolímero em bloco

AAAAAAAAA-BBBBBBBB

b) Copolímero de enxerto

BBBBBBB                      BBBBBB

AAAAAAAAAAAAAAAAA

BBBBBBBBB

c) Copolímero aleatório

ABBAABABBBAABAABBAB

No presente, existem vários produtos poliméricos no mercado basicamente consistindo de copolímeros aleatórios com até três diferentes unidades repetitivas.

### 3.6.1. Fotoenxertia em superfícies de polímeros

Um grande número de propriedades de materiais poliméricos tais como : adesividade, tingimento, polimento, comportamento anti-estático, estabilidade térmica, biocompatibilidade, propriedades anti-trombogênicas e outras, são determinadas pelas propriedades de superfície . A importância das propriedades de superfície não é limitada apenas aos filmes mas também às fibras e materiais moldáveis.

Fotoenxertia é uma técnica que utiliza luz de determinados comprimentos de onda para iniciar a polimerização de uma espécie monomérica, tendo outra cadeia como suporte. A região mais utilizada é a faixa do ultravioleta que está entre 190 e 400 nm [21].

A macromolécula pode iniciar a polimerização em pontos ao longo de sua cadeia gerando sítios radicais . Os sítios na cadeia podem ser formados por foto-reações ou por transferência de radicais formados na matriz polimérica. Tais técnicas dão a oportunidade de preparar polímeros enxertados com monômeros que apresentam propriedades radicalmente diferentes da matriz polimérica. ( O esquema deste tipo de polimerização está no item "reações fotoquímicas" ). Assim, podemos citar como exemplo a enxertia de um monômero hidrofílico como a acrilamida num polímero hidrofóbico como o polietileno mudando assim suas propriedades superficiais .

A fotoenxertia tem muitas vantagens em comparação com outros processos de modificação de superfície. São elas:

- a fotoiniciação se dá via estados excitados sendo possível assim utilizar-se de fotoiniciadores de excitação seletiva;
- a luz incidente é absorvida numa espessura de camada de 1-3  $\mu\text{m}$ ;
- baixa temperatura de reação;
- as fontes de energia para foto-reação, tais como lâmpadas de mercúrio, de neon e de haletos de metais são comparativamente seguras e econômicas;
- se o filme a ser tratado for transparente, teremos a ativação das duas superfícies em contato com a solução;
- interações entre o polímero base e a solução reacional são controladas, bem como a produção da fina camada de enxerto.

As desvantagens da fotoenxertia são :

- produção de espécies ativas indesejáveis, levando, muitas vezes, à reações paralelas,
- fotodegradação e fotooxidação podem ocorrer em paralelo com as reações de fotoenxertia ;

- taxas de reações lentas ( tempo de reação é ainda muito longo para tratamento de polímeros comerciais );

- fotohomopolimerização. Quando um homopolímero é depositado na superfície enxertada, a difusão do monômero e do fotoiniciador é impedida tornando a polimerização lenta [21].

### 3.7. Modificação superficial de polímeros para aplicações biomédicas

Na tentativa de aumentar a tromboresistência de polímeros, surgem basicamente três tipos de tratamentos superficiais: ligações de compostos farmacologicamente ativos, revestimento da superfície com materiais biológicos e enxertia de monômeros para obtenção de copolímeros.

#### 3.7.1. Ligação de compostos farmacologicamente ativos

##### 3.7.1.1. Heparina [22]

Química da heparina:

Heparina, cuja estrutura é mostrada na figura 3, é um anticoagulante, mucopolissacarídeo aniônico de cadeia reta, chamado também de glicosaminoglicano de peso molecular médio de 15000 daltons. Menos de 1% dos glicosaminoglicanos obtidos por hidrólise alcalina corresponde a heparina; a comercial consiste em um polímero de duas unidades dissacarídicas repetitivas.

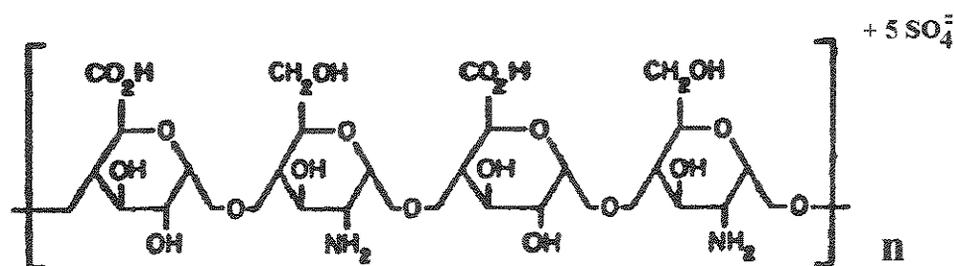


Figura 3: Estrutura da molécula de heparina

Visto que os grupos sulfatos e carboxílicos estão ligados covalentemente na molécula, a heparina é altamente ácida. Comparada com a heparina padrão, frações de heparina de baixo peso molecular tem um grande efeito na inibição da atividade relativa do fator Xa. Heparina de baixo peso molecular também parece ter atividade inibindo a adesão de plaquetas.

A heparina comercial é preparada de mucosas de pulmão bovino e intestino suíno, entretanto a que tem melhor efeito anticoagulante ( antifator Xa ) é a de mucosa suína . As heparinas preparadas sinteticamente de dissacarídeos D-glucosamina e ácido D-glucorônico são chamados de heparinóides e também tem alta atividade anticoagulante, mas sua atividade clínica ainda não foi testada.

#### Propriedades farmacológicas

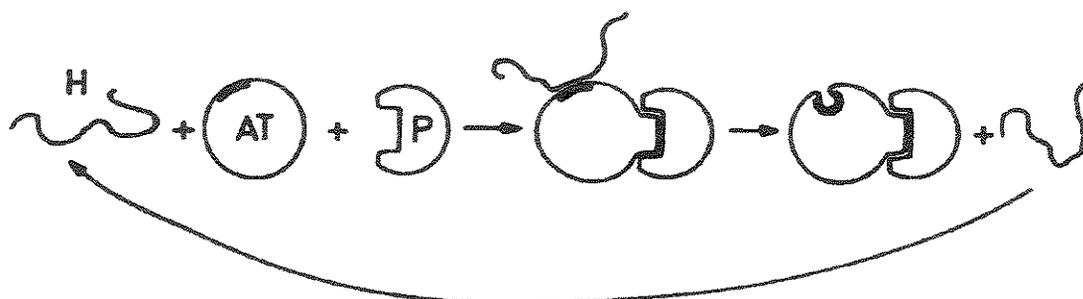
Quando por injeção intravenosa, a heparina tem dois efeitos farmacológicos principais: diminui a coagulação do sangue e também reduz a concentração de triglicerídeos do plasma.

O efeito anticoagulante da heparina é essencialmente imediato, e ocorre tanto *in vitro* quanto *in vivo* . Ela age indiretamente por meio de um cofator do plasma, ou seja, a antitrombina III que é uma  $\alpha$ -globulina, inibe severamente a atividade dos fatores de coagulação. Pensava-se que a antitrombina III fosse a única macromolécula capaz de inativar a trombina, mas outras proteínas do plasma são conhecidas agora por exercer essa função.

A antitrombina III e a heparina formam um complexo irreversível com a trombina e como resultado temos a proteína inativada.

### Mecanismo de ação da heparina

A heparina age como catalisador na reação trombina (protease) e antitrombina, isto é, ela acelera a reação em quantidades não estequiométricas e não é consumida durante a reação. Alguns estudos demonstram esta aceleração provando que a heparina exerce um efeito de mudança conformacional da antitrombina facilitando muito a reação posterior de inativação da trombina. Uma ilustração esquemática da função da heparina como catalisador desta reação é mostrada na figura 4:



**Figura 4: Mecanismo de ação da heparina.**

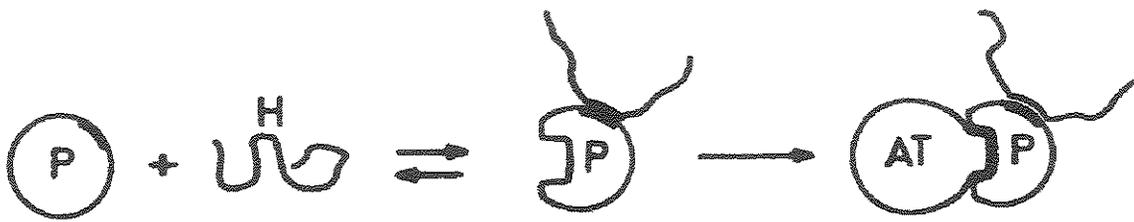
onde H = heparina, AT = antitrombina, P = protease (trombina)

Após a formação do complexo inativo, a afinidade do complexo pela heparina diminui e esta é liberada para catalisar nova reação [23].

A habilidade da heparina em se ligar à antitrombina e trombina (protease de coagulação) pode ser discutida através de três diferentes hipóteses; a teoria clássica já mencionada, sugere a ligação da heparina com a antitrombina, induzindo à uma mudança conformacional, o que facilita a reação com a protease, como na figura 4.

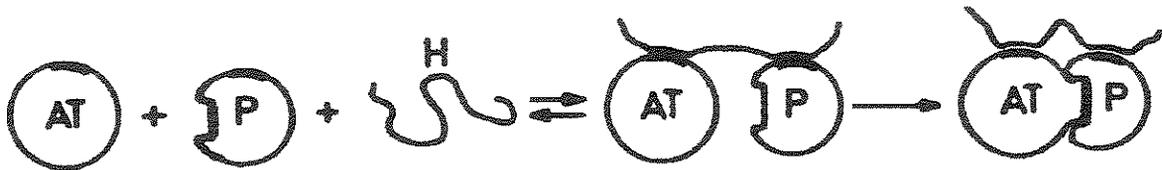
Esta hipótese também foi proposta por Holmer E. et al. [24].

A segunda teoria propõe a ligação da heparina com a protease, o que causaria uma mudança na conformação da protease facilitando a reação com a antitrombina (figura 5);



**Figura 5: Segunda hipótese proposta para o mecanismo de ação da heparina**

A terceira hipótese propõe que a heparina acelera a reação pois ambas, trombina e antitrombina, se ligam à heparina ao mesmo tempo ( figura 6);



**Figura 6: Terceira hipótese proposta para o mecanismo de ação da heparina**

É mais evidente a afinidade entre a heparina e a antitrombina ( primeira hipótese acima) pois a ligação é forte e mais específica, enquanto que a interação entre a heparina e a protease é fraca, pouco específica e aparentemente não afeta a conformação das enzimas.

#### Ligação covalente x iônica da heparina e a tromboresistência

Os biomateriais heparinizados têm sido preparados por várias técnicas. Algumas delas preparam esses biomateriais através de ligações iônicas. É reconhecida a boa antitrombogenicidade desses materiais, mas com o fluxo sanguíneo essa tromboresistência desaparece num curto espaço de tempo devido ao arraste da heparina. Para se conseguir um efeito mais duradouro, tem-se tentado obter biomateriais que tenham heparina ligada fortemente através de ligações

covalentes mas até agora sua atividade anticoagulante tem se mostrado menor que a da forma livre [25, 26], tal como acontece com enzimas imobilizadas.

### 3.7.1.2. Outros agentes anticoagulantes

Além da heparina, outros compostos tromborresistentes tem sido utilizados na preparação de biomateriais. Uroquinase, uma enzima que dissolve fibrina, tem sido imobilizada em superfícies poliméricas [13, 27]. Estreptoquinase, outra enzima usada no tratamento de trombose também vem sendo estudada [28], bem como o sulfato de condroitina [29].

Algumas pesquisas combinam as propriedades anticoagulantes da heparina com a passividade da albumina em relação à agregação de plaquetas, para a obtenção de um conjugado que apresenta propriedades antitrombogênicas [30, 31].

### 3.7.2. Revestimento com materiais biológicos

#### Proteínas

O revestimento da superfície de vários polímeros com proteínas, para os mais diversos fins, tem sido um assunto bastante difundido na literatura técnico - científica [32]. A compatibilidade de um material polimérico com o sangue e/ou tecido é em grande parte determinada pelo comportamento das moléculas de proteínas em sua superfície [13].

Estudos sobre adesão de plaquetas em superfícies recobertas com proteínas têm indicado que as superfícies albuminadas previnem este processo. Isto se deve à camada passivadora que a albumina adsorvida confere ao material, se tornando tromborresistente [32].

A passividade da albumina também se deve à sua citocompatibilidade [33]. Este é um fator muito expressivo quando se trata de implantes pois a albumina é

uma proteína essencialmente natural promovendo maior compatibilidade entre o implante e o tecido [34]. Outros trabalhos vem sendo desenvolvidos com a adsorção de proteínas como colágeno [35] e gelatina [36].

### 3.7.3. Enxertia de monômeros para obtenção de copolímeros

Monômeros hidrofílicos enxertados em superfícies hidrofóbicas são também utilizados para melhorar a biocompatibilidade de polímeros. Os monômeros mais utilizados são ácido acrílico [37], acrilamida [38], hidroximetilmetacrilato [39] e seus derivados [40], dentre outros. A poliacrilamida, além de tornar a superfície mais hidrofílica, tem ainda como função diminuir seu coeficiente de fricção. Isto ajuda nos casos de muitos tipos de cateterismo e endoscopias onde o paciente sente muito desconforto na introdução do dispositivo.

## 3.8. Reações fotoquímicas [41]

A polimerização de monômeros insaturados pode ser iniciada por meios fotoquímicos através de irradiação com luz ultravioleta produzindo radicais. Estes radicais podem ser produzidos a partir de monômeros puros ou utilizando fotossensibilizadores.

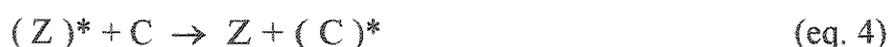
A iniciação a partir de monômeros puros se dá quando a fotólise de alguns monômeros resulta na formação de uma espécie excitada  $(M)^*$  após absorção de luz:



A espécie excitada sofre fotólise e produz radicais capazes de iniciar a polimerização:



A iniciação a partir de fotossensibilizadores é um outro meio de iniciar reações fotoquímicas. Este processo é usado quando o monômero não sofre excitação suficiente na frequência de luz utilizada. O fotossensibilizador Z sofre excitação e transfere energia ao composto C:



Radicais são subsequentemente produzidos pela decomposição de C no estado excitado:



### 3.8.1. Fotoquímica de solventes [21]

Muitos solventes comuns são considerados inertes em experimentos fotoquímicos. Os álcoois e hidrocarbonetos, por exemplo, não são reativos quando irradiados na faixa de 190 - 400 nm.

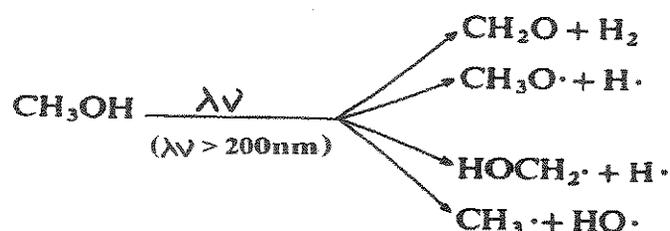
As reações fotoquímicas de solventes puros em atmosfera livre de oxigênio e na presença de oxigênio interferem no estudo fotoquímico de polímeros em solução. Solventes podem se transformar em radicais e iniciar polimerização por radical livre no lugar do iniciador mudando completamente o mecanismo e a cinética da reação observada. O conhecimento da fotoquímica dos solventes é necessário para entender todas as fotorreações que ocorrem em solução quando os mesmos são utilizados.

## Álcoois

Álcoois alifáticos têm sua banda de absorção distante num comprimento de onda abaixo de 200 nm , a qual é associada com uma transição ( n,  $\pi^*$  ) .

Fotólise do metanol, etanol, isopropanol, e n-pentanol na fase condensada torna-se desprezível sob irradiação acima de 200 nm .

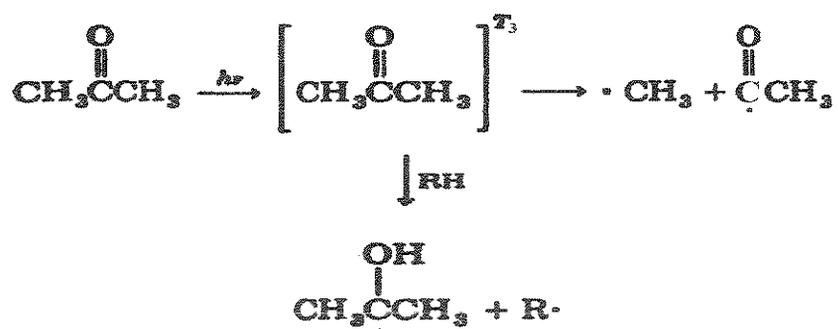
A fotólise do metanol ocorre pelas seguintes reações:



## Acetona

A acetona absorve luz U V abaixo de 320 nm. Quando excitada, ela forma radicais metil ou retira hidrogênio da molécula que estiver mais próxima . Muitas das reações acontecem no estado triplete. Os radicais formados pela acetona são capazes de iniciar a enxertia e homopolimerização, dependendo da molécula atacada, isto é, o polímero ou o monômero.

Esta reação pode ser descrita como segue:



A formação de uma fina camada de substância de enxertia na superfície depende do tipo de solvente usado . As características do solvente apropriado estão relacionados a seguir :

- O solvente deve ser um não-solvente para o polímero base. Para se obter uma camada fina enxertada , o solvente não pode inchar o polímero base excessivamente . Fracas mas definitivas interações são , entretanto , necessárias para proporcionar sítios reativos para a enxertia .

- A cadeia não deve ser solúvel no solvente . Boa interação entre solvente e cadeia enxertada é vantagem na propagação da cadeia na superfície do polímero.

- O solvente deve ser inerte ao estado triplete excitado do fotoiniciador . Isto é particularmente importante para polímeros os quais não são muito susceptíveis ao ataque de radicais .

A escolha do solvente tem grande influência também na taxa de enxertia . O grau de interação polímero-solvente irá definir a profundidade do enxerto e conseqüentemente as propriedades de superfície do polímero enxertado.

### **3.9.Caracterização de superfície**

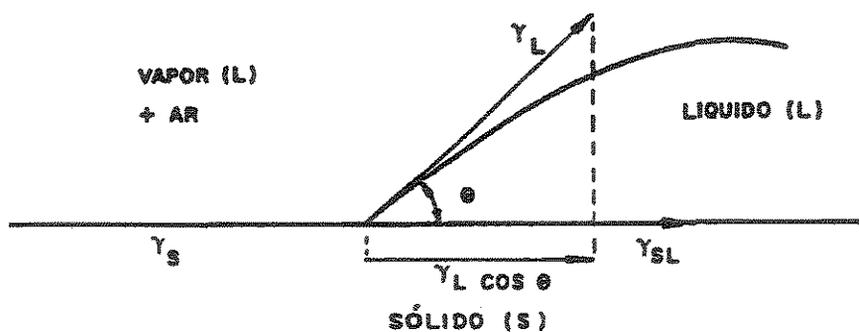
Existem várias técnicas de caracterização de superfície. As mais utilizadas para análise de materiais biomédicos são: Espectroscopia para Análises Químicas

( ESCA ), Microscopia Eletrônica de Varredura ( MEV ), medidas do ângulo de contato, Infravermelho de Reflexão Total Atenuada ( ATR-IR ), Espectrometria de Massa de Ions Secundários ( SIMS ), dentre outras menos utilizadas. As análises por ESCA e SIMS são menos utilizadas também pelo alto custo e pela pequeno número de equipamentos disponíveis no Brasil. Neste trabalho utilizamos as técnicas de ângulo de contato, MEV e ATR-IR.

### 3.9.1. Molhabilidade e ângulo de contato

A molhabilidade é um termo usado para descrever a extensão com que um líquido se espalha sobre uma superfície sólida, mantendo um contato à nível molecular [42].

Quando uma gota de líquido é colocada sobre uma superfície sólida plana, ela poderá espalhar-se completamente sobre toda a superfície ou, mais provavelmente, formará um certo ângulo com a superfície sólida. Este ângulo é denominado ângulo de contato [43]. O ângulo de contato é a grandeza física que representa o equilíbrio entre as forças que determinam a forma do líquido sobre o sólido [44]. A figura 7 representa a situação esquemática de um líquido sobre uma superfície sólida, formando um ângulo de contato ( $\theta$ ) e todas as forças que agem entre o líquido e a fase sólida.

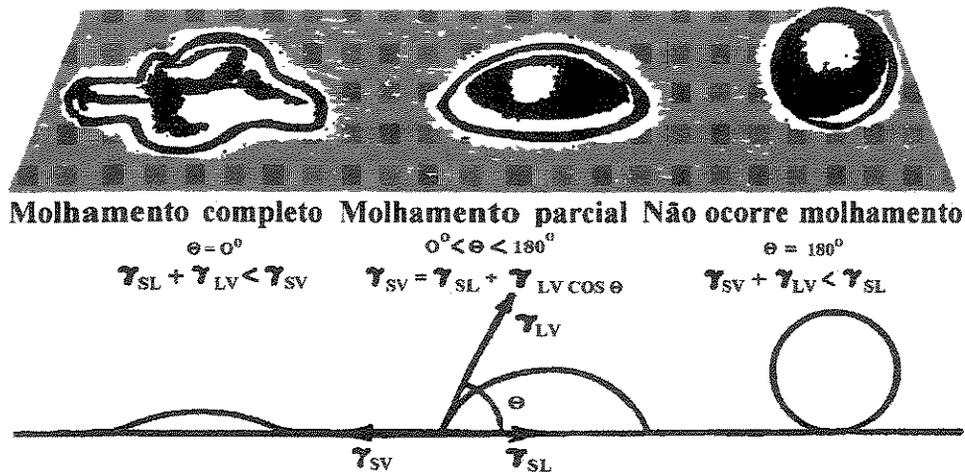


**Figura 7: Situação esquemática de um líquido sobre um sólido.**

Se considerarmos as tensões interfaciais como sendo forças em equilíbrio, obteremos, à partir da figura, a seguinte equação [45]

$$\gamma_{s/ar} = \gamma_{s/l} + \gamma_{l/ar} \cos \theta \quad (\text{eq. 6})$$

Quando  $\theta = 180^\circ$ , a gota do líquido tem a forma esférica e não há molhabilidade. Se  $\theta$  está entre 0 e  $180^\circ$  teremos molhabilidade parcial e se  $\theta = 0^\circ$  terá molhabilidade perfeita, como mostra a figura 8.



**Figura 8: Tipos de molhamento de superfície**

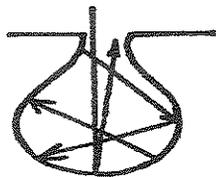
Assim esta técnica é muito utilizada para caracterização de superfície quanto ao seu aspecto de hidrofilicidade.

### 3.9.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tem como principal aplicação a observação da superfície da amostra e análise das suas características microestruturais. Um aspecto importante desta técnica é a alta resolução que pode ser obtida na observação tanto da área quanto dos microvolumes. Outra vantagem da microscopia eletrônica de varredura é que a amostra pode ser observada tridimensionalmente [46].

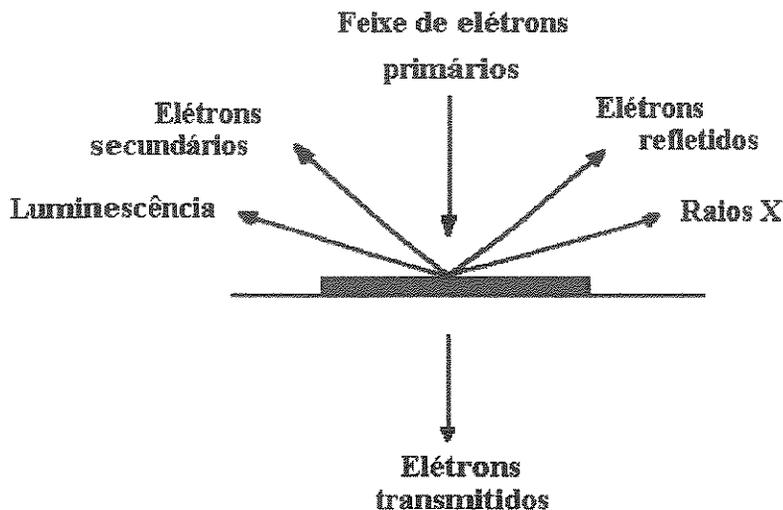
A formação da imagem do objeto a ser examinado ocorre quando um feixe de elétrons é gerado termoionicamente por um filamento de tungstênio sob alta

voltagem (0,5 à 50 KV). Este é colimado por uma lente condensadora e uma objetiva. A interação do feixe de elétrons com a amostra produz uma série de fenômenos, como a emissão de elétrons retroespalhados, raios X, luz visível e mais comumente, de elétrons secundários de baixa energia que são coletados pelos detectores e projetados numa tela de vídeo. Há basicamente dois modos de formação de imagem. A imagem por elétrons retroespalhados (BEI) ou por elétrons secundários (SEI). Elétrons retroespalhados são elétrons primários elasticamente espalhados pelos núcleos dos átomos da amostra que escapam da superfície com alta energia ( $> 50$  eV). Estes elétrons partem da superfície de uma área vasta, o que faz com que a resolução em BEI seja baixa. Quando a amostra é composta por elementos de diferentes números atômicos (C, O, F, Cl), a interação do feixe com o núcleo da amostra permite a obtenção de imagem com contraste de composição. Para a determinação precisa do tipo de elemento, torna-se necessário o acoplamento ao microscópio de um microanalisador de raios X. Contraste somente topográfico é um outro recurso possível através da detecção de elétrons retroespalhados. Elétrons secundários, por sua vez, são produzidos pelo feixe primário de elétrons e por elétrons retroespalhados, emitidos à partir da amostra com baixa energia (50 eV) o que faz com que eles provenham de profundidades de apenas alguns nanômetros. A emissão de elétrons secundários depende da superfície da amostra. Se o feixe incide sobre uma protuberância, mais elétrons secundários serão emitidos da amostra porque um maior volume de interação está próximo da superfície. Entretanto, se o feixe incide sobre uma cavidade, poucos elétrons atingirão o detector, produzindo uma imagem escura, como mostra a figura 9.



**Figura 9 : Interação dos elétrons com as cavidades superficiais da amostra.**

A figura 10 resume todos os tipos de interações que podem ser geradas pelo M E V através do feixe de elétrons quando incide na amostra [47].



**Figura 10: Interações geradas a partir do feixe de elétrons do Microscópio Eletrônico de Varredura.**

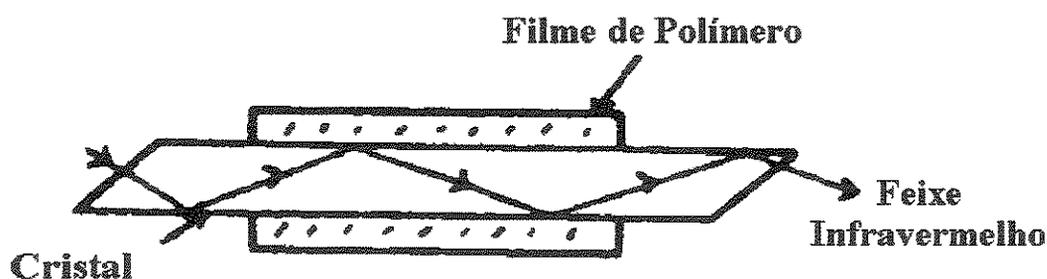
#### Preparação das amostras

A preparação das amostras para a microscopia eletrônica de varredura é bastante simples pois a análise é superficial, o que torna a espessura das mesmas um fator secundário. As amostras são colocadas no porta-amostras com um material condutor, que pode ser grafite coloidal ou cola de prata. Caso não seja condutora, a amostra deve ser recoberta com uma fina camada condutora que pode ser ouro, liga de ouro-paládio, alumínio ou carbono. O recobrimento metálico tem a principal finalidade de prevenir uma sobrecarga de elétrons sobre a superfície da amostra e

prover um meio de descarregar o excesso de carga negativa da amostra, sem prejudicar a observação da topografia superficial [48].

### 3.9.3. Infravermelho de Reflexão Total Atenuada (ATR-IR)

A espectroscopia de infravermelho que utiliza a reflexão total atenuada é uma técnica de análise de superfície. Nesta técnica, a superfície da amostra entra em contato com a superfície de um cristal e os raios infravermelhos são refletidos internamente como mostra a figura 11.



**Figura 11: Esquema simplificado da Reflexão Total Atenuada de Raios Infravermelho.**

Os raios emitidos têm características de absorção de acordo com os grupos químicos presentes na superfície da amostra. A profundidade de penetração desta técnica é de 0,1 a 1  $\mu\text{m}$ . Esta profundidade de penetração é maior para o ATR-IR do que para o ESCA (que também é uma técnica de análise de superfície). A profundidade de penetração é uma função também do comprimento de onda, que varia durante todo o espectro, e do ângulo de incidência dos raios emitidos. As amostras podem ser sólidas como fibras, filmes ou tubos, líquidas ou gasosas. Recentes estudos em infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR) permitem que as amostras hidratadas possam também ser analisadas. Esta técnica tem como principal desvantagem a dificuldade em se realizar análises quantitativas através dos espectros [49].

**CAPÍTULO IV**  
**MATERIAIS E MÉTODOS**

A tabela 4 relaciona os materiais e reagentes utilizados a procedência dos mesmos.

**Tabela 4: Materiais e reagentes utilizados e sua procedência.**

Filmes de LDPE sem aditivos com espessura de 150 $\mu\text{m}$ .	Poliolefinas S.A.
Ácido acrílico	Riedel de Haen
Acrilamida	Sigma Chemical Company
Metacrilato de Glicidila	Aldrich Chemical Company
Heparina sódica ( Liquemine ® )	Roche
Albumina bovina	Sigma Chemical Company
Polietilenoimina	Sigma Chemical Company
Cianoborohidreto de sódio	Merck
Nitrito de sódio	Synth
Cloreto de sódio	Ecibra
Azul de Toluidina	Merck
Azul de Coomassie G 250	Fluka
Solventes ( acetona, etanol e metanol )	Merck

#### 4.1. Montagem do reator fotoquímico

O reator fotoquímico foi montado utilizando-se um recipiente pyrex® de 6000 ml, um tubo de quartzo com 4 cm de diâmetro, o bulbo de uma lâmpada de vapor de mercúrio de 250 W (OSRAM) e uma tampa de teflon com entrada e saída de nitrogênio. A figura 12 mostra o esquema do reator utilizado, o qual foi uma modificação baseada no trabalho de K. Allmer, mostrado na figura 13.

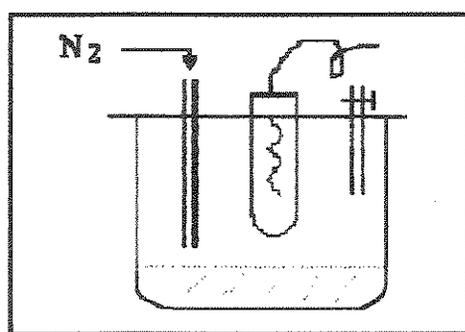


Figura 12: Reator utilizado para realização da enxertia fotoquímica em fase líquida.

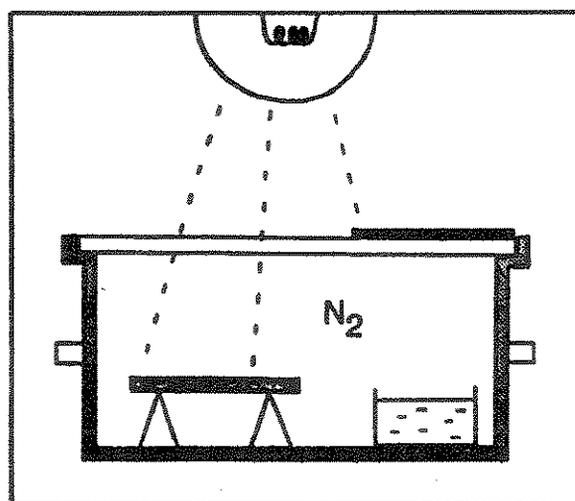


Figura 13: Reator utilizado por Allmér<sup>(50)</sup> para enxertia fotoquímica em fase vapor.

As reações foram realizadas em fase líquida após várias tentativas de adaptação do novo reator às nossas condições de trabalho, conforme será descrito mais adiante.

#### **4.2. Enxertia fotoquímica de ácido acrílico no filme de polietileno (LDPE-g-AA) [18]**

Preparou-se a mistura reacional contendo ácido acrílico 2M e benzofenona 0,2M utilizando-se acetona como solvente. O filme a ser enxertado foi previamente lavado com metanol, seco em dessecador com vácuo por 24h e depois pesado. Este filme foi colocado no interior do reator juntamente com a mistura reacional. O reator foi fechado e passou-se nitrogênio por 5 min. Selou-se o reator e este foi colocado num banho maria com temperatura controlada em 60° C. Após atingir o equilíbrio térmico, irradiou-se o filme por 15 min.

O filme enxertado com ácido acrílico foi então lavado por 30 min com uma solução de KOH 0,1 M e depois com HCl 0,05 M também por 30 min para a remoção de monômeros residuais e homopolímeros formados. O filme foi então seco e pesado novamente.

Utilizou-se o mesmo procedimento para o uso de etanol como solvente.

#### **Enxertia fotoquímica de acrilamida e metacrilato de glicidila em filme de polietileno (LDPE-g-AAm e LDPE-g-GMA) [51]**

Utilizou-se o mesmo procedimento para enxertia de acrilamida e metacrilato de glicidila, inclusive no que diz respeito às concentrações dos reagentes e com a utilização dos dois solventes, acetona e etanol. Apenas na remoção de monômeros residuais e homopolímeros formados é que utilizou-se uma extração por Soxhlet. A extração foi feita por 6 h usando acetona como solvente.

### **4.3. Verificação da possibilidade de fotooxidação e termopolimerização**

Dois brancos foram preparados:

1. Colocou-se o filme e uma solução de benzofenona 0,2 M em acetona. Irradiou-se por 15 min, não colocando-se apenas o monômero de enxerto.
2. O procedimento para enxertia de ácido acrílico foi seguido sem a presença da radiação UV. O tempo de reação foi também de 15 min.

### **4.4. Reação da heparina na amostra de LDPE-g-GMA (LDPE-g-GMA-Hep)**

A ligação da heparina no filme de polietileno enxertado com metacrilato de glicidila foi feita colocando-se o filme num becker com uma solução de concentração 40 mg/ml de heparina ( fez-se uma diluição de liquemine ® de concentração 50mg/ml ). O filme foi imerso nesta solução por 24 h à 40°C com agitação constante. Após a reação o filme foi lavado com água destilada à 40°C por 24 h e seco em dessecador. Este método foi adaptado de Larsson [52].

### **4.5. Reação da albumina na amostra de LDPE-g-GMA (LDPE-g-GMA-Alb)**

Colocou-se o filme enxertado com metacrilato de glicidila numa solução de albumina bovina de concentração 50 mg/ml à 37°C com agitação por 24h. Após a reação o filme foi lavado por 24 h com água destilada à 37°C e seco em dessecador. Este método foi adaptado de Larsson [52].

#### **4.6. Enxertia química de Polietilenoimina (PEI) em filme de polietileno (LDPE -g- PEI) [52]**

Os filmes de polietileno foram incubados numa solução de ácido sulfúrico concentrado contendo permanganato de potássio numa concentração de 2g/l por 4 minutos e lavados cuidadosamente com água destilada. Um pedaço deste filme foi colocado numa solução de azul de toluidina 0,02% verificando o aparecimento de um azul intenso devido à ligação. Dois tratamentos foram realizados à partir do filme ativado com ácido sulfúrico:

1) incubou-se o filme por 5 min à temperatura ambiente numa solução aquosa de polietilenoimina 0,01% com pH = 3,0 ( para acertar o pH utilizou-se HCl 0,1 M ). Após a incubação lavou-se o filme com água destilada.

2) incubou-se o filme por 5 min à temperatura ambiente numa solução aquosa de polietilenoimina 0,01% com pH = 9,0 ( também usou-se HCl para o acerto do pH). Lavou-se a amostra com água destilada.

Depois da reação com PEI, um outro pedaço do filme foi colocado na solução de azul de toluidina 0,02% e a coloração azul não foi mais observada.

#### **4.7. Ligação da heparina parcialmente degradada na amostra de LDPE -g- PEI (LDPE -g- PEI - Hep)**

Degradação parcial da heparina :

Preparou-se uma solução de heparina com 5 mg/ml à 0° C. Acrescentou-se 6 mg de NaNO<sub>2</sub> para 100 ml desta solução e ajustou-se o pH em 2,7 com HCl 1M .

Agitou-se esta solução por 2 h num banho de gelo . Ajustou-se o pH em 7,0 com NaOH 0,5 M.

Os filmes de LDPE - PEI foram incubados numa solução de heparina parcialmente degradada na concentração de 1 mg/ml contendo 0,01 mg/ml de NaBH<sub>3</sub>CN em NaCl 0,15 M num pH 3,5. Após duas horas os filmes foram retirados, lavados com água destilada e secos em dessecador.

#### **4.8. Ligação de albumina na amostra de LDPE -g- PEI**

##### **(LDPE -g- PEI - Alb)**

Os filmes LDPE -g- PEI foram incubados numa solução de albumina bovina 10 mg/ml em solução salina por 24 h à 37 °C . Após a reação os filmes foram lavados com água destilada a 37 °C e secos em dessecador.

Resumo de todas as amostras de enxertia :

LDPE -g- AA

LDPE -g- AAm

LDPE -g- GMA - Hep

LDPE -g- GMA - Alb

LDPE -g- PEI (pH 3) - Hep

LDPE -g- PEI (pH 9) - Hep

LDPE -g- PEI (pH 3) - Alb

LDPE -g- PEI (pH 9) - Alb

#### **4.9. Análise quantitativa de heparina e albumina imobilizadas**

##### **4.9.1. Heparina imobilizada [53]**

Construiu-se uma curva de calibração variando-se a quantidade de heparina de 10 à 50  $\mu\text{g/ml}$ , partindo-se de uma solução padrão de concentração final 50  $\mu\text{g/ml}$ . Elevou-se o volume de todos os tubos para 5 ml com NaCl 0,2 %. Em cada tubo colocou-se 2,5 ml de uma solução  $5 \times 10^{-3}$  % de azul de toluidina (feita em HCl 0,01M contendo 0,2 % de NaCl) e agitou-se por 30 s. Adicionou-se 5 ml de hexano e agitou-se por mais 30 s provocando a separação do complexo heparina-corante da solução. A fase aquosa foi separada e diluída na proporção 1:3 com etanol absoluto. Leu-se a absorbância em 631 nm.

Para os filmes com heparina imobilizada colocou-se 5 ml de NaCl 0,2%; 2,5 ml de corante e um pedaço de filme medindo 2x1 cm, seguindo-se o mesmo procedimento usado na realização da curva de calibração.

#### 4.9.2. Albumina imobilizada

O método utilizado para a dosagem de albumina imobilizada foi uma adaptação do método de Bradford [54] que quantifica proteínas em solução.

Constroeu-se uma curva de calibração com concentrações de proteína variando de 10 à 50  $\mu\text{g/ml}$  num volume total de 1 ml. Esta solução foi feita em tampão fosfato pH 7,4. Em cada tubo adicionou-se 5ml da solução de corante (0,01% de azul de coomassie G250, 4,7% de etanol e 8,5% de ácido fosfórico). A absorbância foi lida em 465nm num tempo entre 2min e 1h.

Os filmes com albumina imobilizada foram colocados em 1 ml do mesmo tampão com 5ml de corante.

Essas análises colorimétricas foram realizadas num espectrofotômetro Micronal modelo B 382.

#### 4.10. Teste de adesão de plaquetas [55, 56]

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

foi realizada num contador de partículas modelo Cell - Dyn 1600 Specimen Data Report obtendo-se  $3,75 \times 10^5$  partículas por  $\mu\text{l}$ .

Amostras de todos os filmes tratados ( 2x1 cm ) foram imersos no PRP por 4 h a 37° C, lavados com tampão fosfato pH 7,4 com leve agitação para remover as plaquetas fracamente aderidas. As plaquetas foram então fixadas com solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato por 2 h à temperatura ambiente. A seguir, as plaquetas foram tingidas com uma solução de azul de coomassie 0,05 % , lavadas com etanol 50% , colocadas para secar em dessecador e observadas num microscópio ótico modelo Olympus CBA - K com um aumento de 1000 vezes.

#### **4.11. Teste de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada ( TTPA ) [55]**

Colocou-se os filmes ( 2x1 cm ) em 100  $\mu\text{l}$  de plasma controle ( Plasma Controle N, Boehring Co. ) e incubou-se por 1 h a 37° C . Num volume de 100  $\mu\text{l}$  do reagente TTPA, pré-aquecido por 2 min, adicionou-se o plasma obtido anteriormente, seguido pela adição de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  ( 0,025 M ) exatamente 30 s depois . O tempo de coagulação foi então medido.

#### **4.12. Caracterização da superfície**

A superfície das amostras foram caracterizadas através de espectroscopia de Infravermelho de Reflexão Total Atenuada (ATR-IR) utilizando um espectrofotômetro FT-IR Perkin-Elmer 1600 acoplado com acessório ATR que usa cristal KRS-5 num ângulo de 45°. A Microscopia Eletrônica de Varredura ( MEV ) utilizou um microscópio Cambridge modelo Stereoscan 54-10 com 25 KV e inclinação de 35°. A metalização das amostras foi feita com ouro à 20 KV. As medidas de ângulo de contato foram feitas num Goniômetro NRL modelo 100.

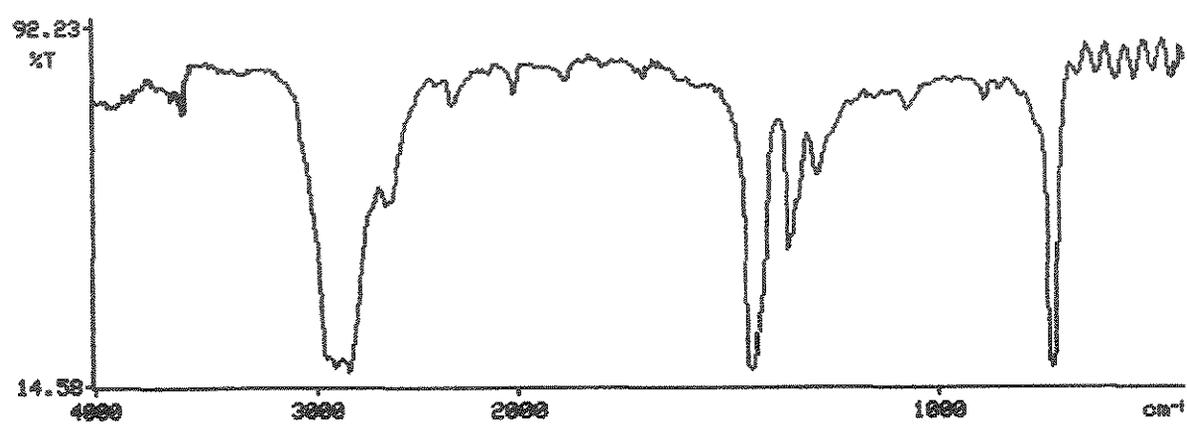
**CAPÍTULO V**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 5.1. Quanto ao reator fotoquímico:

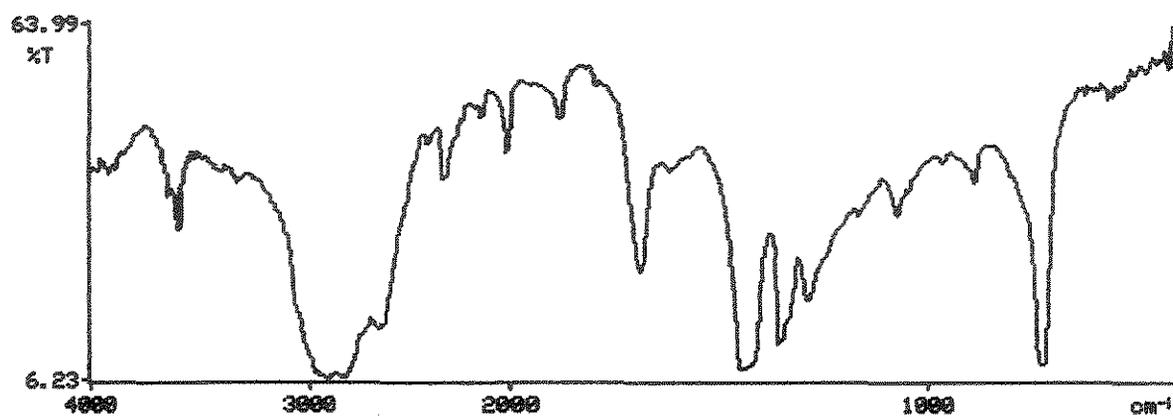
À princípio, as reações de enxertia fotoquímica dos monômeros AA, AAm e GMA seriam realizados em fase vapor. Tentou-se, então, adaptar o novo reator para este tipo de enxertia, pendurando-se o filme a ser tratado na lateral do reator. Ocorria então a deformação do mesmo devido a alta temperatura ao redor da fonte de radiação U. V.

Outro problema encontrado foi a dificuldade de controle da polimerização na mistura reacional, pois os monômeros estavam sendo consumidos antes mesmo de passarem para a fase vapor (homopolimerização). Colocou-se então a mistura reacional num recipiente âmbar para protegê-la dos raios de luz ultravioleta. Este recipiente foi então colocado dentro do reator. Neste caso, não conseguiu-se elevar a temperatura deste recipiente até a temperatura de ebulição do solvente. Tentou-se também proteger a mistura reacional com uma espécie de tampa toda furada por onde o vapor, contendo os reagentes, passaria. A polimerização em fase líquida continuou.

Percebeu-se, também que o reator não era vedado suficientemente bem para que a presença de oxigênio fosse nula. Com isso ocorria a oxidação do filme antes da enxertia desejada. A figura 14 mostra o espectro de ATR-IR do filme de polietileno não tratado (a) e o espectro do filme oxidado (b). Em presença de oxigênio ocorre primeiramente a formação de grupos hidroperóxido na superfície do filme [57]. A fotólise destes grupos leva à formação de grupos carbonila que são os responsáveis pelo aparecimento da banda forte que se observa no espectro (b) em  $1715\text{ cm}^{-1}$



(a)



(b)

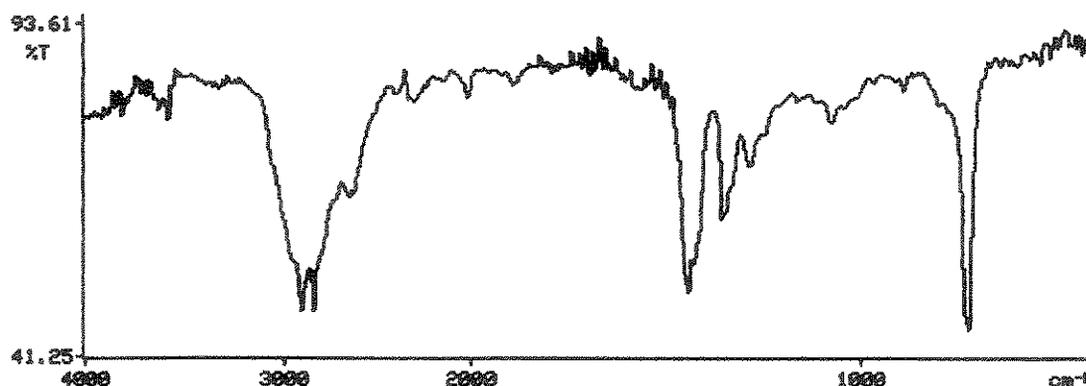
Figura 14: Espectros de ATR-IR do filme de polietileno (a) não tratado e (b) filme de polietileno oxidado.

## 5.2. Quanto à fotooxidação e termopolimerização [58]:

Branco 1: apenas o monômero a ser enxertado não estava presente na mistura reacional. Existindo então o fotoiniciador, ocorreu a oxidação do filme confirmando a vedação ineficiente do reator. O espectro de ATR-IR deste filme foi semelhante ao espectro 14 (b), com a banda referente ao grupo carbonila em  $1715\text{ cm}^{-1}$ .

Com o filme imerso na mistura reacional, um branco foi realizado para que a possibilidade de termopolimerização fosse eliminada.

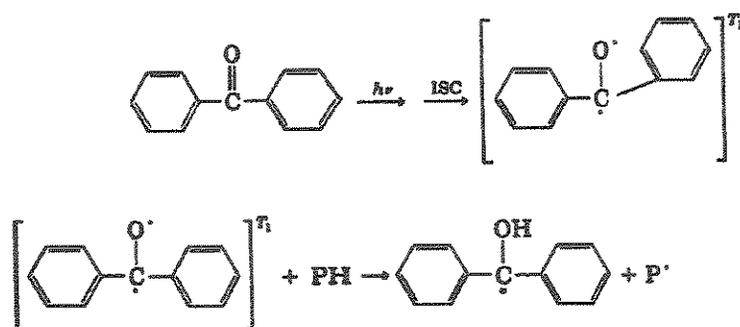
Branco 2: todos os reagentes estavam presentes na mistura reacional e a mesma temperatura de reação foi usada. A mistura não foi irradiada com luz UV. A figura 15 mostra o espectro de ATR-IR confirmando que não ocorreu nenhum tipo de reação comparado com o espectro da figura 14 (a).



**Figura 15: Espectro de ATR-IR realizado para verificação de termopolimerização.**

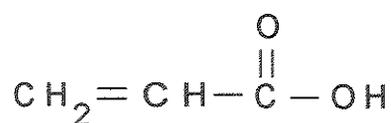
### 5.3. Enxertia do ácido acrílico (AA), acrilamida (AAm) e metacrilato de glicidila (GMA) por fotossensibilização [18].

O processo de enxertia estudado aqui baseia-se na habilidade da benzofenona excitada abstrair hidrogênio de um substrato. Quando a benzofenona é irradiada com luz UV ela é excitada até o primeiro estado singlete e rapidamente se transfere ao estado tripleto. Neste estado tripleto ela pode captar hidrogênio da superfície do polímero (PH). Surge então um macroradical ( $P^\bullet$ ) na superfície, que pode atacar um monômero (M) insaturado e iniciar a enxertia como mostra a reação:

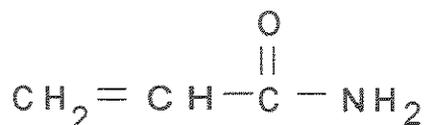


A irradiação da benzofenona em 340 ou 254 nm excita a molécula até o estado  $S_1$  ( $n, \pi^*$ ) ou  $S_2$  ( $\pi, \pi^*$ ), respectivamente. A conversão interna (IC) do estado  $S_2$  ao  $S_1$  é muito rápida ( $10^{-12}$  s). A conversão intersistema (ISC) do estado singlete  $S_1$  ao estado tripleto  $T_1$  ( $n, \pi^*$ ) ocorre eficientemente durante  $10^{-10}$  s; portanto o estado quimicamente ativo é o estado tripleto [21].

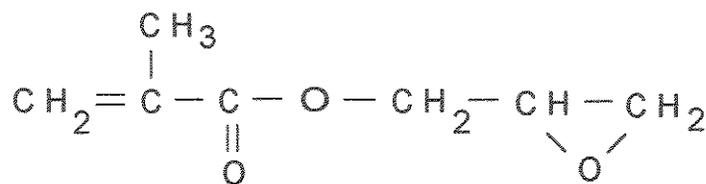
Os monômeros utilizados para a enxertia foram os seguintes:



Ácido acrílico



Acrilamida

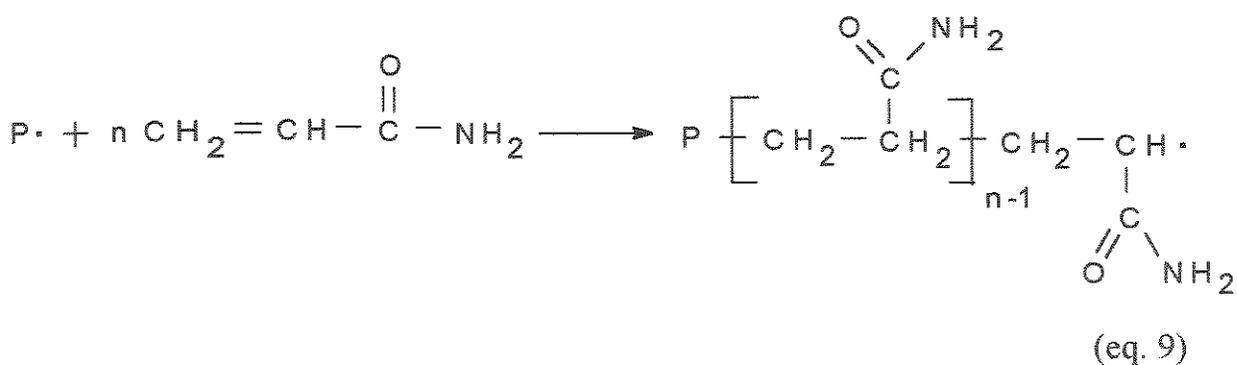
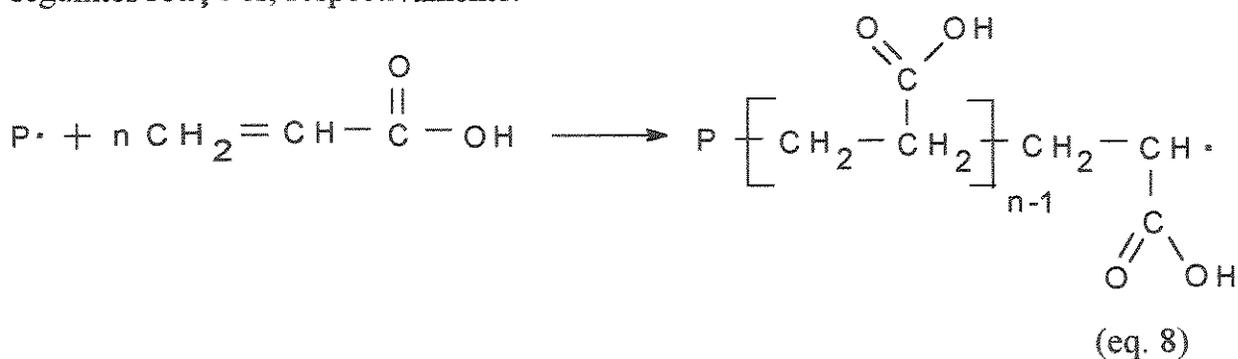


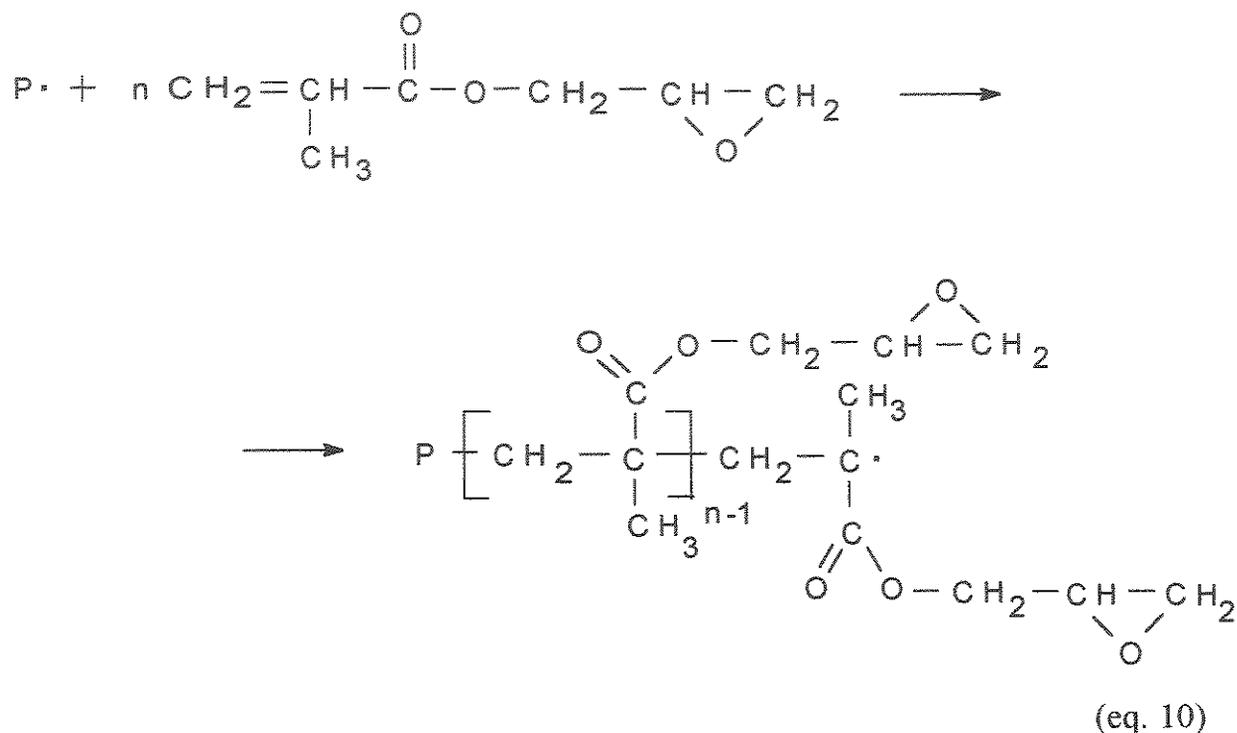
Metacrilato de glicidila

O macrorradical ( $P^\bullet$ ) ataca todos os monômeros na dupla ligação do grupo  $\text{C}=\text{C}$  deixando então o monômero da superfície como radical:



Assim, para o ácido acrílico, acrilamida e metacrilato de glicidila, temos as seguintes reações, respectivamente:





#### 5.4. Caracterização por ATR-IR

Os espectros de infravermelho mostram as bandas características para cada tipo de ligação e suas deformações. O espectro (a) da figura 16 confirma a enxertia do ácido acrílico através do aparecimento de uma banda forte em  $1715 \text{ cm}^{-1}$  referente aos grupos carbonila (C=O) da função ácido carboxílico; a banda de hidroxila (OH) também da função ácido carboxílico aparece numa faixa larga de  $3000 \text{ a } 3500 \text{ cm}^{-1}$ . A ligação C-O aparece na região de  $1000 \text{ a } 1300 \text{ cm}^{-1}$ .

A enxertia da acrilamida foi confirmada também por infravermelho observando-se o deslocamento que ocorre com a banda do grupo carbonila da função amida. Esta banda ocorre na região de  $1650 \text{ cm}^{-1}$ . A banda referentes às deformações da ligação N-H aparecem em aproximadamente  $3500 \text{ cm}^{-1}$ . Portanto, através do espectro (b) da figura 16 pode-se notar a presença de todas as bandas que caracterizam a função amida. O espectro esperado para o polietileno enxertado com metacrilato de glicidila deve apresentar uma banda forte de carbonila em  $1710 \text{ cm}^{-1}$  e uma banda também entre  $1100 \text{ e } 1300 \text{ cm}^{-1}$  correspondente à ligação C-O. O espectro (c) da figura 16 apresenta as bandas esperadas para esta reação.

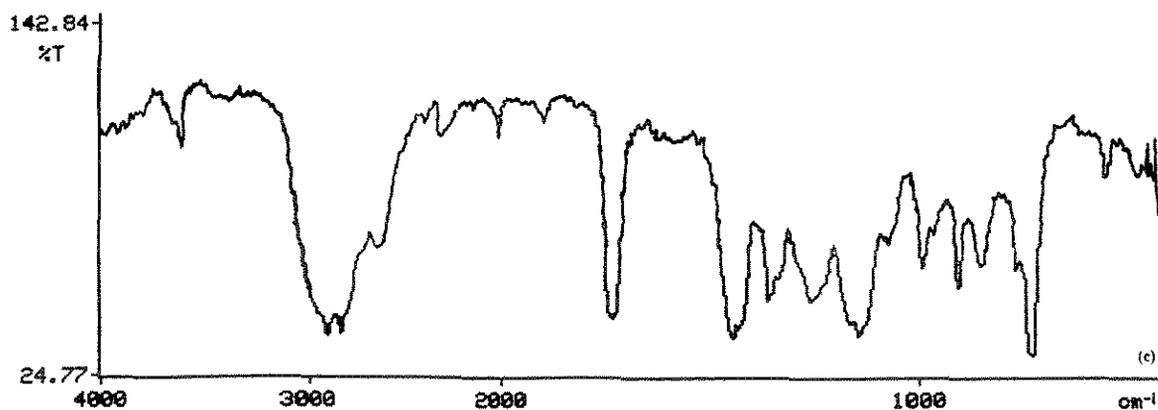
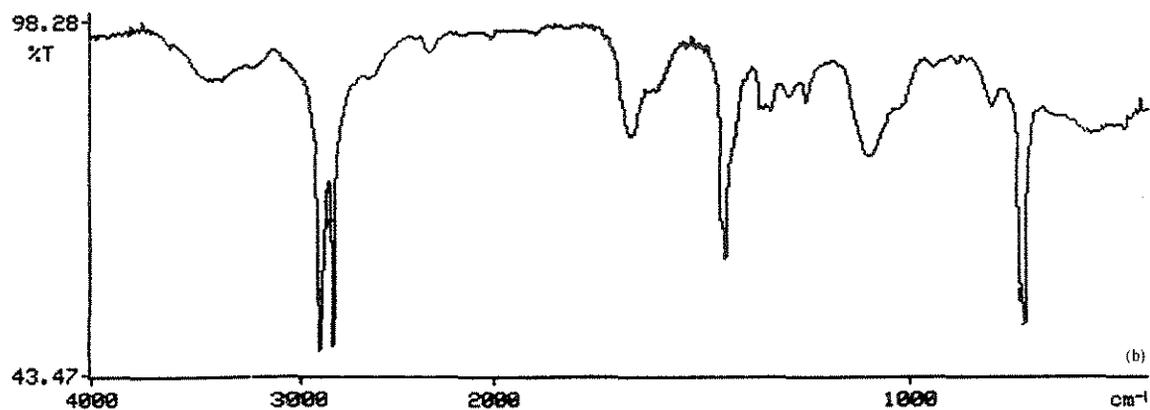
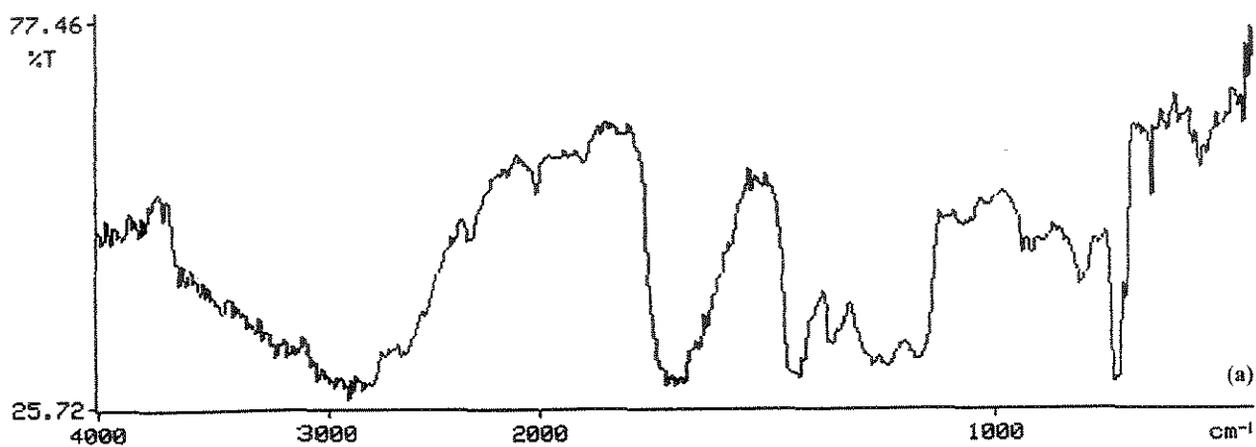


Figura 16: ( a ) LDPE-g-AA, ( b ) LDPE-g-AAm, ( c ) LDPE-g-GMA.

### 5.5. Quanto à porcentagem de enxertia

A porcentagem de enxertia foi calculada por método gravimétrico:

$$\% \text{ de enxertia} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad (\text{eq. 11})$$

Os resultados podem ser vistos na tabela 5:

**Tabela 5: Percentual de enxertia**

	acetona	etanol
ácido acrílico	4,33 %	0,11 %
acrilamida	2,70 %	0,04 %
metacrilato de glicidila	1,48 %	0,06 %

Como se pode notar pelos dados da tabela 5, o etanol não é um bom solvente para se utilizar neste processo de fotoenxertia. Provavelmente a benzofenona é capaz de formar pontes de hidrogênio com o grupo álcool dificultando assim a atividade do fotossensibilizador. Como a acetona absorve luz UV abaixo de 320 nm e o etanol apenas abaixo de 200 nm, a acetona deve ter um efeito sinérgico com a benzofenona, auxiliando-a provavelmente na função de retirar os átomos de hidrogênio da superfície do polímero. A excelente solubilidade da benzofenona em acetona também é uma vantagem para este solvente.

Como a porcentagem de enxertia usando etanol como solvente foram muito baixas, as amostras que usaram este solvente não serão mais analisadas, pois consideramos seu nível de enxertia desprezível.



A ligação da albumina ao grupo epoxi do metacrilato de glicidila se deu através de seu grupo amina terminal, análogo à reação da heparina ( eq. 12)

A análise também qualitativa e quantitativa da albumina foram realizadas. A presença da albumina foi detectada através da ligação proteína-corante. A adaptação do método simplesmente passa a medir albumina imobilizada em filmes poliméricos ao invés de proteína livre em solução. A absorbância do complexo proteína - corante é medida em 595 nm e nossas medidas foram realizadas em 465 nm, que é o comprimento de onda de absorção do corante. O que se mede, portanto, é a quantidade de corante que deixa a solução para se ligar à albumina imobilizada no filme. Utilizou-se este método adaptado após a obtenção de uma curva de calibração muito satisfatória. Os resultados estão na tabela 6.

### **5.7. Reação de heparina e albumina em filmes de LDPE -g- PEI**

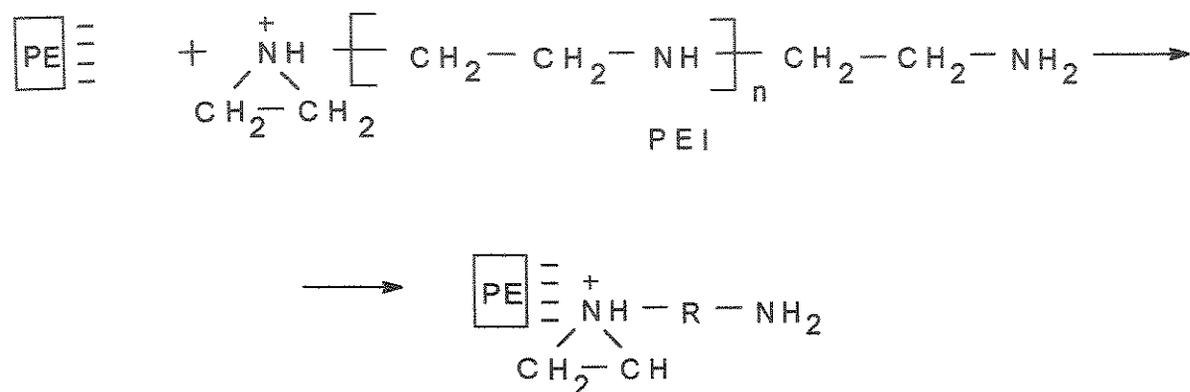
O pré-tratamento do filme com ácido sulfúrico e permanganato de potássio introduz grupos sulfatos e carboxílicos conferindo à superfície alta carga negativa e ativando a mesma para a reação com a polietilenoimina. O corante azul de toluidina é usado para detectar esses grupos no teste de superfície tornando o filme intensamente azulado .

A polietilenoimina é adsorvida fortemente nesta superfície carregada negativamente e esta adsorção é muito dependente do pH. À pH 3,0 as moléculas poliméricas formam cadeias relativamente retas devido à alta repulsão intramolecular. Portanto, a superfície tratada a pH 3,0 deve consistir de uma monocamada de grupos amino.

À pH 9,0 a repulsão intramolecular diminui e são formados agregados globulares. Os grupos amino ligados à superfície neste caso, estão mais aleatoriamente distribuídos.

O pH 3,0 portanto é mais apropriado pois confere maior mobilidade à cadeia e isto é verificado através dos resultados da tabela 6.

A reação foi realizada em pH 3,0 e pH 9,0 de acordo com a equação 13:



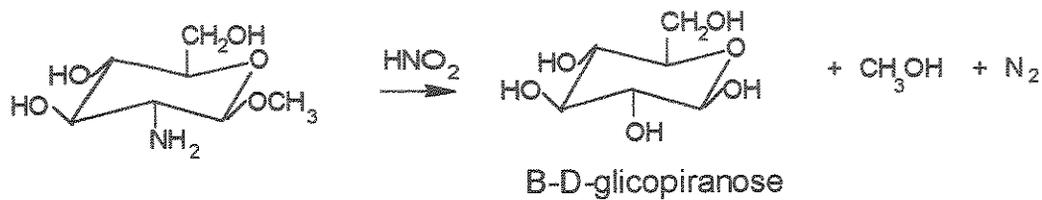
(eq. 13)

### 5.7.1. Dosagem de heparina e albumina imobilizada

**Tabela 6** : Quantidade de heparina e albumina imobilizada via GMA e PEI

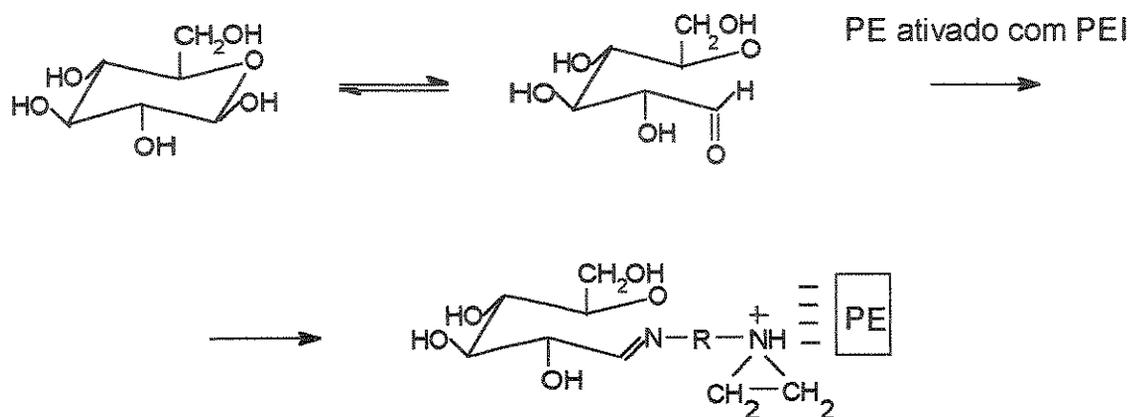
	Heparina ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Albumina ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
GMA	1,4	3,7
PEI pH 3,0	1,1	7,5
PEI pH 9,0	---	4,3

Para realizar a ligação da heparina com os grupos amino terminais do polietilenoimina, realizou-se a degradação da mesma através de uma desaminação com ácido nitroso de acordo com a reação [59]:



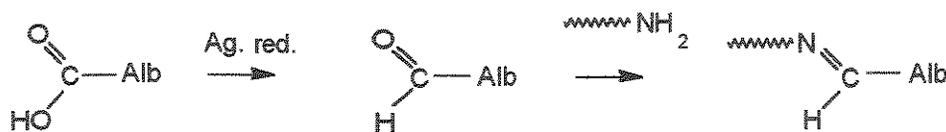
(eq. 14)

O β - D - glicopirranose formado pela desaminação está em equilíbrio com uma pequena quantidade de aldeído que reage facilmente com aminas primárias. A reação, então, das aminas primárias do PEI com aldeído [61] é mostrada na equação 15.



(eq. 15)

Para a ligação da albumina realizou-se a redução dos grupos carboxílicos terminais a grupos aldeídos com cianoborohidreto de sódio. Após a redução, realizou-se a ligação com o polietileno ativado com polietilenoimina como mostra a equação 16.



(eq. 16)

## 5.8. Caracterização da superfície quanto à trombogenicidade

### 5.8.1. Medidas de ângulo de contato

A tabela 7 mostra os valores de ângulo de contato obtidos após os vários tratamentos.

**Tabela 7:** Medidas de ângulo de contato.

LDPE não tratado	93 °
LDPE -g- AA	24 °
LDPE -g- AAm	83 °
LDPE -g- GMA	72 °
LDPE -g- GMA - Hep	64 °
LDPE -g- GMA - Alb	78 °
LDPE -g- PEI ( 3 )	57 °
LDPE -g- PEI ( 3 ) - Hep	48 °
LDPE -g- PEI ( 3 ) - Alb	65 °
LDPE -g- PEI ( 9 )	62 °
LDPE -g- PEI ( 9 ) - Hep	54 °
LDPE -g- PEI ( 9 ) - Alb	75 °

Como esperado, o filme de polietileno enxertado com ácido acrílico apresentou a melhor molhabilidade por ser o monômero mais hidrofílico, com ângulo de contato decrescendo de 93° para 24°. Já a acrilamida não teve um efeito tão significativo sobre o ângulo de contato e neste caso a diminuição foi de apenas 10°. O efeito do metacrilato de glicidila e do polietilenoimina vai depender da molécula que for ligada posteriormente, heparina ou albumina. A heparina apresentou um efeito melhor sobre a molhabilidade que a albumina. Isto já era

esperado pois estão presentes em sua estrutura grupos hidrofílicos como sulfatos e carboxílicos.

A albumina, por ser uma proteína natural tem em sua estrutura regiões hidrofóbicas, o que a deixa com menor efeito sobre o ângulo de contato que a heparina.

### 5.8.2. Teste de tempo de tromboplastina parcial ativado

Os resultados são mostrados na tabela 8.

**Tabela 8: Resultados de TTPA.**

Amostras	TTPA ( s )
LDPE não tratado	34,0
LDPE -g- AA	66,0
LDPE -g- AAm	36,6
LDPE -g- GMA - Hep	36,0
LDPE -g- GMA - Alb	35,4
LDPE -g- PEI ( 3 ) - Hep	33,8
LDPE -g- PEI ( 3 ) - Alb	33,6
LDPE -g- PEI ( 9 ) - Hep	35,2
LDPE -g- PEI ( 9 ) - Alb	36,4

O teste de tempo de tromboplastina ativado mede o tempo necessário para que o primeiro coágulo se forme. Ele desencadeia o processo de coagulação por via intrínseca que é a via ativada quando um material estranho entra em contato com o sangue. Este teste mostrou apenas a melhora no tempo de coagulação para a amostra LDPE -g- AA. O primeiro coágulo se forma com praticamente o dobro do tempo em

---

relação ao LDPE sem tratamento. Isto ocorre devido às propriedades hidrofílicas que o AA confere ao LDPE. A acrilamida, como não causou um aumento significativo no ângulo de contato, também não teve efeito algum sobre o TTPA.

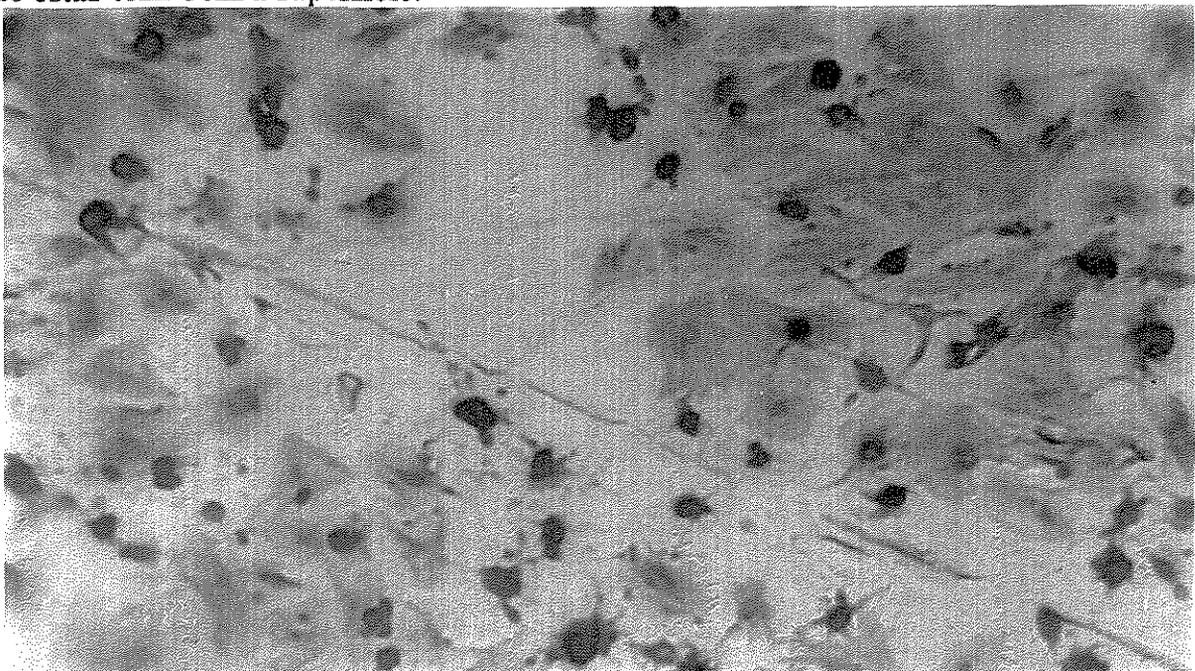
As amostras com heparina deveriam ter apresentado um tempo bem maior de coagulação, o que não aconteceu. Como a heparina estava presente em todas as amostras, exceto LDPE -g- PEI ( 9 ) - Hep, já visto na tabela 6, entendemos que apesar das condições brandas de reação, a heparina não apresentou atividade. Uma hipótese é que a reação com o polietilenoimina tenha ocorrido na sequência ativa da heparina causando então a inativação.

As amostras com albumina não deveriam mostrar efeito sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada pois seu efeito é inibir a adesão de plaquetas.

### 5.8.3. Teste de adesão de plaquetas

Os filmes, após os vários tratamentos e exposição ao PRP, foram observados num microscópio ótico com um aumento de 1000 vezes e as fotos mostradas através das fotos abaixo.

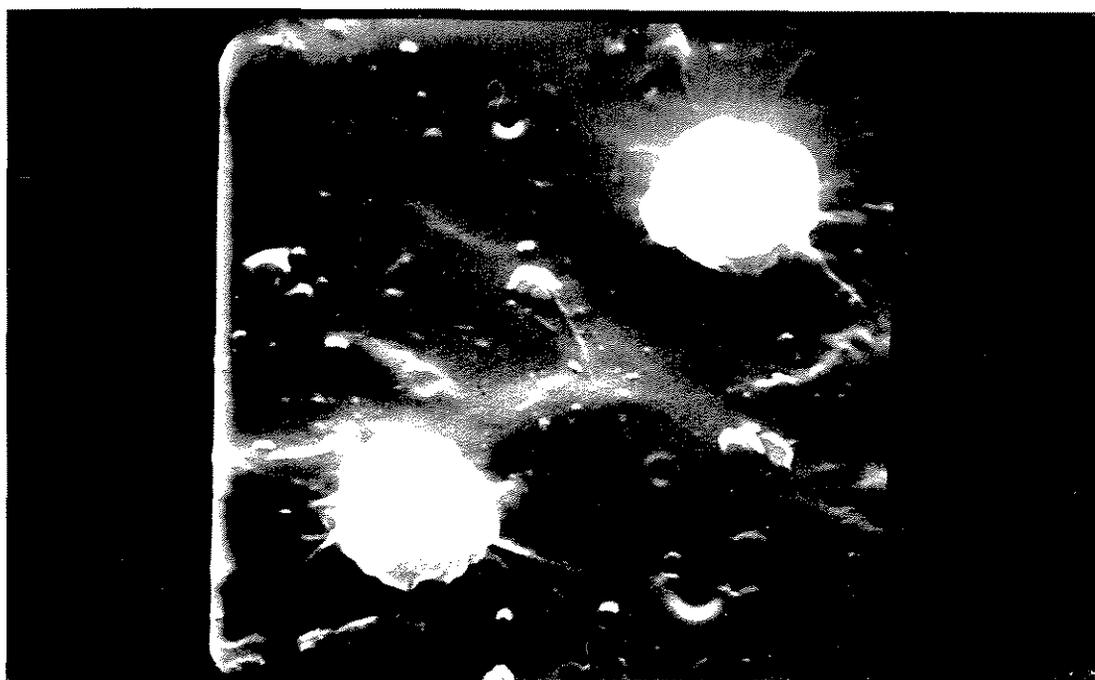
A figura 17 (a) mostra o filme de LDPE sem tratamento após exposição ao PRP e tingido com corante. Muitas plaquetas estão aderidas em sua superfície, que são as manchas azuis. As micrografias (b) e (c) mostram o tipo de interação que as plaquetas têm com as superfícies em estudo. Se a superfície exposta ao PRP for muito trombogênica as plaquetas apresentam pseudopodos como na figura 17 (b) que é LDPE não tratado. A figura 17 (c) mostra a interação das plaquetas com um filme de poliuretano, que é considerado menos trombogênico que o polietileno. Pode-se notar que não ocorre a presença dos pseudopodos e as plaquetas são bem mais esféricas. Portanto, a conformação das plaquetas mostra o tipo de interação que estas têm com a superfície.



**Figura 17 (a): Fotografia com aumento de 1000x do filme de LDPE sem tratamento exposto ao PRP.**



(b)

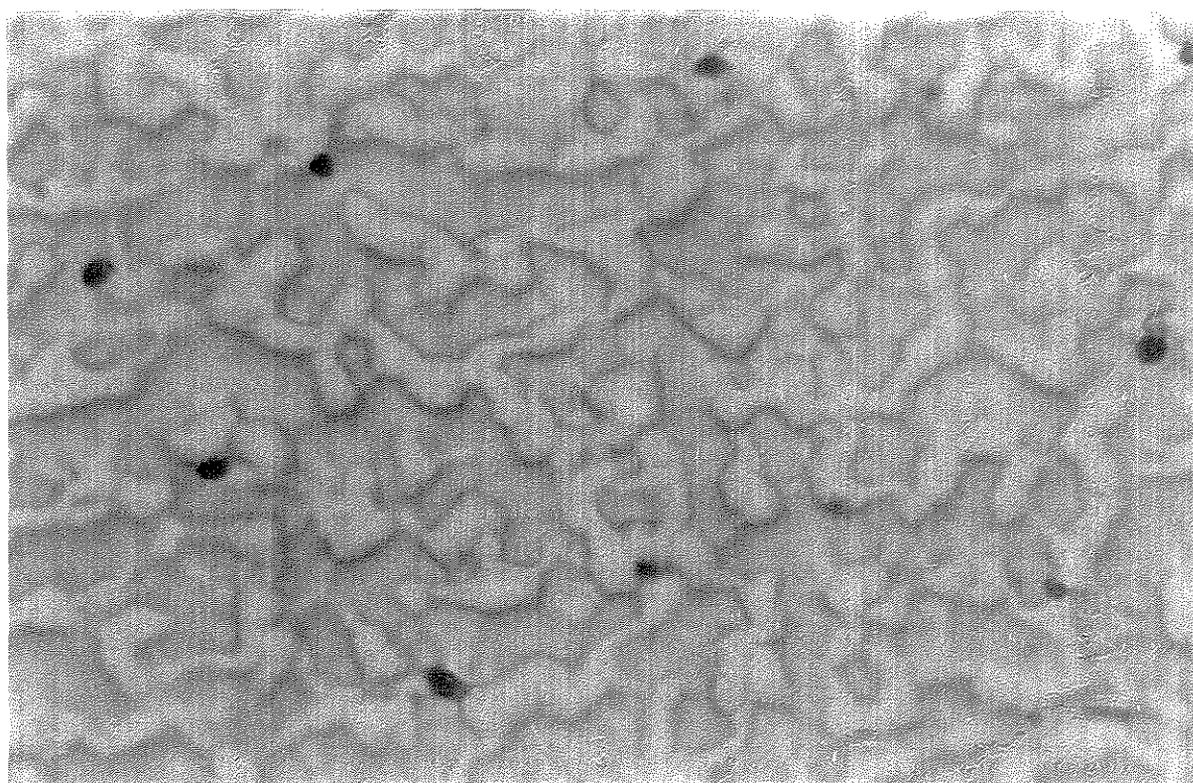


(c)

**Figura 17: Micrografias com aumento de 5000x dos filmes de (b): LDPE não tratado e (c) poliuretano não tratado expostos ao PRP. Escala: 1cm equivale a 2 $\mu$ m.**

Como se pode observar através da figura 18, todos os tratamentos causaram sensível inibição no número de plaquetas aderidas na superfície dos filmes. Com AA, figura 18 (a) ainda nota-se a presença de plaquetas na superfície dos filmes, mas elas estão mais esféricas do que no filme sem tratamento. Já nas amostras com AAm, figura 18 (b) e GMA figura 18 (c) não se observa adesão de plaquetas. Talvez isso seja por causa do tipo de morfologia apresentada por estes dois monômeros após a enxertia.

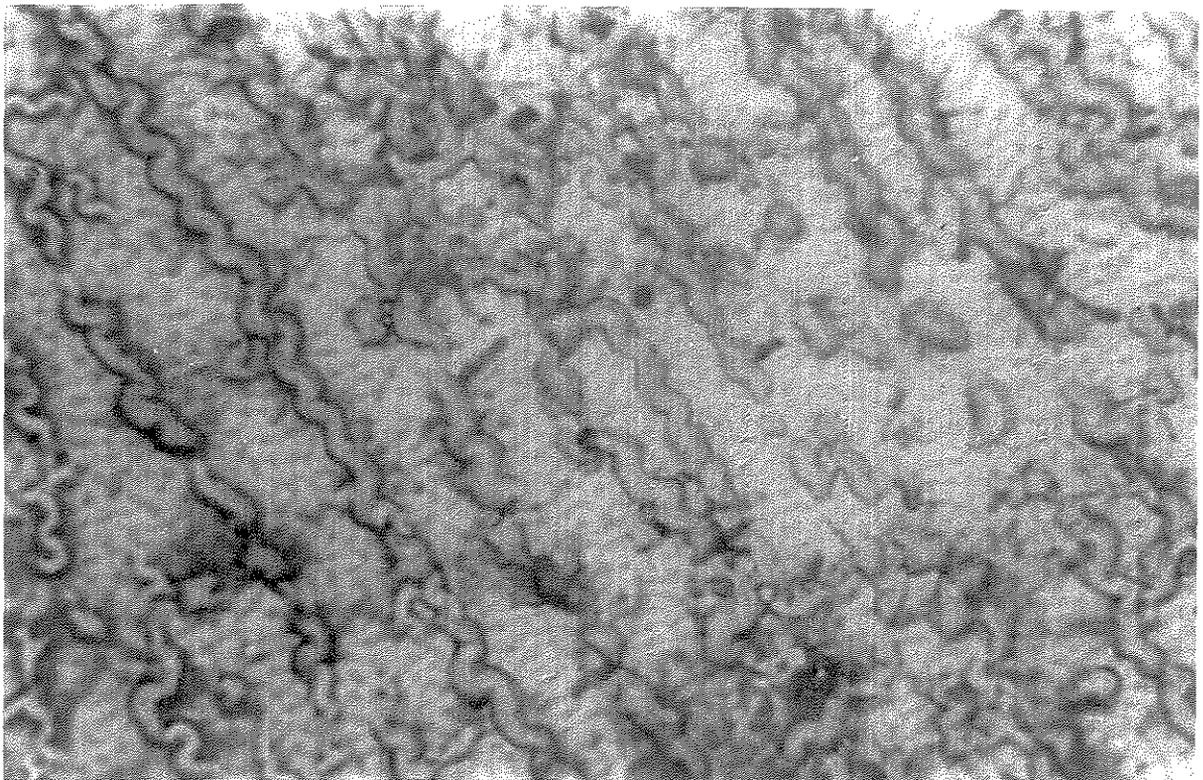
As amostras com heparina e albumina ligadas ao PEI também não apresentaram nenhuma plaqueta em sua superfície. Confirma-se assim o efeito de passivação de superfície causada pela albumina bem como o efeito da heparina sobre a adesão de plaquetas. As fotografias da figura 19 (a) e (b) mostram as superfícies do polietileno tratados com PEI-Alb e PEI-Hep, respectivamente. Essas amostras são as tratadas em pH 3,0, que foram os melhores resultados obtidos.



**Figura 18 (a): Fotografia com aumento de 1000x do filme LDPE-g-AA após teste de adesão de plaquetas**

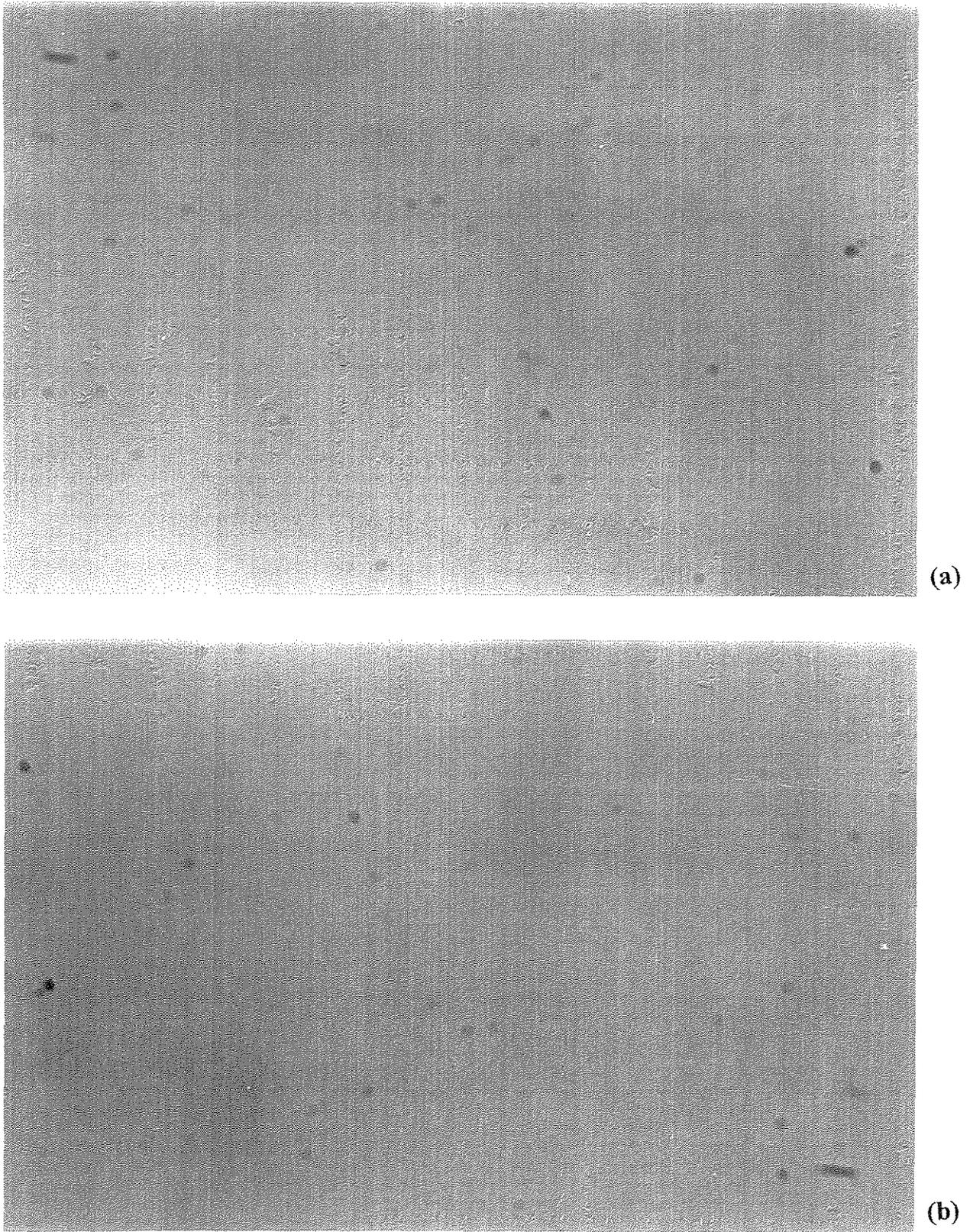


(b)



(c)

**Figura 18 : Fotografias com aumento de 1000x de (b): LDPE-g-AAm e (c): LDPE-g-GMA após teste de adesão de plaquetas.**

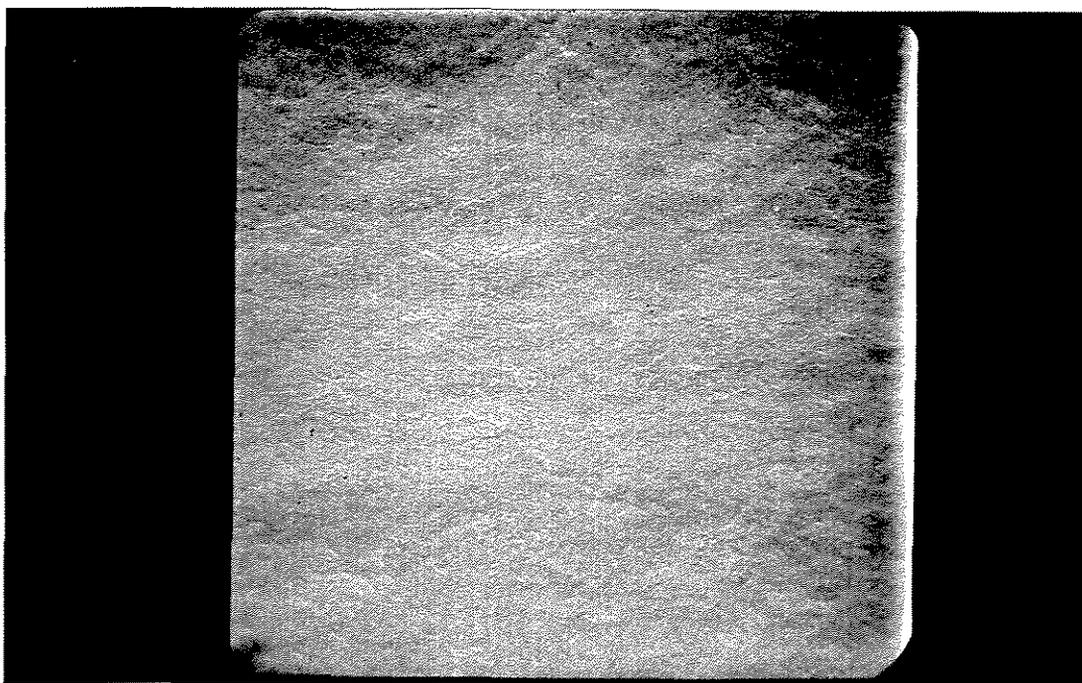


**Figura 19: Fotografias com aumento de 1000x de (a): LDPE-g-PEI-Alb e (b): LDPE-g-PEI-Hep após teste de adesão de plaquetas.**

### 5.9. Morfologia da superfície por MEV

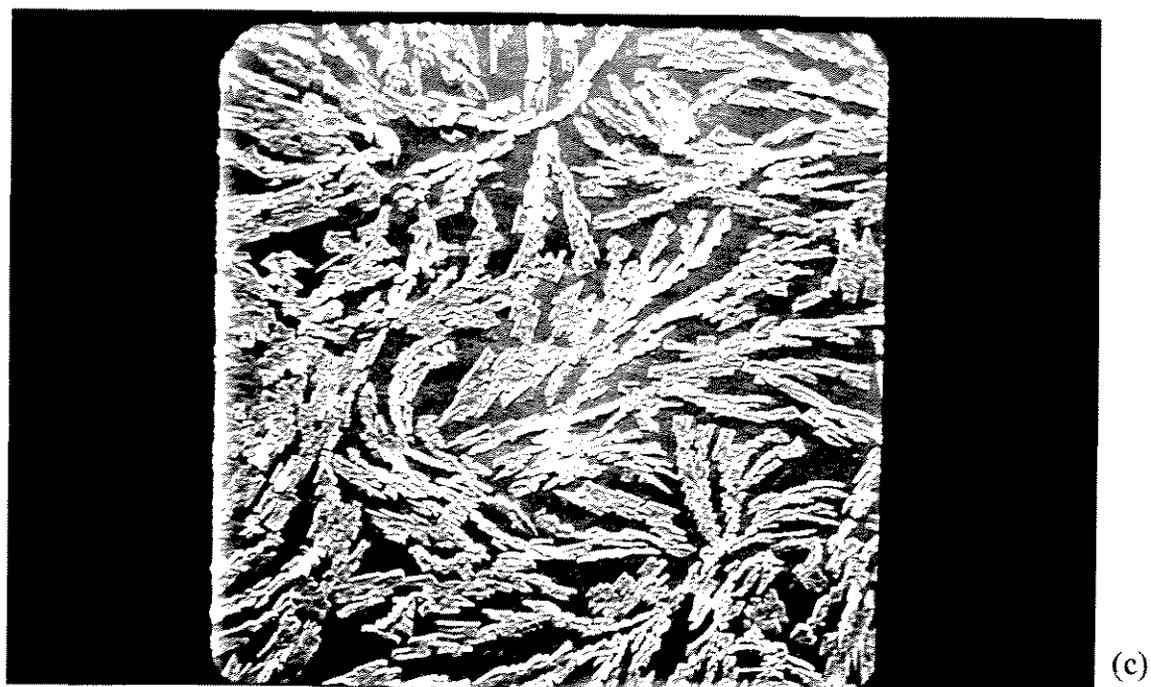
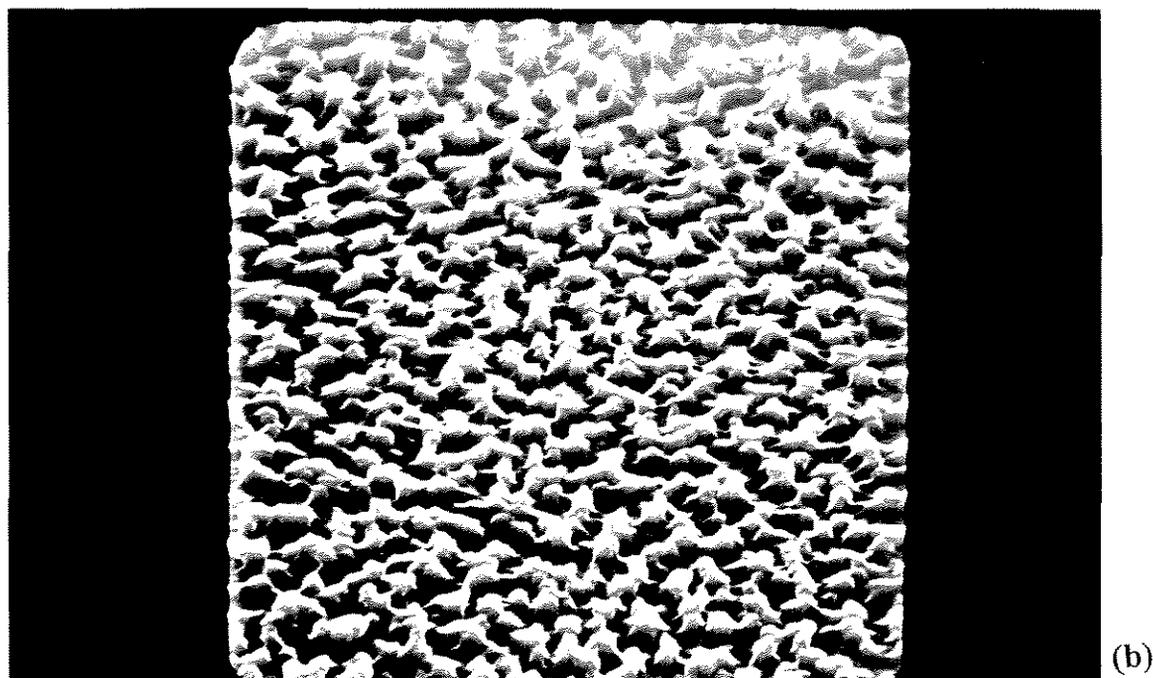
As micrografias das superfícies enxertadas com AA, AAm e GMA, que são amostras que apresentaram níveis consideráveis de enxertia, mostraram uma mudança significativa na morfologia. Cada monômero apresentou uma rugosidade diferente e este é um dos fatores determinantes da tromboresistência dos materiais. A figura 20 (a) apresenta a superfície do LDPE não tratado, a enxertia com AA, AAm e GMA são mostradas pela (b), (c) e (d), respectivamente.

As amostras com PEI, por ter um nível muito baixo de enxertia, que não puderam ser determinadas nem por gravimetria nem por infravermelho, praticamente não apresentaram mudança na sua superfície. Após a ligação com heparina e albumina não se nota mudança na superfície, ficando exatamente como na micrografia (d).



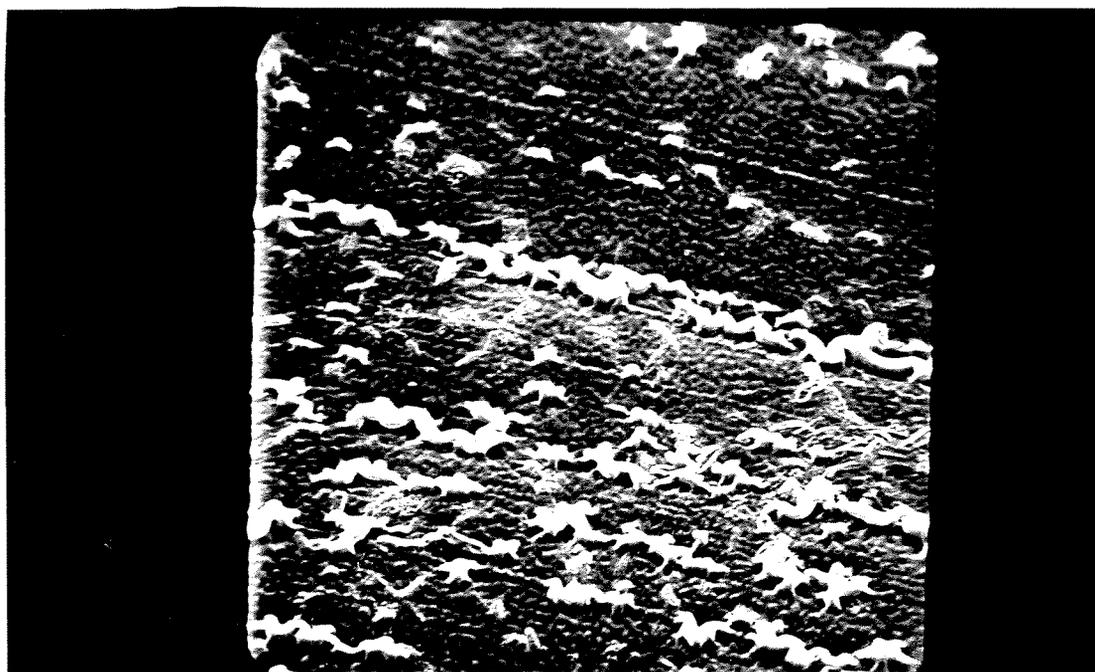
**Figura 20 : (a) Micrografia com aumento de 500x de LDPE sem tratamento.**

**Escala: 1cm equivale a 20 $\mu$ m.**



**Figura 20 : ( b ) LDPE-g-AA , ( c ) LDPE-g-AAm.**

**Aumento de 500x. Escala 1cm equivale a 20 $\mu$ m.**



**Figura 20:** (d) LDPE-g-GMA.

Aumento de 500x. Escala : 1cm equivale a 20  $\mu\text{m}$ .

**CAPÍTULO VI**  
**CONCLUSÃO**

---

À partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a enxertia em fase líquida pode ser realizada com os três monômeros sugeridos, sendo que a porcentagem de enxertia depende da estrutura de cada monômero.

- não houve termopolimerização, apesar da temperatura da reação, sendo todo o percentual da enxertia atribuído à fotoenxertia.

- heparina e albumina foram ligadas à superfície ativada com polietilenoimina e metacrilato de glicidila, como demonstraram os resultados das análises colorimétricas .

- a heparina ligada via polietilenoimina e metacrilato de glicidila não tem efeito anticoagulante devido a inativação durante o procedimento de imobilização mas inibe a adesão de plaquetas.

- somente a enxertia de ácido acrílico teve resultado positivo no aumento do tempo de tromboplastina parcial ativado, provavelmente pelo aumento do caráter hidrofílico conferido à superfície após tal tratamento.

- todos os tratamentos realizados causaram uma diminuição de plaquetas aderidas à superfície , aumentando o tempo de formação de trombos.

**CAPÍTULO VII**  
**SUGESTÕES**

As sugestões para próximos trabalhos são:

- montagem de um reator mais adequado para enxertia em fase vapor . Este reator deve ser totalmente vedado, com possibilidade de se colocar a amostra a ser enxertada à uma distância da fonte UV que não prejudique o filme.

- investigação da relação tempo de irradiação e porcentagem de enxertia.

- conseguir a ligação da heparina sem que suas propriedades anticoagulantes sejam perdidas.

- confirmar a validade do método de quantificação de albumina em suportes poliméricos, já que este método quantifica proteínas em solução e foi por nós adaptado para proteínas imobilizadas.

- estudo mais detalhado do tipo de morfologia apresentado por cada monômero após a enxertia, pois a morfologia da superfície é um dos fatores que afetam a biocompatibilidade

- investigar a possibilidade de ligação entre o polímero e um conjugado heparina/albumina. Assim, as propriedades anticoagulantes da heparina serão somadas à propriedade que a albumina tem de diminuir a adesão plaquetária.

- estudar mecanismo de enxertia de monômeros via radiação gama.

- investigar outros tipos de espaçadores que por si só conferem alguma biocompatibilidade ao material enxertado, como por exemplo polietileno glicol ou hidroxietilmetacrilato.

**CAPÍTULO VIII**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Referências bibliográficas :**

1. Seycher, M. - "Blood Compatible Materials and Devices" , Technonic Publishing Co., Inc. Lancaster, (1991).
2. Braybrook, J. H. - "Organic Polymer Surfaces for Use in Medicine: Their formation, Modification, Characterization and Application", Prog. Polym. Sci., 15, 715-734, (1990).
3. Leininger, R. I. - "Polymers as Surgical Implants" , CRC Handbook of Materials Science, Vol III, Cleveland, (1975).
4. Bruck, S. D. - "Medical Application of Polymeric Materials" , Med. Prog. Technol., 9, 1-16, (1982).
5. Triolo, P. M. - "Surface Modification and Evaluation of Some Commonly Used Catheter Materials. I - Surface Properties", J. Biomed. Mater. Res., 17, 129-147, (1983).
6. Kaganov, A. L. - "Hydrophilized Polyethylene Catheters" , J. Biomed. Mat. Res., 10, 1-7, (1976).
7. Willians, D. F. - "Biocompatibility of Clinical Implant Materials" , CRC Press, Inc., Vol II, (1981).
8. Block, J. - "The Future of Polyethylene" , J. Bone Jt. Surg. Br., 60, 303-306, (1988).
9. Grobbelaar, C. J. - "The Radiation Improvement of Polyethylene Prostheses" , J. Bone Jt. Surg. Br., 60, 370-374, (1988).
10. Zweifach, B. W. -"Problems in Blood - Tissue Reactions to Polymeric Materials" in Biomedical Polymers, Ed. Marcel Dekker, New York, (1971).
11. Gibbons, D. F. - "Biomedical Materials" , Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 4 (00), 367-375, (1975).

12. Park, J. B. - "Biomaterials - An Introduction" , Plenum Press, New York, (1980).
13. Durrani, A. A., Chapman, D. - "Polymer Surfaces and Interfaces" , Ed. W. J. Feast and H. S. Munro, (1987).
14. Hench, L. L. - "Biomaterials" , Science, 208, 826-831, (1982).
15. Lee, H. and Neville, K. - "Biomedical Polymers" , Ed. A. Rembaum and M. S. M. Dekker, New York, (1971).
16. Ratner, B. D. - "Polymers as Biomaterials" , Ed. Shalaby W Shalaby, (1984).
17. Armander, C. - "Long - Term stability *in vivo* of a Thromboresistance Heparinized Surface" , Biomaterials, 8, 496-503, (1987).
18. Allmér, K. - "Surface Modification of Polymer. I. Vapor Phase Photografting with Acrylic Acid" , J. Polym. Sci. Polym. Chem., 26, 2099-2111, (1988).
19. Ratner, B. D. - "Characterization of Graft Polymers for Biomedical Applications" , J. Biomed. Mater. Res., 14, 665-687, (1980).
20. Schnabel, W. and Yagci, Y. - "Light-induced Synthesis of Block and Graft Copolymers" , Prog. Polym. Sci., 15, 551-601, (1990).
21. Rabek, J. F. - "Mechanisms of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers. Theory and Applications" , John Wiley & Sons, Stockholm, (1982).
22. Goodman, G. - "The Pharmacological Basis of Therapeutics" , CRC Press, (1985).
23. Bjork, I. and Lindahl, U. - "Mechanism of the Anticoagulant Action of Heparin" , Mol. and Cell. Biochem., 48, 161-182, (1982).
24. Holmer, E., Soderstrom, G. and Andersson, L. - "Studies on the Mechanism of the Rate-Enhancing Effect of Heparin on the Thrombin-Antithrombin III Reaction" , Eur. J. Biochem., 93, 1-5, (1979).

- 
25. Miura, Y., Aoyagi, S. and Miyamoto, K. - "The Characteristics of Anticoagulation by Covalently Immobilized Heparin" , J. Biomed. Mater. Res., 14, 619-630, (1980).
26. Pasche, B., Kodama, K., Larm, O., Olsson, P. and Swedenborg, J. - "Thrombin Inactivation on Surfaces With Covalently Bonded Heparin" , Thromb. Res., 44, 739-748, (1986).
27. Aoshima, R. - "Sulfonated Poly(vinylidene fluoride) as a Biomaterial: Immobilization of Urokinase and Biocompatibility" , J. Biomed. Mater. Res., 16, 289-299, (1982).
28. Everse, J., Everse, K. T. and Mercer, L. C., US Pat. US305926, (1981).
29. Woodford, A. E., Eur. Pat. Appl., EP370977, (1983).
30. Jacobs, H. A. - "Antithrombogenic Surfaces: Characterization and Bioactivity of Surface of Immobilized PEG<sub>1</sub>- Heparin Conjugate" , J. Biomed. Mater. Res., 23, 611-630, (1989).
31. Hennink, W. E. - "Inhibition of Surface Induced Coagulation by Preadsorption of Albumin-Heparin Conjugates" , J. Biomed. Mater. Res., 18, 911-926, (1984).
32. Lyman, D. J., "Polymers in Medicine - An Overview" in Polymers in Medicine - Biomedical and Pharmacological Applications, Plenum Press, New York, (1982).
33. Sigot-Luizard, M. F. - "Cytocompatibility of Albuminated Polyester Fibers" , J. Biomed. Mater. Res., 18, 895-909, (1984).
34. Bagnall, R. D. - "Adsorption of Plasma Proteins on Hydrophobic Surfaces. I. Albumin and  $\gamma$ -Globulin" , J. Biomed. Mater. Res., 11, 947-978, (1977).
35. Humphries, A. W. - "Arterial Prosthesis of Collagen-Impregnated Dacron<sup>®</sup> Tulle" , Surgery, 50, 947-954, (1961).
36. Bascom, J. U. - "Gelatin Sealing to Prevent Blood from Knitted Arterial Grafts" , Surgery, 50, 504-512, (1971).

- 
37. Rudoi, V. M. - "Hydrophilicity of Polyethylene Modified by the Radiation Grafting of Acrylic Acid" , Polymer Science USSR, 30, 376-384, (1988).
38. Ogiwara, Y., Takumi, M. and Kubota, H. - "Photoinduced Grafting of Acrylamide onto Polyethylene Film by Means of Two-Step Method" , J. Appl. Polym. Sci., 27, 3743-3750, (1982).
39. Okano, T., Kataoka, K. - "Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Microdomains on Mode of Interaction Between Block Polymer and Blood Platelets" , J. Biomed. Mater. Res., 15, 393-402, (1981).
40. Ikeuchi, K., Takii, T. - "Water Lubrification of Polyurethane Grafted with Dimethylacrylamide for Medical Use" , Wear, 161, 175-185, (1993).
41. Odian, G. - "Principles of Polymerization", Mc Graw Hill Book Company, New York, (1970).
42. Chawla, K. K., - "Composite Materials - Science and Engineering" , Springer-Verlag, New York, (1987).
43. Shaw, D. J. - "Introdução à Química de Colóides e de Superfícies", Edgard Blucher Ltda., (1975).
44. Lee, L. H. - "Recent Studies in Polymer Adhesion Mechanisms", in Adhesive Bonding , Plenum Press, New York, (1991).
45. Rabockai, T. - "Físico-Química de Superfícies", Programa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da O. E. A., Washington, (1979).
46. Siqueira, D. F. - "Adesão e Morfologia de Pares Poliméricos", Dissertação de Mestrado do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (1990).
47. Albuquerque, A. S. - Tese de Mestrado - "Um Estudo Sobre a Possibilidade de Compatibilização em Compósitos por Siliconas" , Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal da Bahia, Salvador, (1993).

- 
48. Rabek, F. - "Experimental Methods of Polymer Chemistry", John Wiley and Sons, New York, (1980).
49. Lelah, M. D. - "Polyurethanes in Medicine", CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, (1986).
50. Allmér, K. - "Surface Modification of Polymers. II. Grafting with Glycidyl Acrylates and the Reactions of the Grafted Surfaces with Amines" , J. Polym. Sci. Polym. Chem., 27, 1641-1652, (1989).
51. Allmér, K. - "Surface Modification of Polymers. V. Biomedical Applications", J. Polym. Sci. Polym. Chem., 28, 173-183, (1990).
52. Larm, O., Larsson, R. and Olsson, P. - "A New Non-thrombogenic Surface Prepared by Seletive Covalent Binding of Heparin via a Modified Reducing Terminal Residue", Biomat. Med. Dev. Art. Org., 11, 161-173, (1983).
53. Smith, P. K., Mallia, A. K. and Hermanson, G. T. - "Colorimetric Method for the Assay of Heparin Content in Immobilized Heparin Preparation", Anal. Biochem., 109, 466-473, (1980).
54. 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).
55. Han, D. K., Jeong, S. Y., Kim, Y. H. - "Evaluation of Blood Compatibility of PEO Grafted and Heparin Immobilized Polyurethane" , J. Biomed. Mat. Res. Appl. Biomat., 23, 211-228, (1989).
56. Gatcher, R. and Muller, H. - "Plastics Additives" , Hanser Publishers, New York, (1987).
57. Barros, G. G. and Galenbeck, F. - "Sorption and Thermal Polymerization of Acrylic Acid on Polyethylene and on Polyethylene-iron Oxide Composite", Polym. Bull., 16, 499-505, (1986).
58. Saunders, K. J. - "Organic Polymer Chemistry", Chapman and Hall, London, (1973).

59. Farfan, J. A. - "Química de Proteínas Aplicada à Ciência e Tecnologia de Alimentos", Ed. da Unicamp, Campinas, (1990).

60. Alinger, N. L. - "Química Orgânica", Guanabara Dois, Rio de Janeiro, (1978).