UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS

Eng^a Denise de Almeida Reis Nogueira Aluna

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana Orientador

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

Campinas – São Paulo Agosto de 1999

资本:应该被扣



CM-00136904-9

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



Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 27 de agosto de 1999 pela Banca Examinadora constituída pelos Professores e Doutores:

ee *l*a 3

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Prof. Dr. Antônio Celso Fonseca de Arruda

all P- flow

Dr. Waldyr Parolari Novello

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Denise de Almeida Reis Nogueira e aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de agosto de 1999.

Cere tata

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Ao meu marido Wilson, a quem dedico e sempre dedicarei meu amor e os melhores frutos do meu trabalho, pela constante ajuda e encorajamento.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao Professor Cesar Costapinto Santana pela confiança e orientação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de estudos e apoio financeiro.

À FINEP/Pronex pelo apoio financeiro na aquisição do espectrofotômetro de infravermelho.

Ao Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa pela amizade, por ter me auxiliado em inúmeros experimentos realizados no laboratório, pelos ensaios no equipamento de eletroforese capilar e, finalmente, pelas inúmeras discussões e sugestões que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a. Sônia Maria Malmonge (Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP) pelo interesse, sugestões e por ter me auxiliado sempre que precisei.

Ao Dr. Waldyr Novello Polaroli pela doação de solução de heparina.

A todos os professores do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pelo auxílio sempre que preciso.

À Ana Paula, Cristiane, Giuliana, Paula, Patrícia, Rosana pela amizade, paciência e dedicação.

À Marisa pelo interesse e sugestões que muito auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do laboratório: Camila, César, Eduardo, Elcimar, Fábio, José Antônio, Líbia, Lisanne, Luciana, Marcelo, Mirela, Sandra, Sérgio e Vinícius.

Aos meus pais e a toda minha família, especialmente, meus tios Ely e Imaculada e aos meus primos Rossana, Renata, Sérgio, Manuela, Fábio, Veronique e Laura.

Muito Obrigada.

ABREVIATURA	
NOMENCLATURA	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Biomateriais e Biocompatibilidade	
2.1.1. Polietileno	9
2.1.2. Poli – metil metacrilato	9
2.2. Adsorção de Proteínas em superficies sólidas	
2.2.1. Variações das Interações de Proteinas Adsorvidas	
2.2.2 – O Modelo da Monocamada.	
2.2.3 - Influência das Propriedades do Meio sobre o Processo de Adsorção	14
2.2.4 – Efeito das Propriedades das Superficies	
2.3. Coagulação Sangüínea	
2.4. Aumento da hemocompatibilidade – heparina	
2.5 – Análise da Adsorção de Proteínas em Interfaces	
2.5.1 – Espectroscopia FTIR/ATR	21
2.5.2. Medidas de Ângulo de Contato	
2.5.3 - Eletroforese Capilar	
CAPÍTULO 3	
Materiais e Métodos	
3.1. Materiais	
3.1.1. Biomateriais	
3.1.2. Proteínas e Tampão	
3.1.2.1. Preparo das soluções de Proteínas	
3.1.3 - Recobrimento	
3.2. Métodos	
3.2.1. Adsorção das Proteínas	
3.2.2. Espectroscopia FTIR-ATR	
3.2.3. Determinação Quantitativa da adsorção de proteínas	
3.2.3.1. Eletroforese Capilar	
3.2.4. Recobrimento dos Biomateriais	
3.2.5. Medidas do ângulo de Contato	
CAPITULO 4	
Resultados e Discussão	
4.1. Espectroscopia FTIR/ATR	

í

4.2. Determinação Quantitativa da Adsorção das Proteínas	
4.2.1. Isotermas de Adsorção de Lisozima	
4.2.2. Isotermas de Adsorção de Imunoglobulina G	
4.2.3. Isotermas de Adsorção de Fibrinogênio	
4.2.4 - Isotermas de Adsorção de HSA	
4.3. Biomateriais Recobertos	
4.4. Medidas do ângulo de Contato	
CAPÍTULO 5	
Conclusão e Sugestões Para Próximos Trabalhos	
5.1. Conclusão	
5.2. Sugestões para próximos trabalhos	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXO	

ABREVIATURA

- ATR Reflectância Total Atenuada
- FTIR Infravermelho com Transformada de Fourier
- Hfg Fibrinogênio de soro humano
- HSA Albumina de soro humano
- IgG Imunoglobulina G
- IRE Elemento de reflexão interna
- PE Polietileno
- PMMA poli (metil metacrilato)

NOMENCLATURA

- q = quantidade de proteína adsorvida por unidade de área
- qm = quantidade de proteína adsorvida por unidade de área na monocamada
- Kd = constante de equilíbrio de adsorção
- C* = Concentração de equilíbro de proteína em solução
- d_p = distância de penetração da radiação
- d_e = caminho ótico efetivo
- ε = absortividade molar da proteína
- N = número de reflexões internas
- A = área da banda de absorção
- C_b = concentração de equilíbrio de proteína em solução
- Γ = concentração superficial

RESUMO

O estudo quantitativo do fenômeno da adsorção de proteínas na superficie de biomateriais é de grande importância, uma vez que a adsorção de proteínas plasmáticas é um dos primeiros eventos que ocorre quando um biomaterial entra em contato com o sangue, seja em dispositivos intracorpóreos ou em dispositivos extracorpóreos. O desempenho de materiais sintéticos em contato com o sangue dependerá, principalmente, da camada de proteína adsorvida, porque é esta camada a mediadora das interações entre os biomateriais e os componentes do sistema biológico.

O método que utiliza proteínas radiomarcadas tem sido o mais utilizado, no entanto, este método apresenta limitações como alto custo, cuidados de manipulação, fornecimento de grande quantidade de resíduo radioativo e modificação da estrutura da proteína, alterando suas características de adsorção. Com o intuito de minimizar as limitações apresentadas acima, o presente trabalho se inseriu na busca da implantação no laboratório uma técnica já utilizada por diversos grupos de pesquisa para a quantificação de proteínas. A técnica implantada foi a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada à técnica de Refletância. Este método apresenta como vantagens a simplicidade do procedimento de medidas e a análise direta da proteína adsorvida na superfície, entre outras.

O objetivo do presente trabalho reside na determinação quantitativa de parâmetros que desempenham papel importante na adsorção de proteínas em superficies. As proteínas utilizadas na presente contribuição foram a lisozima, o fibrinogênio (Hfg), a imunoglobulina G (IgG) e a albumina (HSA) do soro humano na superfície de polietileno (PE) e polimetil metacrilato (PMMA). Foram determinadas isotermas de adsorção, as quais foram ajustadas pelo modelo de Langmuir, sendo determinada a quantidade máxima adsorvida (q_m) para cada sistema. Os resultados indicaram a possível predominância de interações hidrofóbicas entre as proteínas e os biomateriais, exceto no caso de HSA, no qual podem estar ocorrendo ligações de hidrogênio entre a HSA e o PMMA. Para os materiais estudados, observou-se uma maior quantidade de IgG adsorvida e menor quantidade de HSA. A partir dos valores de q_m foram calculadas a espessura da camada de proteína e a área média por molécula que indicaram a adsorção das moléculas de proteínas em diferentes configurações.

ABSTRACT

The quantitative study of protein adsorption phenomenon on biomaterials surface is of great importance, since the adsorption of plasma proteins is one of the first events that happens when a biomaterial enters in contact with blood, either intracorporeal or in extracorporeal devices. The layer of adsorbed protein mediates the interactions between biomaterials and the components of biological system, therefore the preformance of synthetic materials in contact with blood will depend, mainly, of adsorbed layer.

Radiolabing method has been the most used, however this method presents limitations as high cost, manipulation cares, obtaining of great amount of radioactive residue and modification of the protein structure, altering its adsorption characteristics. In order to minimize the limitations presented above, the present work has searched for the implantation of a method that has already been used by several research goups for protein quantification. The implanted technique was the Fourier Transform infrared Spectroscopy coupled with Attenuated Total Reflectance. This method presents as advantages, among others, the simplicity of measurements procedure and the direct analysis of protein adsorbed on the surface.

The objective of the present work is quantitative determination of important parameters that play important role in protein adsorption phenomenon on surfaces. The proteins used were lysozyme, fibrinogen (Hfg), immunoglobulin G (IgG) and albumin (HSA) from human serum on polyethilene (PE) and Poly(methyl metacrilate) (PMMA) surfaces. The adsorption isotherms determined were adjusted by Langmuir model and the maximum amount of adsorbed protein (qm) for each system was calculated. The results indicated the possible prevalence of hydrophobic interactions between proteins and biomaterials, except in the case of HSA, in it can be happening hydrogen binding between HSA and PMMA. For the studied materials, it was observed a larger amount of adsorbed IgG and smaller amount of adsorbed HSA. The thickness of protein layer and the medium area per molecule were calculated from q_m , which indicated the adsorption of proteins molecules in different configurations.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Biomateriais são substâncias que estão contidas em sistemas terapêuticos e de diagnósticos que entram em contato com fluidos biológicos e tecidos. A utilização clínica de equipamentos em contato com o sangue tem sido intensificada, estima-se que a comercialização anual destes equipamentos nos Estados Unidos seja de cerca de 24 bilhões de dólares (Peppas e Langer, 1994). Na Tabela 1.1 estão listados alguns sistemas biológicos de grande interesse para a obtenção de informações relacionadas com a adsorção de proteínas (Horbett, 1982). Com a utilização destes materiais ocorre, em algumas situações, interações adversas entre a superfície de materiais e componentes do sangue que em geral levam à formação de coágulos, os quais podem obstruir a circulação sangüínea ocasionando sérias lesões e até mesmo a morte. O processo de formação de coágulos sangüíneos é precedido pela adesão e ativação de plaquetas, que por sua vez é precedida pela adsorção de proteínas do sangue na superfície do biomaterial. As interações entre biomateriais e proteínas ocorrem devido à grande diversidade de características superficiais apresentadas pelas proteínas (Rosa *et al.*, 1998).

Tabela 1.1 – Variedade de processos biológicos com atuação importante dos fenômenos de adsorção de proteínas em interfaces sólidas.

- Biocompatibilidade de polímeros sintéticos
- Reações a corpos estranhos em implantes de tecidos
- Opacificação de lentes de contato
- Coagulação do sangue
- Ativação de plaquetas pelo colágeno e outra proteínas
- Trombose em catéteres, artérias e em válvulas coronárias
- Imunologia
- Ligação de anticorpos a células estranhas

Pesquisas nessas linhas de atuação facilitarão a utilização de novos materiais, bem como a otimização de dispositivos utilizados em processos onde fluidos biológicos interagem com superfícies sólidas. O desenvolvimento de materiais hemocompatíveis visando interações adequadas com proteínas é, portanto, de fundamental importância,

Apesar da grande relevância do assunto, muitas questões envolvendo a adsorção de proteínas permanecem sem resposta, principalmente devido à falta de conhecimentos básicos envolvendo proteínas em interfaces (Horbett, 1982).

Algumas destas questões são:

- Por que certas proteínas estão presentes em interfaces enquanto outras não?
- Quais as propriedades das proteínas que regulam sua localização em interfaces?
- Por que as proteínas em interfaces são mais susceptíveis a modificações do que aquelas em solução?
- Como estabelecer relações quantitativas entre as proteínas adsorvidas e as propriedades das superfícies?

A dificuldade em se desenvolver materiais aceitáveis para o uso em contato com tecidos reflete a natureza complexa das interações entre os materiais e proteínas, que são influenciadas pelas propriedades das proteínas, do material e pelo transporte de fluidos ao redor do implante. A complexidade destas interações se deve ao fato de que os fluidos, como soro e lágrima, são soluções com multicomponentes constituídas de uma variedade de proteínas complexas (a maioria não apresenta estruturas tridimensionais conhecidas), as quais interagem com a superfície do material de uma maneira competitiva e também interagem entre si tanto na superfície como em solução. Além disso, as propriedades químicas da superfície de uma proteína não são uniformes, mesmo no caso de proteínas menos complexas, existem diferentes pontos, cada qual com um potencial de interação diferente para superfícies de materiais específicas. A Figura 1.1 apresenta um espectro de complexidade no estudo de adsorção de proteínas, incluindo a variação da complexidade de proteínas e de superfícies ou interfaces(Andrade e Hadly, 1987).



Figura 1.1 – Matriz de complexidade de adsorção de proteínas. A extremidade superior esquerda representa sistemas simples e a inferior direita mostra sistemas altamente complexos. PDMSO – poli (dimetil siloxano), PMMA – poli (metil metacrilato), PHEMA – poli (2-hidroxi metil metacrilato), IgG – Imunoglobulina G, IgM – Imunoglobulina M.

Um número considerável de estudos de adsorção de proteínas objetiva a determinação da quantidade de proteína adsorvida em uma unidade de área a uma dada concentração desta proteína em solução (C). A determinação de isotermas de adsorção (função Γ (C), onde Γ é a massa de proteína adsorvida por unidade de área) permite o desenvolvimento de um modelo teórico adequado para a predição do comportamento interfacial das proteínas. A interpretação de isotermas envolve algumas considerações, por exemplo, o platô da isoterma é freqüentemente interpretado como a indicação de que a superfície está saturada com uma monocamada de moléculas de proteínas adsorvidas ou a inclinação inicial da isoterma é usada para estimar a afinidade de proteína por uma determinada superficie (Hadly, 1996). Além das determinações quantitativas possibilitarem o estudo do comportamento interfacial de proteínas, a quantidade de proteína adsorvida está relacionada a biocompatibilidade, uma vez que a adsorção pode ser benéfica para o desempenho do biomaterial dependendo do tipo e da quantidade das proteínas adsorvidas na interface sólido-líquido (Santin *et al.*, 1997). Desta forma, o presente estudo se insere na busca de determinações quantitativas do fenômeno de adsorção de algumas proteínas existentes no sangue como o fibrinogênio, a imunoglobulina G e albumina na superficie de materiais poliméricos como o polietileno e o poli(metil metacrilato). Estas proteínas foram escolhidas uma vez que a maioria dos estudos de adsorção de proteínas estão restritos a estas três proteína devido às seguintes propriedades:

- A albumina é a proteína em maior concnetração no plasma humano, representando 60% das proteínas totais no plasma. Esta proteína é responsável pelo controle da pressão osmótica e pelo transporte de ácidos graxos livres no sangue.
- A imunoglobulina G participa do mecanismo de defesa do organismo (sistema imunológico).
- O fibrinogênio, quando transformado em filamentos de fibrina, participa da cascata de coagulação sangüínea.

O objetivo do presente trabalho é a determinação quantitativa das proteínas na superficie dos polímeros através da técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada à Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) utilizando tratamento matemático desenvolvido por Sperline e colaboradores (1987), o qual permite a determinação da concentração superficial, e também através de um fator de correlação determinado através do método proposto por Rosa e colaboradores (1998) que é baseado na adsorção das proteínas na superficie de biomateriais seguido de lavagem das partículas sólidas, eluição das proteínas adsorvidas e posterior análise da solução proveniente da solução de eluição através de eletroforese capilar operando em zona livre. Os resultados serão apresentados na forma de gráficos que relacionam a quantidade de proteína adsorvida em função da concentração da solução que entrou em contato com a superfície, atingindo um equilíbrio termodinâmico

(isotermas de adsorção). Objetiva-se também analisar, em função da quantidade máxima adsorvida, alguns aspectos dimensionais tais como a espessura da camada adsorvida e a área média por molécula. Estas determinações também serão realizadas para a superfície de PE recoberta com heparina, a fim de se investigar a influência do recobrimento na adsorção das proteínas.

As interações entre as proteínas e os biomateriais também serão investigadas através de medidas de ângulo de contato dinâmico. Ângulos de avanço e de retrocesso serão determinados para os materiais sem proteína e com proteína adsorvida através do método de Wilhelmy, que é um método de medida da tensão superficial que utiliza retirada de uma placa na interface gás-líquido.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão da bibliográfica relativa ao estudo da adsorção de proteínas na superfície de biomateriais poliméricos foi dividida em cinco tópicos: biomateriais e biocompatibilidade, adsorção de proteínas, coagulação sangüínea, aumento da hemocompatibilidade, e técnicas de análise para o estudo de bioprodutos em superfícies.

Neste capítulo serão apresentados os conhecimentos básicos necessários à compreensão e elaboração do trabalho realizado.

2.1. Biomateriais e Biocompatibilidade

O conceito de biomateriais adotado pela NIH Consensus Development Conference de 1982 é o seguinte "biomaterial é qualquer substância exceto drogas, ou combinação de substâncias de natureza sintética ou natural que pode ser usada por qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema que trata, restaura ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo" (Malmonge, 1997).

Os biomateriais podem ser de origem natural, como o colágeno purificado, fibras de proteínas (seda, lã e pêlo), polissacarídeos (algodão e material celulósico) e tecidos tratados; e de origem sintética como os metais, cerâmicas e polímeros, que são freqüentemente denominados materiais biomédicos para se diferenciarem dos biomateriais naturais.

Os primeiros relatos do uso de biomateriais, a cerca de 4000 anos, trataram de suturas para reparo de feridas. A literatura antiga indiana, de cerca de 2500 anos, descreve o uso de pêlo, couro, algodão, tecido animal e casca de árvore como materiais de suturas. O uso de suturas de fios de ouro em 1550 foi a primeira aplicação registrada de um material biomédico que foi seguido pelo crescente uso de placas de metal e pinos para o reparo de ossos fraturados (Lyman e Rowland, 1989).

Avanços recentes na ciência de materiais e cirurgia tornaram possível a reconstrução de muitas partes do corpo humano. A indústria de polímeros sintéticos vem crescendo e torna disponíveis materiais poliméricos com um vasto espectro de propriedades. Alguns polímeros apresentam propriedades mecânicas semelhantes às propriedades dos tecidos naturais, o que os tornam adequados ao uso como materiais biomédicos.

Desde os anos 50, os polímeros têm sido amplamente usados em aplicações médicas. Estes materiais podem ser aplicados em substituições permanentes de órgãos e tecidos defeituosos, como suportes temporários a órgãos defeituosos ou normais, em armazenamento e purificação de sangue e para controle de liberação de drogas (Ikada, 1994). O FDA e a ISO classificam os biomateriais de acordo com o tipo de contato (externo, superficial e implantáveis) e tempo de contato (menor que 24 horas, entre 24 horas e 30 dias e maior que 30 dias). Algumas aplicações dos biomateriais são as seguintes (Lyman e Rowland, 1989):

Dispositivos Intracorpóreos

suturas adesivos pinos poliméricos intermedulares chapas de osso de compósitos polímero-fibra tendões redes de reforço válvulas do coração reconstrução de juntas e cimento de osso enxertos vasculares drenos hidrocefálicos próteses do esôfago segmentos da uretra segmentos gastrointestinais materiais para reposição de tecidos para reconstrução cosmética interoculares implantes para liberação de drogas

- dispositivos complexos que simulam processos fisiológicos: pâncreas artificial/ sistema de liberação de insulina coração artificial
- Dispositivos paracorpóreos ou extracorpóreos:

catéteres oxigenadores dializadores dispositivos para plasmaferese e hemoconcentração bolsas de sangue recipientes farmacêuticos tubos seringas instrumentos cirúrgicos materiais de embalagens estéreis e não-estéreis

Os polímeros usados nos dispositivos acima são essencialmente sintéticos, e o PVC (policloreto de vinila) figura como o material mais extensivamente usado para aplicações de curta duração, como catéteres, equipamentos de circulação extracorpórea do sangue e bolsas de sangue. Por outro lado, derivados de celulose, poliésteres, poliamidas e polisulfonas são utilizados como membranas de diálise. Válvulas cardíacas comercialmente disponíveis são baseadas principalmente no DRACON (polietileno tereftalato) e no TEFLON (polietraflúor etileno).

Os materiais biomédicos devem ser biocompatíveis para realizarem suas funções sem provocar reações adversas num sistema biológico (Kulik e Ikada, 1996). A biocompatibilidade implica em uma série de características do biomaterial que incluem: não destruir ou sensibilizar elementos celulares do sangue, não desnaturar as proteínas plasmáticas, não causar respostas imunes diversas, não induzir à carcinogenicidade ou mutagenicidade, não produzir reações tóxicas ou alérgicas, não dizimar eletrólitos, não ser adversamente afetado pela esterilização, apresentar estabilidade no ambiente fisiológico e não provocar calcificação (Pinto *et al.*, 1993).

Torna-se essencial, portanto, que os polímeros utilizados sejam biocompatíveis com o sistema biológico no qual estão inseridos. Uma vez em contato com o sangue e fluidos corporais, o material polimérico não poderá liberar substâncias, tais como plastificantes, que possam ser consideradas tóxicas, carcinogênicas, ativadoras da coagulação sangüínea e promotoras de respostas inflamatórias.

2.1.1. Polietileno

O polietileno é um dos materiais mais aplicados na área médica devido ao seu baixo custo. As aplicações do polietileno na área médica são as seguintes: catéteres, filmes, tubos, conectores, frascos, implantes de cirurgia plástica, drenos de oxigênio, materiais de embalagens (Halpern e Tong, 1989) e liberação controlada de drogas oftalmológicas (Dumitru, 1991).

2.1.2. Poli – metil metacrilato

Devido à alta dureza do poli (metil metacrilato) (PMMA), ele tende a ser usado como um objeto moldado. A facilidade de modelagem, de formação, de estruturação e de polimento, fizeram com que o PMMA se tornasse adequado para a construção de dispositivos biomédicos. Os metacrilatos têm sido usados para a fabricação de dentaduras, dentes artificiais, bases de dentaduras e materiais de obturação. No mercado ortodôntico, os polímeros metacrilatos são usados como resinas vedadoras de covas e fissuras, as quais são pintadas sobres os dentes funcionando como uma barreira à formação de cáries. Agentes de obturação dental com alta capacidade de adesão são preparados misturando-se ésteres metacrilatos específicos (com viscosidade adequada) com poli-metil metacrilato em pó (Kine e Novak, 1990).

O poli (metil metacrilato) tem sido também utilizado em massas para cimento de ossos, próteses de ossos, substitutos de ossos cranianos, lentes intraoculares e membranas para diálise e ultrafiltração (Halpern e Tong, 1989).

2.2. Adsorção de Proteínas em superfícies sólidas

A adsorção de proteínas de um fluido biológico em uma superfície sólida é um problema de interesse em vários processos biológicos, médicos e tecnológicos. Este fenômeno é um dos primeiros eventos que ocorre quando materiais sintéticos são colocados em contato com um sistema biológico. Em cerca de menos de 1 segundo após o implante de biomateriais, proteínas já são observadas nas superfícies dos mesmos. Em questão de minutos, uma monocamada de proteína adsorve na maioria das superfícies. Portanto, a performance desses materiais dependerá primeiramente da camada de proteína adsorvida, pois esta camada de proteína interage diretamente com os componentes do sistema biológico (Pérez-Luna *et al.,* 1994). As células entram em contato com a camada de proteína ao invés da superfície do biomaterial, como essas células respondem especificamente a proteínas, a formação do filme interfacial de proteína pode ser o evento que controla posteriores biorreações a implantes.

A adsorção de proteínas em biomateriais localizados na corrente sangüínea ocorre sob condições que são complexas, visto que o plasma contém várias proteínas diferentes. Além disso, cada proteína está presente no plasma em uma concentração característica. Quatro princípios são importantes na compreensão dos eventos de adsorção que ocorrem neste complexo ambiente (Horbett, 1993):

- as variações das interações de proteínas adsorvidas;
- a formação de monocamada de adsorção;
- as forças motrizes no sangue que determinam a composição da camada de proteína adsorvida (a atividade de superfície intrínseca de cada proteína do plasma e sua concentração no plasma); e
- a contribuição das propriedades da superfície para a adsorção seletiva

2.2.1. Variações das Interações de Proteínas Adsorvidas

A importância das proteínas na ciência de biomateriais resulta principalmente da tendência inerente que elas têm de se depositarem em superfícies como um adsorvato fortemente ligado, e da forte influência que estes depósitos têm nas interações subseqüentes entre as células e as superfícies. Acredita-se que as propriedades particulares das superfícies

juntamente com as propriedades específicas das proteínas determinam a organização da camada de proteína adsorvida, e que a natureza desta camada por sua vez, determina a resposta celular às superfícies adsorvidas. Como as respostas celulares determinam o grau de biocompatibilidade do material, é necessário que se entenda as propriedades das proteínas e seu comportamento em interfaces. A Figura 2.1 ilustra a interação de uma célula com uma proteína adsorvida num substrato sólido (Horbett *et al.*, 1996).



Figura 2.1 – Interação da célula com uma camada de proteína adsorvida num substrato sólido. A célula é mostrada como um espaço circular delimitado por uma membrana de bicamada na qual os receptores de adesão estão parcialmente embutidos. As proteínas no fluido extracelular estão representadas por triângulos e quadrados e as proteínas de adesão são representadas por círculos.

Um dos efeitos indesejáveis no uso de materiais poliméricos que entram em contato com o sangue é a formação de trombos na interface polímero-sangue, devido à ativação do sistema plaquetário e posterior adesão de plaquetas na superfície do biomaterial (Young *et al.*, 1988). Proteínas que são adsorvidas em superfícies sólidas podem sofrer alguma mudança conformacional devido a sua estabilidade estrutural relativamente baixa e a sua tendência ao desdobramento, permitindo uma posterior fixação à superfície (Horbett, 1993). Muita atenção tem sido dada às prováveis mudanças conformacionais das proteínas adsorvidas com relação a sua atividade biológica, por exemplo, as mudanças conformacionais do fibrinogênio adsorvido em superfícies sólidas é tida como responsável pela adesão e ativação de plaquetas à superfície, enquanto o fibrinogênio no seio do fluido não interage com as plaquetas nas mesmas condições (Lu e Park, 1991).

As proteínas, portanto, podem ser o suporte para a formação de trombose em superfícies implantadas, através de interações com plaquetas ou através do envolvimento de proteínas da cascata intrínseca de coagulação.

A sensibilidade das interações plaquetas-superfícies a proteínas adsorvidas é devida fundamentalmente à presença de receptores de adsorção na membrana da plaqueta que se ligam a certas proteínas do plasma. A adesão seletiva destas proteínas a superfícies sintéticas, em competição com as muitas proteínas para as quais a plaqueta não apresenta receptores de adesão, que também tendem a adsorver, intercede a interação de plaquetas com estas superfícies. Entretanto, as proteínas que se ligam aos receptores dissolvidas no plasma não se ligam aos mesmos a menos que as plaquetas sejam estimuladas, ao passo que plaquetas nãoestimuladas podem se aderir a proteínas adesivas adsorvidas, como foi mencionado anteriormente, devido a mudanças conformacionais sofridas pelas proteínas adsorvidas. Assim, parece que a adsorção de proteínas a superfícies acentua e regula a interação receptorde- adesão e proteína. Não somente as mudanças conformacionais das proteínas na superfície acentuam esta interação, como também o efeito da maior concentração das proteínas na superfície (Horbett, 1993).

2.2.2 – O Modelo da Monocamada

No fim da década de 60 foi iniciado um trabalho pioneiro na busca de informações relacionadas à interação de proteínas do sangue com superficies hidrofóbicas não carregadas (Brash e Lyman, 1969). Nesta ocasião, observou-se que, em condições estáticas, as proteínas tenderam a ser rapidamente adsorvidas em uma monocamada. A mesma observação foi feita por Young e colaboradores (1988), e a aproximação do modelo clássico de Langmuir foi utilizado para ajustar dados de adsorção de proteínas. A isoterma de Langmuir (Figura 2.2) é dada por:

$$q^* = (q_m C^*) / (K_d + C^*) \tag{2.1}$$

Onde : q* = quantidade de proteína adsorvida por unidade de área qm = quantidade de proteína adsorvida por unidade de área na monocamada

- Kd = constante de equilíbrio de adsorção
- C* = concentração de equilíbrio de proteína em solução



Figura 2.2 – (a) Isoterma de Langmuir. (b) Vista em escala molecular da monocamada de proteína adsorvida.

A curva de q* versus C* origina uma curva que cresce monotonicamente com o aumento da concentração de proteína no seio do fluido, até que um platô seja alcançado. A concentração atingida pelo platô é referente à concentração da monocamada.

A constante Kd é dada pela equação:

$$K_{d} = \frac{K_{dessorção}}{K_{adsorcão}}$$
(2.2)

Observa-se que quanto maior for o K_d menor será a interação entre as espécies adsorvidas e a as superfícies. O K_d pode ser calculado pela linearização da eq. 2.1, na forma:

$$\frac{1}{q} = \frac{K_d}{q_m} \frac{1}{C^*} + \frac{1}{q_m}$$
(2.3)

O K_d também pode ser calculado na forma não-linearizada da eq. 2.1 através de um algoritmo em computador.

Existem algumas limitações acerca do uso do conceito de monocamada. A primeira é referente à própria equação de Langmuir, que é deduzida, no caso ideal, para a adsorção de gases em sólidos (Langmuir, 1918). Segundo, a área superficial real disponível para que a adsorção aconteça não é conhecida, pois a superficie do material geralmente não é regular. Terceiro a orientação da proteína também não é conhecida. Outra restrição do modelo que provavelmente seja ferida é que o modelo não considera interações laterais entre as moléculas adsorvidas, principalmente para altos valores de q*. Apesar de todas essas limitações, o modelo da monocamada parece ajustar muito bem dados de adsorção, além de apresentar valores muito próximos aos valores de monocamadas esperados (Horbett, 1993).

2.2.3 - Influência das Propriedades do Meio sobre o Processo de Adsorção

As propriedades do meio, como pH, temperatura e força iônica são fatores determinantes em qualquer sistema biológico. Para o caso das proteínas do sangue a singularidade estrutural de uma proteína geralmente só se aplica sob condições aproximadamente fisiológicas, isto é, em temperaturas em torno de 37°C, pHs variando de 5 a 8 e em soluções aquosas com concentração de sal em torno de 0.15 M. Fora destas condições, as proteínas estão sujeitas ao fenômeno da desnaturação, o que significa que as proteínas perdem sua estrutura. Elas perdem sua natureza ordenada na qual ocorre a localização preferencial de resíduos polares na superfície e resíduos apolares no interior da molécula.

Assim, dependendo do material, com o maior número de resíduos hidrofóbicos de aminoácidos expostos, a proteína desnaturada é capaz de formar mais ligações com a superfície do material do que as proteínas nativas (Horbett *et al.*, 1996).

2.2.4 – Efeito das Propriedades das Superfícies

As propriedades das superficies que mantém o contato com fluidos corporais são de grande importância no estudo da interação polímero-proteínas. A compatibilidade de dispositivos médicos não depende somente das propriedades físico-químicas dos biomateriais, mas de diversos fatores, como a fabricação, o projeto do dispositivo, o estado do paciente e as condições de uso. Porém, em muitos casos só são possíveis métodos para aumentar a biocompatibilidade através de mudanças nas propriedades físico-químicas dos biomateriais listadas abaixo (Sevastinov, 1991):

- composição da superfície (polar/apolar, acido/base, ponte de hidrogênio, cargas iônicas, biomoléculas imobilizadas);
- movimentos moleculares de superfície (extremidades de cadeias poliméricas, anéis e sua flexibilidade);
- topografia da superficie (aspereza, porosidade, imperfeições e microbolhas de gás);
- domínios (distribuições e tamanhos);
- tendência à biodegradação, erosão ou corrosão; e
- estrutura cristalina/amorfa da superfície.

Nota-se que as propriedades físico-químicas dos biomateriais afetam os parâmetros energéticos da superfície. Isto explica porque a maioria das hipóteses que consideram os mecanismos da interação de polímeros com o sangue, especialmente com proteínas, analisa a influência das características de energia da superfície em sua hemocompatibilidade. Portanto, na investigação de materiais biocompatíveis, têm sido feitas tentativas de se estabelecer relações entre as propriedades energéticas do material e suas características de adsorção e compatibilidade.

Estudos realizados neste sentido permitem estabelecer alguns critérios com relação a hidrofobia ou hidrofilia do material. No estudo da adsorção de BSA (albumina bovina) em

PVC (poli-cloreto de vinila), PVDF (poli-fluoreto de vinilideno), PMMA (poli-metil metacrilato) e PEG (poli-etileno glicol), demonstrou-se que a natureza hidrofóbica do PVC e do PVDF favoreceu a adsorção da proteína, enquanto que o PEG, de natureza hidrofílica, não tornou propícia a adsorção (van Straaten e Peppas, 1991). Tal fato foi verificado para vários outros polímeros com relação à adsorção de fibrinogênio (Lu e Park, 1991) e γ-globulina (Kondo *et al.*, 1991).

Várias hipóteses e teorias foram propostas durante os últimos 35 anos. Alguns pesquisadores dão suporte à teoria hidrofóbica. Zisman considera que o material com tensão superficial crítica mínima será biocompatível (Zisman, 1964). Segundo Nyilas e colaboradores a trombogenicidade aumenta com o aumento da contribuição polar da energia livre (γ^{P}) de superficie (Nyilas *et al.*, 1975). Segundo Kaelble e colaboradores (Kaelble *et al.*, 1977) um material com um alto componente dispersivo de energia de superfície e um baixo componente polar, que é o caso de materiais hidrofóbicos, são mais compatíveis que aqueles com um baixo componente dispersivo de energia de superfície pela proteína, o que seria um efeito de passivação (Sevastinov, 1991).

Outros pesquisadores dão suporte à teoria hidrofilica da hemocompatibilidade. Lyman e colaboradores consideram que a biocompatibilidade do biomaterial aumenta com o aumento da energia de superfície (Lyman *et al.*, 1965). Andrade considera que um material biocompatível deve apresentar energia livre interfacial mínima (Andrade, 1973). Segundo Ruckenstein e Gourisankar, superfícies com energia livre interfacial mínima serão biocompatíveis se os componentes dispersivo e polar de energia livre de superfície do biomaterial e do sangue forem respectivamente iguais (Ruckenstein e Gourisankar, 1984). Estes grupos dão ênfase a minimização da adsorção de proteínas durante a interação de biomateriais com o sangue, isto é, idealmente materiais biocompatíveis não devem adsover proteínas (Sevastinov, 1991).

Em suma, existem muitas variáveis que afetam a adsorção de proteínas na superfície de materiais sintéticos e os estudos relativos a este fenômeno são algumas vezes contraditórios, fazendo-se necessária a contínua busca de condições ótimas para a biocompatibilidade dos biomateriais. Apesar de que a consideração do efeito de passivação para o aumento da hemocompatibilidade é mais adequada do que a consideração de que nenhum tipo de proteína deve ser adsorvida para que o biomaterial seja biocompatível.

2.3. Coagulação Sangüínea

A cascata de coagulação é uma seqüência de reações bioquímicas catalisadas enzimaticamente que envolve as células do sangue e as proteínas do plasma.

Os dois mecanismos que levam à formação do coágulo são o intrínseco e o extrínseco. O início da formação do trombo em uma área de fluxo de sangue restrito ou em resposta à parede anormal do vaso sem a ocorrência de dano ao tecido é realizado através do mecanismo intrínseco. A iniciação do coágulo de fibrina em resposta ao trauma ao tecido é efetuada pelo mecanismo extrínseco, com a liberação do fator de tecido (presente na superficie de muitas células extravasculares) que age como um cofator na ativação do fator X catalisada pelo fator XIIa. Estes dois mecanismos convergem em um mecanismo final comum que envolve a ativação da protrombina em trombina e a conversão de fibrinogênio, catalisada pela trombina, em filamentos de fibrina. Os mecanismos intrínseco, extrínseco e comum são complexos e envolvem muitas proteínas diferentes (Figura 2.3) (Harfenist e Murray, 1993).

A protrombina é uma alfa₂ globulina instável que pode facilmente se fragmentar em pequenos compostos , um dos quais é a trombina. A trombina é uma enzima protéica com capacidade proteolítica. Age sobre o fibrinogênio removendo dois peptídios de baixo peso molecular de cada molécula de fibrinogênio, formando uma molécula de monômero de fibrina, que tem a capacidade automática de se polimerizar com outras moléculas monômeras de fibrina. Portanto muitos monômeros de fibrina polimerizam-se em cerca de segundos em longos filamentos de fibrina que formam o retículo do coágulo. Nos primeiros estágios dessa polimerização , os monômeros de fibrina ligam-se entre si por fracas pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, nesses estágios, as cadeias de polímeros são fracas e podem ser facilmente desfeitas. Contudo, logo em seguida, outra globulina, o fator estabilizador da fibrina age como uma enzima determinando a formação de pontes covalentes entre os monômeros de fibrina, e também entre as cadeias de polímeros adjacentes. Isto faz com que a rede tridimensional de filamentos de fibrina se fortaleça e se torne resistente. O coágulo é

formado por esta rede de filamentos de fibrina, dispostos em todos as direções, que retêm células sangüíneas, plaquetas e plasma (Guyton, 1977).



Figura 2.3 – Mecanismos da Coagulação sangüínea — São indicados os mecanismo intrínseco e extrínseco. Os eventos descritos abaixo do fator a são designados como o mecanismo comum final, o qual é finalizado com a formação de fibrina reticulada. A linha pontilhada indicam a descoberta de que os complexos de fator de tecido e fator VIIa ativam não somente a fator X no mecanismo extrínseco clássico, mas também o fator IX no mecanismo intrínseco. Além disso, a trombina e o fator Xa retornam e ativam nos dois sítios indicados (linhas tracejadas). PK é a precalicreína, HK é quininogênio e PL são fosfolipídeos.

2.4. AUMENTO DA HEMOCOMPATIBILIDADE – HEPARINA

O principal inibidor da cascata de coagulação é a proteína plasmática antitrombina. Ela é o cofator essencial para a ação da heparina. A heparina é um polissacarídio sulfatado (Figura 2.4) que ocorre naturalmente no organismo. Ela é empregada clinicamente como um anticoagulante.



Figura 2.4 – Estrutura química da heparina. O número de repetições da cadeia varia de 8 a 15 unidades, dependendo da fonte de produção de heparina.

Na ausência de heparina, a antitrombina neutraliza a atividade da trombina através da formação lenta de um complexo 1:1 de enzima e inibidor. Na presença de heparina, a taxa de formação do complexo é aumentada de 2000 a 10000 vezes, e a neutralização da trombina é praticamente instantânea. Isto ocorre principalmente devido a uma alteração conformacional no inibidor provocada pela heparina, a qual torna o sítio ativo da antitrombina mais acessível ao centro de serina da trombina. Além disso, a molécula de heparina é deslocada da antitrombina durante a formação do complexo trombina-antitrombina. Desta forma, a heparina é disponível para se ligar ao inibidor livre e ciclicamente promover subseqüentes séries de interações. Assim, pequenas quantidades de heparina são capazes de acelerar a interação de grandes quantidades de trombina. Este mecanismo, além de inibir a trombina, também neutraliza as proteases séricas da cascata de coagulação, os Fatores IXa, Xa, XIa e XIIa. A formação do complexo enzima-inibidor na presença ou não de heparina é dependente do centro ativo de serina da trombina. Se este resíduo for bloqueado, a interação entre a trombina e antitrombina (Pasche *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, o uso de heparina biologicamente ativa ligada a superfícies artificias tem se mostrado como uma técnica promissora para o aumento da hemocompatibilidade. Gott (1963) observou que superfícies heparinizadas possuíam boas características não trombogênicas. Desde então, a heparinização de superfícies se tornou uma estratégia para melhorar a hemocompatibilidade (Barbucci e Magnani, 1994).

A tromborresistência de tais materiais heparinizados deve-se principalmente à interação entre as moléculas de heparina ligadas à superfície e a antitrombina do plasma. As moléculas de antitrombina, quando ligadas à heparina imobilizada, são inibidores da coagulação eficientes e de ação rápida (Soff e Rosenberg, 1993).

A ligação de heparina a polímeros sintéticos pode ser feita através de vários métodos. A Figura 2.5 ilustra alguns destes métodos (Hoffman, 1987).



Figura 2.5 – Métodos para a ligação de heparina sobre superfícies poliméricas: grupos carregados positivamente; heparina; espaçadores; cadeias hidrofóbicas; albumina. a) heparina ligada ionicamente sobre superfícies carregadas positivamente; b) ligação cruzada de heparina sobre a superfície; c) heparina ligada covalentemente à superfície; d) imobilização de heparina com espaçadores; e) heparina ligada à superfície através de interações hidrofóbicas; f) superfície revestida com albumina-heparina.

2.5 – Análise da Adsorção de Proteínas em Interfaces

Vários métodos de análise vêm sendo utilizados na análise quantitativa da adsorção de proteínas do plasma em superfícies sintéticas. O uso de proteínas radiomarcadas tem sido o mais proeminente, mas outros métodos também têm sido usados. Estes métodos são: técnicas de eluição nas quais a solução e as superfícies sólidas são colocadas em contato, o complexo é isolado e as espécies adsorvidas são eluídas e quantificadas; espectroscopia TIRF que utiliza proteínas rotuladas com flúor ou a fluorescência intrínseca da proteína; o uso de antisoros a proteínas específicas; elipsometria; microcalorimetria e métodos de depleção do soluto (Brash e Lyman, 1969; Leininger *et al.*, 1987).

As limitações principais destes métodos são dificuldades em:

- aplicações a misturas de proteínas;
- fornecimento de informações sobre o adsorbato a partir do tempo zero até horas;
- detecção de possíveis modificações na estrutura da proteína efetuadas pela combinação dos processos de adsorção e a natureza da superfície adsorvente;
- resíduos radioativos;
- manipulação, entre outras.

2.5.1 – Espectroscopia FTIR/ATR

A espectroscopia é o estudo das interações da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética pode ser dividida em diferentes regiões que correspondem a diferentes técnicas espectroscópicas (Figura 2.6). A região entre 4000 e 400 cm⁻¹ corresponde à região considerada infravermelho médio onde bandas vibracionais e rotacionais são observadas. Nesta região estão localizadas as bandas de absorção das proteínas (Coleman, 1993).



Figura 2.6 – Espectro Eletromagnético

A espectroscopia de infravermelho tem sido amplamente usada em química orgânica e analítica por muitos anos. A aplicação das técnicas de IR a sistemas biológicos era menos comum e ao longo dos anos encontrou menor sucesso, somente com o desenvolvimento e evolução do espectrofotômetro FTIR esta situação se modificou e o IR se transformou numa ferramenta valiosa para estudos de sistemas biológicos. Os mecanimos de um espectrofotômetro FTIR são realizados em dois componetes básicos: uma bancada ótica e um computador. A bancada ótica mede a intensidade de uma raio IR especialmente codificado após este ter atravessado uma amostra. O sinal resultante, denominado "interferograma", contém informação sobre todas as freqüências presentes no raio. O computador interpreta o interferograma e utiliza um tratamento matemático (Transformada de Fourier - FT) para decifrar as interações que ocorrem quando a luz infravermelha é absorvida por um sistema molecular e, por fim, apresenta o espectro (Gendreau, 1986).

Uma das técnicas de infravermelho mais popular, a espectroscopia ATR, se tornou mais amplamente utilizada após a introdução de sua versão FT. A técnica FTIR-ATR combina o poder da espectroscopia IR com a óptica da reflexão total atenuada. Foram os cálculos teóricos realizados por Simon (1951), seguido por Fahrenfort (1961), que desenvolveram a técnica ATR para a medição de espectros de IR de materiais, os quais não podiam ser obtidos facilmente por medidas convencionais. A partir daí, a ATR vem sendo aplicada a diversos estudos de adsorção a partir de soluções (Hlady, 1996).

Na espectroscopia de reflexão interna a amostra é colocada em contato com um cristal especial denominado elemento de reflexão interna (IRE). O IRE é composto de um material de alto índice de refração, como por exemplo o seleneto de zinco (ZnSe), iodeto de tálio-brometo de tálio (KRS-5) ou germânio (Ge). Nesta técnica a radiação infravermelha é focalizada em uma das extremidades inclinadas do IRE por uma série de espelhos, ela é refletida através do cristal, geralmente inúmeras vezes, e então é direcionada ao detector por outra série de espelhos (Coleman, 1993). O princípio da técnica ATR está ilustrado na Figura 2.7.



Fig. 2.7 - Diagrama esquemático do caminho da radiação infravermelha no acessório ATR.

A refletância total atenuada é baseada no seguinte: a luz infravermelha é focalizada sobre uma das extremidades do IRE. Se o ângulo θ no qual a radiação atinge a interface do IRE e o ar for maior que o ângulo crítico, a luz IR será totalmente refletida internamente no cristal (IRE). O ângulo crítico é calculado da seguinte forma:

$$\theta_{critico} = \operatorname{sen}^{-1} \frac{n_2}{n_1} \tag{2.4}$$

onde: n_1 = índice de refração do IRE e n_2 = índice de refração da amostra

A cada reflexão, um campo elétrico evanescente é criado na interface entre o IRE e a amostra, o qual decresce exponencialmente com a distância de penetração da radiação na amostra (Chittur, 1998). A distância de penetração é definida como a distância a partir da interface IRE-amostra onde a intensidade da onda evanescente decresce 1/e do seu valor original. Esta distância de penetração pode ser calculada usando-se a seguinte equação:

$$dp = \frac{\lambda}{2n_1\pi[\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2]^{1/2}}$$
(2.5)

Onde:

 θ = ângulo de incidência

 $\lambda =$ comprimento de onda da radiação

 $n_1 =$ índice de refração do cristal

 $n_2 =$ índice de refração da amostra

Nas regiões do infravermelho, onde a amostra absorve energia, há interação entre a onda evanescente e a amostra e o espectro é obtido (van Straaten e Peppas, 1991). A distância de penetração varia de acordo com o material que compõe o elemento de reflexão interna (Figuras 2.8), com o ângulo de incidência da radiação (Figura 2.9) e com o número de reflexões internas (Figura 2.10) (Wasacz, 1998).



Figura 2.8 - Variação da distância de penetração com o índice de refração do IRE


Figura 2.9 – Variação da distância de penetração com o ângulo de incidência



Figura 2.10 – Variação da distância de penetração com o número de reflexões internas

À medida que o índice de refração do IRE aumenta, o ângulo de incidência também aumenta e número de reflexões internas diminuem, a distância de penetração diminui, diminuindo a intensidade das bandas.

Como principais vantagens do método podem ser relacionadas as seguintes (Fink e Chittur, 1986):

- Rápida aquisição de dados até 10 espectros por segundo. Dados podem ser obtidos quase que continuamente e os resultados podem ser apresentados num tempo real
- Capacidade de obtenção de dados de sistemas fisiológicos intactos em ambientes aquosos através da subtração do "background".
- Potencial para análise de multi-componentes de espectros complexos.

- Observação de conformação macromolecular através da desconvolução de características espectrais.
- Não requer preparação destrutiva da amostra e permite o estudo de sistemas moleculares sem rompê-los.
- Sensibilidade à superfície.
- Simplicidade do procedimento de medida.

Apesar das vantagens mencionadas acima, na utilização da técnica FTIR/ATR o contato entre a amostra e o IRE deve ser perfeito e a superfície do filme deve ser lisa, homogênea e regular para a obtenção de resultados satisfatórios, devido à grande dificuldade relacionada à reprodutibilidade do método.

A espectroscopia FTIR-ATR vem sendo utilizada por diversos grupos de pesquisadores não somente para o estudo quantitativo de proteínas na superfície de materiais poliméricos como também para o estudo de mudanças conformacionais nas moléculas de proteínas, no intuito de se obter informações sobre o processo de adsorção de proteínas o qual é de grande interesse em sistemas biológicos, como a biocompatibilidade de polímeros sintéticos que envolve a formação de trombos em implantes e até mesmo a opacificação de lentes de contato (Brash e Lyman, 1969; van Straaten e Peppas, 1991; Pitt *et al.*, 1986; Fink *et al.*, 1987; Fu *et al.*, 1993; Jeon *et al.*, 1992; Castillo *et al.*, 1985, 1986; Deng *et al.*, 1986).

O estudo de adsorção de proteínas é realizado pelo grupo Amida (CONH) das proteínas. Este grupo exibe bandas características em 1650 cm⁻¹ (amida I), em 1550 cm⁻¹ (amida II) e em 1300 cm⁻¹ (amida III). A natureza destas vibrações foi elucidada por Miyazawa (1960). No caso da vibração na região amida I , 80% da energia potencial é associada ao estiramento do grupo C=O, 10% ao estiramento C-N e 10% ao dobramento N-H no plano. No caso da vibração amida II, 40% da energia é associada ao estiramento C-N e 60% ao dobramento N-H. a banda amida II é mais utilizada nos estudo de adsorção de proteínas por ser uma banda relativamente insensível a mudanças conformacionais e sofrer menor interferência da banda de absorção de água a 1640 cm⁻¹ (Fu *et al.*, 1993). Na tabela a seguir estão relacionadas informações gerais sobre as bandas espectrais características de espectros de proteínas.

NÚMERO DE ONDA (CM ⁻¹)	FONTE	INFORMAÇÃO
1730 (1740-1710)	Carbonil e Lipidios	Lipidios associados a
		proteínas
1650 (1670-1630)	Amida I	Identificação de proteínas,
		mudanças conformacionais
1550 (1570-1520)	Amida II	Quantificação de proteínas
1450	Cadeias laterais de CH2 da	Identificação de proteínas
	valina, leucina e isoleucina	
1400	Cadeias laterais de	Quantificação de proteínas,
	carboxilatos	sensível ao pH
1361	Componentes de baixo peso	
	molecular do sangue	
1300 (1310-1240)	Complexo Amida III	Identificação de proteínas,
		mudanças conformacionais,
		região primária usada para
		diferenciação de proteínas em
		misturas, informação relativa
		a estrutura secundária
1080 (1080 - 1040)	Grupos funcionais carboidrato	Conteúdo de glicoproteínas
		nas camadas adsorvidas

Tabela 2.1 – Informações gerais sobre espectros de proteínas (Gendrau, 1986).

2.5.2. Medidas de Ângulo de Contato

A base da técnica de ângulo de contato é o equilíbrio que ocorre no ponto de contato na interface sólido/líquido/vapor ou sólido/líquido/líquido.

A medida de ângulo de contato de superficies de materiais poliméricos é um indicativo do grau de hidrofobicidade deste material. Esta medida é um dos métodos mais sensíveis para a obtenção de informações de superficies.

Ueda e colaboradores (1995) propuseram a utilização do método da placa de Wilhelmy para a avaliação qualitativa da interação entre proteínas adsorvidas e materiais poliméricos. O método foi desenvolvido por Andrade e colaboradores e consiste na medida do ângulo de contato dinâmico. A medida de ângulo de contato dinâmico envolve ciclos de medidas dos ângulos de avanço e de retrocesso, que são obtidos respectivamente pela imersão e retirada da placa do material polimérico de uma fase líquida(Andrade, 1985).

No método da placa de Wilhelmy, a tensão superficial é calculada a partir da força sobre a balança e das dimensões da placa, assumindo total molhabilidade da placa, isto é, $\theta = 0^{\circ}$. A equação básica é:

$$F = mg + p\gamma_{b}\cos\theta - F_{b} \tag{2.6}$$

onde: F = força total registrada pela balança, m = massa da placa, g = aceleração da gravidade, p = perímetro da placa, γ_{iv} = tensão superficial do líquido, θ = ângulo de contato e F_b = força de flutuação dada por:

$$F_b = \rho_L V_{\text{imerso}} g = \rho_L ght w \tag{2.7}$$

onde: ρ_L = densidade do líquido, g = aceleração da gravidade, V = volume da placa imersa no líquido e V = htw; w = largura da placa, t = espessura da placa e h = distância de imersão.

Para a interpretação de uma medida de ângulo de ocntato em um sólido deve-se assumir que a tensão superficial do líquido é conhecida. O método da placa de Wilhelmy é um

meio de se medir precisamente a tensão superficial do líquido e o ângulo de contato na interface líquido/sólido/vapor.

As seguintes considerações devem ser obedecidas para que seja possível uma interpretação dos ângulos de contato (Andrade *et al.*, 1985):

- A superfície sólida deve ser rígida, imóvel e não deformável para que os grupos na superfície não possam se reorientar ou se reequilibrar em respostas a mudanças no ambiente (módulo de elasticidade deve ser maior que 3,5 x 10⁵ dyn/cm²)..
- A superficie sólida deve ser altamente lisa, uniforme e homogênea.
- A tensão superficial deve ser conhecida e constante e não deve se modificar durante a realização do experimento.
- A pressão de espalhamento do líquido no sólido deve ser igual a zero. Isto significa que o vapor líquido não deve adsorver sobre a superfície sólida modificando sua energia livre.

Se a força medida na imersão for menor que a medida na emersão, pode-se observar uma histerese no perfil da força versus distância de imersão. A histerese é a diferença entre a medida de ângulo de avanço e a de retrocesso, sendo comum observar esta diferença quando as considerações relacionadas acima não são obedecidas.

Existem duas classes de histerese, a termodinâmica ou real e a cinética. No caso da histerese termodinâmica a curva de histerese é reprodutível ao longo dos ciclos e é independente do tempo ou freqüência. Na histerese cinética a curva se modifica com tempo ou freqüência. A histerese termodinâmica real deve-se à rugosidade da superfície, heterogeneidade, possivelmente à entropia da superfície e à deformação. A histerese cinética deve-se à mobilidade e reorientação da superfície, à penetração do solvente e possivelmente à deformação da superfície (Andrade *et al.*, 1985).

2.5.3 – Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar utilizada para o estudo de adsorção de proteínas na superfície de biomateriais não se trata de uma medida direta na superfície, nesta técnica as proteínas são eluídas das superfícies e a solução proveniente da eluição é analisada. A metodologia baseia-

se nas seguintes etapas: 1) adsorção das proteínas nas superfícies; 2) lavagem das partículas com solução tampão; e 3) eluição das proteínas adsorvidas utilizando-se uma solução de tampão fosfato/dodecil sulfato de sódio.

A eletroforese, migração de solutos através de uma solução sob a influência de um campo elétrico, tem sido a base de métodos de separações bioquímicas desde meados dos anos 30 quando foi descrita por Tiselius pela primeira vez.

A eletroforese capilar foi desenvolvida como técnica no final dos anos 80. Na sua forma mais comumente utilizada, a eletroforese capilar é semelhante ao método desenvolvido por Tiselius, apresentando vantagens como simplicidade inerente, velocidade, versatilidade e baixo custo de corrida. A eletroforese capilar é essencialmente um método analítico e tem aplicação na separação de biopolímeros como peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos, íons metálicos e íons inorgânicos como também na análise de produtos farmacêuticos e monitoramento da qualidade da água (Altria e Bryant, 1997).

Como o nome sugere, uma característica distintiva do método é que as análises são realizadas em um tubo capilar. Na Figura 2.7 é apresentado um esquema da eletroforese capilar. A amostra a ser analisada geralmente é injetada por pressão em uma das extremidades do capilar. Após a injeção da amostra, é estabelecida uma diferença de potencial entre os eletrodos do sistema levando à migração das moléculas no interior do capilar (Rosa *et al.*, 1998).



Figura 2.7 – Esquema da Eletroforese Capilar

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Biomateriais

Os biomateriais utilizados no presente trabalho foram o polietileno (PE) da Polibrasil e poli(metil metacrilato) (PMMA) da Polibrasil. O PE já foi adquirido na forma de filme e os filmes de PMMA foram formados por evaporação do solvente. Partículas do polímero foram dissolvidos em clorofórmio da Merck (Brasil) e a solução foi colocada para secar em placas de Petri. Foram colocados 6 ml de solução polimérica 10% em placas de 8,7 cm de diâmetro para secar à temperatura ambiente.

Foram coletados espectros (100 varreduras) do PE antes de se iniciarem os experimentos para verificar se o mesmo era de alta ou de baixa densidade. Os polietilenos de baixa e de alta densidade se diferenciam pela variação das quantidades das unidades cristalinas e presença de ramificações no polímero. Os espectros coletados foram comparados aos da biblioteca existente no programa de aquisição de espectros e verificou-se que o espectros se igualaram ao espectro de PE de baixa densidade.

$$-(CH_2 - CH_2)_n -$$

Polietileno



Poli (metil metacrilato)

3.1.2. Proteínas e Tampão

A proteína inicialmente utilizada foi a lisozima. Tal proteína foi escolhida por se tratar de uma proteína modelo para estudos em pHEMA que é um material utilizado na fabricação de lentes de contato. Posteriormente foram feitos estudos com fibrinogênio (Hfg), imunoglobulina G (IgG) e albumina de soro humano (HSA). Estas proteínas foram utilizadas, como já foi mencionado anteriormente, por se tratarem de proteínas às quais a maioria dos

estudos estão restritos devido à albumina estar presente em grande quantidade no plasma, o fibrinogênio participar da cascata de coagulação e a IgG participar do mecanismo de defesa do organismo.

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Lisozima de clara de ovo, albumina humana, fibrinogênio humano e imunoglobulina G humana da Sigma (EUA)
- Fosfato de sódio monobásico (Na₂HPO₄) e fosfato de sódio dibásico (NaH₂PO<sub>4.7H₂O) da Ecibra (Brasil)
 </sub>
- Cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl) da Merck (Brasil)

3.1.2.1. Preparo das soluções de Proteínas

Para a preparação das soluções de proteínas foi utilizado um tampão fosfato salino (PBS) de pH 7,4, com composição: 21,6 mM Na₂HPO₄, 4,3 mM NaH₂PO₄,7H₂O, 4 mM KCl, 95,4 mM NaCl), em água deionizada (Milli-Q). Após a dissolução completa dos sais, o tampão foi degaseificado para a retirada de gases dissolvidos em banho ultrasônico, sob vácuo. O pH foi corrigido quando necessário, com soluções de NaOH e HCl com baixas concentrações. O tampão foi utilizado nestas condições de pH e de força iônica por se tratar de condições fisiológicas.

3.1.3 – Recobrimento

Para o recobrimento de PE foi utilizada heparina com cloreto de benzalcônio da marca Sigma (EUA) e álcool isopropílico da Merck (Brasil). Foi utilizada uma solução de 800 UI/ml de heparina e 1,6% de cloreto de cloreto de benzalcônio em álcool isopropílico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Adsorção das Proteínas

Foram preparadas soluções de proteínas com concentrações variando de 0,01 a 0,6 mg/ml em tampão PBS. Filmes dos polímeros de dimensões 0,7 x 6,0 cm foram imersos em

5 ml de solução protéica e mantidos a 37°C, no caso da lisozima por 2 horas e para as demais proteínas por 18 horas. Como não foram obtidas curvas de cinética de adsorção, não sendo determinado portanto, o tempo de equilíbrio, os filmes foram incubados por esse período de tempo porém não pode-se assegurar que o equilíbrio foi atingido. A lisozima foi mantida por um tempo menor em solução por se tratar de uma proteína menor e portanto se difundir mais rapidamente, as demais por se tratarem de proteínas maiores o tempo de adsorção utilizado foi maior.

Após o período de incubação os filmes foram retirados das soluções, enxaguados em solução tampão por 1 minuto e posteriormente em água Millí-Q. Então, os filmes de PE e PMMA foram secos em temperatura ambiente anteriormente à análise das superfícies no espectrofotômetro.

3.2.2. Espectroscopia FTIR-ATR

Técnica FTIR-ATR foi escolhida por ser uma técnica que analisa diretamente a superfície da amostra, além das vantagens mencionadas anteriormente.

Foi usado o espectrofotômetro de infravermelho da marca Nicolet (EUA) modelo Protégé 460, com acessório ATR da marca SepctraTech (EUA) cujo elemento de reflexão interna é composto de Seleneto de Zinco (ZnSe) para obtenção dos espectros dos filmes poliméricos Na Figura 3.1 está apresentado o espectrofotômetro da Nicolet.



Figura 3.1 – Espetrofotômetro Protégé 460 E.S.P.

Foram coletados espectros dos filmes anteriormente à adsorção, os filmes foram posicionados sobre o cristal e o contato entre as amostras e o cristal foi promovida por uma prensa, uma vez que as amostras devem estar em perfeito contato com o cristal para obtenção de resultados satisfatórios. Na Figura 3.2 observa-se o acessório utilizado para o posicionamento da amostra.



Figura 3.2 – Esquema do suporte de amostras

Após a adsorção, enxágüe e secagem dos filmes, estes foram recolocados sobre o cristal e novamente foram obtidos seus espectros. Os espectros foram obtidos com 100 varreduras, resolução de 8 cm⁻¹ na faixa de abrangência de 4000-650 cm⁻¹. Após a obtenção de cada espectro, os cristal foi cuidadosamente limpo com água Milli-Q e acetona.

Os espectros obtidos anteriormente à adsorção (polímero puro) foram subtraídos dos espectros obtidos posteriormente à adsorção (polímero + proteína) para a determinação da quantidade de proteína adsorvida na superfície dos polímeros. A subtração dos espectros foi efetuada no próprio software, sendo que desta maneira, para cada subtração foi determinado, por uma aproximação de quadrados mínimos, um fator de subtração adequado (determinação feita pelo programa do computador).

3.2.3. Determinação Quantitativa da adsorção de proteínas

A determinação quantitativa de lisozima e IgG adsorvidas nas superfícies foi efetuada através do método desenvolvido por Sperline e colaboradores (1987). Este método possibilita a determinação da concentração superfícial (mol/cm²). O método foi desenvolvido para o estudo da adsorção de surfatantes em superfícies. Fu e colaboradores (1993) descrevem uma aproximação para investigar a adsorção quantitativa de proteínas em superfícies baseado no método desenvolvido por Sperline (1987). Este método também foi utilizado com sucesso na determinação quantitativa de BSA (albumina bovina) na superfície de um poli (éter uretano) de grau biomédico (Jeon *et al.*, 1992).

De acordo com este método, a concentração superficial (Γ) é calculada através da seguinte equação (3.1):

$$\Gamma = [d_p(A/N - C_p \epsilon de)]/2000\epsilon de$$
(3.1)

Onde: d_p é a distância de penetração, A é a área integrada da banda Amida II (banda de proteína mais utilizada para quantificação), N é o número de reflexões internas, C_b é a concentração de proteína em solução, ε é a absortividade molar da proteína, e de é o caminho ótico efetivo.

A distância de penetração é definida pela equação (2.2).

O caminho ótico efetivo é calculado da seguinte forma:

$$d_e = \frac{d_{e_{perp}} + d_{e_{paraj}}}{2} \tag{3.2}$$

$$d_{e_{perp}} = \frac{\lambda n_2 n_1 \cos\theta}{\pi (n_1^2 - n_2^2) \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}}$$
(3.3)

$$d_{e_{paral}} = \frac{\lambda \cos\theta n_1 n_2 (2n_1^2 \sin^2\theta - n_2^2)}{\pi [n_1^2 \sin^2\theta - n_2^2]^{1/2} (n_1^2 - n_2^2) [(n_1^2 + n_2^2) \sin^2\theta - n_2^2]}$$
(3.4)

Para o equipamento usado no presente estudo , N = 10 , $\theta = 45^{\circ}$ e $n_1 = 2,4$. No caso dos sistemas em estudo $n_2 = 1,5$ para o PE, $n_2 = 1,49$ para o PMMA (Brandrup, 1975), ε da lisozima é igual a 691.983 L/mol.cm² para a banda Amida II e para IgG ε é igual a 5.398.624 L/mol.cm² (Singh, 1999, comunicação pessoal), estes valores de absortividade molar foram obtidos na região de 1577-1496 cm⁻¹. A banda Amida II tem sido utilizada por diversos grupos para se estimar a adsorção de proteína (Pitt *et al.*, 1986; Chittur *et al.*, 1998; van Straaten e Peppas, 1991; Fu *et al.*, 1993), por se tratar de uma banda que possibilita a quantificação de proteínas (Tabela 2.1 - Gendreau, 1986). O parâmetro C_b da Equação 3.1 foi considerado igual a zero para os sistemas estudados, uma vez que os filmes poliméricos foram removidos da solução de adsorção antes da obtenção dos espectros, não havendo interferência da concentração da solução nos espectros obtidos.

Como não foi possível determinar o coeficiente de absortividade molar para o fibrinogênio e a albumina, foram realizados experimentos em eletroforese capilar para a determinação de um fator de conversão o qual possibilitou a determinação quantitativa de Hfg e HSA na superficie de PMMA e PE.

3.2.3.1. Eletroforese Capilar

Os filmes poliméricos, depois de limpos em água Milli-Q, foram colocados em 1ml da solução protéica (1mg/ml em tampão PBS) e incubados por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação branda. Após a adsorção, os filmes foram submetidos a três ciclos de lavagem em tampão PBS para remoção das proteínas não adsorvidas. Em seguida os filmes foram acondicionados em uma solução de tampão fosfato 50mM pH 2,5 contendo 1% de SDS, para que as proteínas adsorvidas fossem eluídas. Os filmes foram mantidos em contato com esta solução por duas horas à temperatura ambiente, sob agitação branda. As amostras foram então sonicadas em banho ultra-sônico por 5 minutos e aquecidas por 10 minutos a 100 °C (água fervente) e novamente sonicadas por 5 minutos para promover a maior recuperação possível das proteínas.

A análise das proteínas foi realizada por eletroforese capilar operando em zona livre. O equipamento utilizado foi o P/ACE System 5010 da Beckman (EUA) com capilar de sílica fundida com 37 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno. A injeção da amostra foi

feita por pressão (15 segundos), o campo elétrico utilizado foi de 400 V/cm, a temperatura de análise foi de 20 °C, a absorbância foi monitorada a 200 nm e o tampão de corrida utilizado foi o tampão fosfato 150 mM, pH 3,5 contendo 0,1 de SDS.

3.2.4. Recobrimento dos Biomateriais

Inicialmente as superfícies dos filmes de PE foram limpas com álcool isopropílico 70%. Após a limpeza os filmes foram levados à estufa para que fossem secos a 50 °C por 4 horas. Os filmes secos foram imersos em uma solução de revestimento composta de heparina fracionada (concentração de 800 UI/ml), cloreto de benzalcônio (1,6%) e álcool isopropílico e foram mantidos nesta solução por 1 hora a 22 ± 5 °C. Terminado o período de 1 hora, os filmes foram removidos da solução de revestimento, limpos com água deionizada e secos em estufa a 50 °C por 6 horas.

3.2.5. Medidas do ângulo de Contato

Os ângulos de contato de avanço e de retrocesso dos biomateriais em água foram medidos através do método da placa de Wilhelmy (Figura 3.2). O método consiste em se prender uma placa que tenha total molhabilidade a uma eletrobalança que registra a massa desta placa e um recipiente contendo a água é avançada sobre a placa provocando uma diminuição da massa medida. A placa utilizada no presente trabalho foi de platina. Após a medida da tensão da água, as superfícies sólidas de interesse (PE e PMMA) foram presas a eletrobalança e foram assim obtidos gráficos de força versus distância de imersão da amostra (Figura 3.3). A partir destes gráficos foram obtidos os valores do coeficiente linear para os ciclos de avanço e de retrocesso e assim, através da Equação 3.5 foram calculados ângulos de avanço e de retrocesso de PE e PMMA em água e também destes materiais com as proteínas (HSA e lisozima) em água. As medidas de ângulo de contato foram realizadas no tensiômetro Processor Tensiometer K12 da marca Kruss (Alemanha).



Figura 3.2 – Esquema da medida dos ângulos de contato de avanço (a) e de retrocesso (b). As setas representam o sentido do movimento da placa.



Figura 3.3 – Curva de Força x distância com a presença de histerese

Os ângulos de avanço e retrocesso foram calculados através da relação:

$$a = \gamma p \cos \theta \tag{3.5}$$

Onde: a é o coeficiente linear obtido através dos perfis de força versus distância de imersão da placa na fase líquida (Figura 3.3) de onde é feita uma regressão linear para cada um dos ciclos de avanço e de retrocesso, γ é a tensão superficial, p é o perímetro molhado da placa e θ é o ângulo de contato.

Para as medidas de ângulo de contato, a adsorção das proteínas no filmes de PE e PMMA foi realizada num período de 18 horas. Terminada a adsorção, os filmes foram enxaguados com tampão e secos à temperatura ambiente por 1 hora e então foram realizadas as medidas.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo quantitativo de proteínas em superfícies de materiais poliméricos é de grande interesse uma vez que pode ocorrer aumento ou diminuição da biocompatibilidade de um biomaterial de acordo, não somente com o tipo de proteína adsorvida, como também com a quantidade adsorvida. Neste capítulo, estão apresentados os resultados da implantação da técnica FTIR-ATR no laboratório para a quantificação de proteínas nas superfícies de polímeros. Primeiramente são apresentados os espectros de IR a partir dos quais foram determinadas as quantidades adsorvidas, sendo então apresentadas as isotermas de adsorção. Em seguida , as concentrações superfíciais de proteínas em PE recoberto com heparína são comparadas aos resultados obtidos com o polímero sem recobrimento. Por último, são apresentados os resultados das medidas de ângulo de contato.

4.1. Espectroscopia FTIR/ATR

Os resultados de espectroscopia são apresentados na forma de espectros que relacionam a absorbância com o número de onda (cm⁻¹). A Figura 4.1 apresenta espectros de PE coletados antes e após a adsorção de Hfg, juntamente com o espectro obtido da subtração entre ambos (região de 1700-1480 cm⁻¹). Espectros de PMMA e de PE com as demais proteínas são apresentados em anexo. A subtração entre os espectros foi efetuada após a correção das linhas base dos mesmos.



Figura 4.1 – Espectros de PE e Hfg: — branco; — PE + Hfg; — subtração

Como foi mencionado anteriormente, um espectro de IR de uma proteína apresenta dois picos principais, ambos associados à ligação peptídica. O pico maior aparece a 1650 cm⁻¹ (banda amida I), ao passo que um segundo é observado a 1550 cm⁻¹ (banda amida II) (Chittur *et al.*, 1986). No presente trabalho, como pode ser observado na Figura 4.1, as proteínas apresentaram o pico maior localizado em torno de 1655 e 1645 cm⁻¹ e o menor em torno de 1545 cm⁻¹. A banda amida I sofre influência da presença de água, a qual tem uma banda de adsorção a 1640 cm⁻¹. Desta forma, a banda amida II foi selecionada para o cálculo da concentração superficial das proteínas nos materiais, por ser esta uma banda que sofre menor interferência da banda de absorção de água, além de ser relativamente insensível a mudanças conformacionais, como mencionado anteriormente (Fu *et al.*, 1993).

4.2. Determinação Quantitativa da Adsorção das Proteínas

Para se efetuar o cálculo concentração superficial de proteínas adsorvidas através da Equação 3.1, é necessária a determinação da área da banda de absorção da proteína estudada (A). Assim, a área da banda amida II foi calculada a partir dos espectros resultantes da subtração entre os espectros coletados antes e depois da adsorção. Esta área foi integrada tracando-se uma linha base na região de 1577-1496 cm⁻¹, uma vez que os valores das absortividades molares de lisozima e IgG foram obtidas nesta região. Outro parâmetro necessário ao cálculo da concentração superficial é o coeficiente de absortividade molar da proteína (ɛ). No caso do fibrinogênio e HSA não foi possível a determinação deste coeficiente porque não havia disponibilidade no laboratório de um equipamento de FTIR com acessório de transmissão para soluções aquosas, sendo que esta determinação deveria ser realizada em tal equipamento. Os coeficientes para estas proteínas na região estudada também não foram localizados na literatura consultada . Assim, correlacionando-se a técnica FTIR-ATR com eletroforese capilar foi possível a determinação da quantidade adsorvida (µg/cm²) destas duas proteínas nos polímeros. Foram realizados ensaios de adsorção sob as mesmas condições para a análise em eletroforese capilar e em FTIR/ATR. A concentração da solução de adsorção, a temperatura do ensaio e o tempo de adsorção, foram os mesmos para posterior análise em ambas as técnicas. A partir das curvas de calibração de concentração de proteína em função da área dos picos a 200 nm determinada através de eletroforese capilar por Rosa e colaboradores (1998) para HSA e Hfg foram determinadas as quantidades de Hfg e de HSA adsorvidos em PMMA (0,298 \pm 0,03 µg/cm² e 0,107 \pm 0,02 µg/cm², respectivamente). Estes valores obtidos através de eletroforese capilar foram relacionados às áreas da banda amida II obtidas para para ambas proteínas determinadas pelo FTIR-ATR. Efetuando-se esta relação foi obtido um fator de correlação igual a 0,83 para o Hfg e igual a 0,61 para HSA, o qual foi multiplicado a cada ponto das isotermas destas proteínas obtidas em termos de área da banda versus concentração da proteína em solução, para a determinação da isoterma em termos de quantidade adsorvida (µg/cm²).

4.2.1. Isotermas de Adsorção de Lisozima

Com a determinação das áreas da banda amida II a partir da subtração dos espectros, foram calculadas as concentrações superficiais de lisozima em PE e PMMA (mol/cm²) para as diversas concentrações de lisozima em solução através da Equação 3.1. Sabendo-se que a massa molecular da lisozima é igual a 14700 Da foi possível determinar os resultados em termos de quantidade de lisozima adsorvida na superfície destes polímeros em $\mu g/cm^2$. As áreas integradas da banda amida II e os resultados de concentração superficial para lisozima em PE e PMMA são apresentadas nas Tabelas 4.1 e 4.2. Determinados estes resultados de concentração superficial, foram construídas as isotermas das Figuras 4.2 e 4.3 que relacionam a quantidade de lisozima adsorvida em PE e PMMA, respectivamente, com sua concentração de equilíbrio na solução, sendo, desta maneira, determinada a quantidade máxima adsorvida para estes sistemas (q_m).

Concentração de	Área da banda amida II	Concentração superficial
lisozima em solução	(AU^2)	de lisozima em PE
(mg/ml)		$(\mu g/cm^2)$
0,01	$0,0755 \pm 0,008$	$0,0368 \pm 0,004$
0,05	0,1411±0,03	$0,0687 \pm 0,01$
0,10	0,2299±0,04	$0,1120 \pm 0,02$
0,20	0,2432±0,06	$0,1185 \pm 0,03$
0,30	0,3793±0,05	$0,1847 \pm 0,02$
0,40	0,3992±0,007	$0,1944 \pm 0,003$
0, 50	0,3577±0,2	$0,1742 \pm 0,1$
0,60	0,4376±0,1	$0,2131 \pm 0,05$

Tabela 4.1 – Áreas da banda amida II e concentrações superficiais de lisozima em PE em relação às concentrações de lisozima em solução.

Tabela 4.2 – A	lreas da	banda am	iida II e ce	oncentraçõ	es super	ficiais d	de lisozima	em l	PMMA	ет
r	elação à	s concent	rações de	lisozima er	n soluç	ão.				

Concentração de	Área da banda Amida II	Concentração superficial
lisozima em solução	(AU^2)	de Lisozima em PMMA
(mg/ml)		$(\mu g/cm^2)$
0,1	0,1647±0,0008	$0,0816 \pm 0,0004$
0,3	0,3001±0,01	$0,1487 \pm 0,01$
0,6	0,3549±0,03	$0,1758 \pm 0,01$
0,9	0,3966	0,1965
1,3	0,4782	0,2369
1,5	0,4985±0,02	$0,2470 \pm 0,01$



Figura 4.2 – Isoterma de adsorção de lisozima em PE



Figura 4.3 – Isoterma de adsorção para lisozima em PMMA

Os dados experimentais mostrados nas Figuras 4.2 e 4.3 foram ajustados ao modelo de Langmuir (Equação 2.1). Este ajuste resultou em coeficientes de correlação iguais a 0,953 para PE e 0,984 para PMMA, indicando que as curvas experimentais estão bem representadas por este modelo. O valores de qm calculados através da Equação (2.1) foram de 0,245 μ g/cm² para lisozima em PE e de 0,280 μ g/cm² para esta proteína em PMMA, estes valores se apresentam dentro da faixa de valores de monocamada esperados (0,1 – 0,5 μ g/cm²) (Horbett, 1993). A partir destes valores de concentração na superfície, a espessura da camada de proteína para ambos sistemas pôde ser calculada admitindo-se o valor da densidade da proteína igual a 1,3 g/cm³ (Brash e Lyman, 1969). Com o valor de densidade foi calculado o volume e assim, dividindo-se o volume pela área foi obtido o valor da espessura da camada de lisozima em PE igual a 15 Å e o valor desta espessura em PMMA foi de 12 Å. Foi calculada também a área média ocupada por molécula para estes sistemas, transformando-se o valor de q_m de μ g/cm² em mol/cm² e multiplicando-se este valor pelo número de Avogadro. A área média ocupada por molécula foi de 195 Å² e em PMMA foi igual a 872 Å².

As proteínas podem se adsorver em uma superfície em diferentes estados. A figura 4.4 apresenta exemplos da adsorção de proteínas em múltiplos estados (Horbett e Brash, 1987).



Figura 4.2 – Diferentes estados de adsorção de proteínas

Os valores da área média por molécula para ambos sistemas são maiores que o valor da área de uma molécula considerando uma adsorção do tipo da configuração 1 (Figura 4.2), sendo a área projetada de uma molécula de lisozima adsorvida igual a 804 Å², uma vez que as dimensões da proteína são iguais a 30x45x45 Å (Imoto *et al.*, 1972) Isto pode ser a indicação da formação de uma monocamada não-compacta, que possivelmente poderia estar ocorrendo devido à presença de sítios de adsorção específicos para a proteína ou devido à repulsão entre as moléculas de lisozima, uma vez que os experimentos foram realizados a um pH menor que o pI da proteína (10,5) e as moléculas devem estar carregadas positivamente. Considerando uma adsorção do tipo da configuração 2, a área média por molécula é menor que a área projetada de uma molécula, que é igual a 1350 Å², indicando a formação de mais de uma camada de lisozima adsorvida. Observa-se que nos sistemas estudados, a formação da camada de proteína adsorvida depende dos sítios de adsorção, não ocorre necessariamente somente adsorção do tipo da configuração 1 e nem da config. 2, podem ocorrer ambos os tipos numa mesma superfície. Portanto, não há conclusão de que ocorra a formação de uma monocamada não-compacta ou de múltiplas camadas.

Comparando-se os resultados obtidos de q_m para a lisozima em PE e PMMA, pode-se observar que estes valores se apresentam próximos. O PE é um polímero que é composto por

grupos hidrofóbicos, portanto, possivelmente as interações predominantes que ocorrem entre a lisozima e o PE são interações hidrofóbicas. O PMMA possui grupos ésteres hidrofílicos e uma cadeia principal hidrofóbica, desta forma, as interações entre proteínas e o PMMA poderiam ocorrer por ligações polares (o PMMA possui dipolo negativo), por pontes de hidrogênio (possível presença de OH e NH na superfície da proteína) ou por interações hidrofóbicas. Como os resultados de q_m se apresentam próximos, podem estar ocorrendo interações hidrofóbicas entre a lisozima e o PMMA, assim como ocorre com o PE, embora possam ocorrer todos os tipos de ligações acima no caso do PMMA. Estes várias possibilidades de ligações também podem ocorrer devido à complexidade das molécula de proteínas, uma vez que estas moléculas podem apresentar simultaneamente regiões hidrofóbicas, polares não carregadas e polares carregadas em sua superfície. A proximidade entre os valores de q_m para lisozima em PE e PMMA também pode estar relacionada ao fato de que os componentes dispersivos da energia livre de superfície de ambos polímeros serem próximos ($\gamma_s^{d} = 33.1$ para o PMMA e $\gamma_s^{d} = 35.0$ para PE – Pérez-Luna, 1994).

O valor da constante de dissociação (K_d), representa uma medida da intensidade de adsorção, isto é, quanto menor este parâmetro, maior é a tendência da proteína em permanecer na superfície (Eq.2.2). Os valores obtidos para a lisozima foram iguais a 9,05.10⁻⁶ M para o PE e 1,96.10⁻⁵ M para o PMMA. Estes são valores baixos e indicam que, mesmo que as interações sejam de baixa intensidade entre a lisozima e estes polímeros, a proteína tem uma grande tendência em permanecer na superfície. Possivelmente ocorrem inúmeras interações de baixa intensidade entre as moléculas da proteína e as superfícies poliméricas.

Os valores da quantidade máxima de lisozima adsorvida em PE e PMMA são maiores que o valor teórico de monocamada de lisozima em poli (2-hidróxi etil metacrilato) (pHEMA) determinado por Castillo e colaboradores (1985) que foi de 0,16 μ g/cm². Segundo alguns pesquisadores (Lyman *et al.*, 1965; Andrade, 1973; Ruckenstein e Gourisanka, 1984) menor quantidade de proteína é adsorvida na superfície de materiais hidrofílicos. Sendo a superfície do pHEMA mais hidrofílica que os polímeros estudados, os valores obtidos para PE e PMMA se mostraram coerentes quando comparados ao valor determinado por Castillo e colaboradores (1985).

4.2.2. Isotermas de Adsorção de Imunoglobulina G

Com o valor de absortividade molar fornecido por Singh (1999) foi possível a determinação da quantidade adsorvida pelo método de Sperline e colaboradores (1987). Através da equação 3.1, utilizando-se os valores de áreas da banda foram determinadas as concentrações superficiais de IgG em PE e PMMA, respectivamente. Sabendo-se que a massa molecular da IgG é igual 156000 Da (Harfenist e Murray, 1993) foram calculadas as concentrações superficiais utilizando a unidade $\mu g/cm^2$. Os valores das áreas da banda amida II e os resultados de quantidade de IgG adsorvida na superfície de ambos polímeros são apresentados na Tabelas 4.3 e 4.4 para PE e PMMA, respectivamente.

Tabela 4.3 - Áreas da banda amida II e concentrações superficiais de IgG em PE em relaçãoàs concentrações de IgG em solução.

Concentração de	Área da banda	Concentração
Imunoglobulina G	amida II (AU^2)	superficial de IgG em
em solução (mg/ml)		PE (μ g/cm ²)
0,01	$0,3362 \pm 0,2$	0,2227±0,1
0,05	$0,4770 \pm 0,078$	0,3160±0,05
0,1	$0,5722 \pm 0,053$	0,3791±0,03
0,2	0,5970 ± 0,06	0,3955±0,04
0,5	0,6387±0,3	0,4231±0,2
0,6	$0,6542 \pm 0,01$	0,4334±0,02

Tabela 4.4 — Áreas da banda amida II e concentrações superficiais de IgG em PMMA em relação às concentrações de IgG em solução.

Concentração de	Área da banda amida II	Concentração
IgG em solução	(AU ²)	superficial de IgG em
mg/ml)		PMMA (μ g/cm ²)
0,01	$0,2537 \pm 0,03$	0,1710±0,02
0,05	$0,3216 \pm 0,002$	0,2167±0,001
0,2	$0,3927 \pm 0,02$	0,2647±0,01
0,3	$0,5285 \pm 0.04$	0,3561±0,01
0,6	0.5579 ± 0.11	0,3760±0,04

Com os valores de concentração superficial de IgG adsorvida em PE e PMMA apresentados respectivamente nas Tabelas 4.3 e 4.4 foram traçadas as isotermas das Figuras 4.5 para IgG em PE e 4.6 para PMMA.



Figura 4.5 – Isoterma de Adsorção de IgG em PE



Figura 4.6 - Isoterma de Adsorção de IgG em PMMA

Feito o ajuste, o valor de q_m calculado para IgG adsorvida em PE foi igual a 0,423 μ g/cm². O ajuste resultou em coeficiente de correlação igual 0,987. Dado o valor de q_m , a área média por molécula foi de 6126 Å², e a espessura da camada foi igual a 33 Å. Por estes

resultados, observa-se que ocorre a mesma tendência da lisozima, sendo a área por molécula maior que a área de uma molécula (1521 Å^2) para adsorção do tipo da config. 1 e a espessura da camada menor que o diâmetro da proteína (44 Å - Brash e Lyman, 1969). Seria mais uma vez a indicação da formação de uma monocamada não-compacta. Considerando a adsorção da config.2, a área média por molécula é menor que a área ocupada por uma molécula 10340 Å² (44 x 235 Å - Brash e Lyman, 1969), indicando a formação de uma camada de adsorção.

Para IgG em PMMA o valor de q_m para foi de 0,344 µg/cm², com coeficiente de correlação igual a 0,907. A área média por molécula foi igual a 7533 Å² e espessura da camada adsorvida igual a 26Å, considerando a adsorção do tipo da configuração 1 estes valores também indicam a possível formação de uma monocamada não-compacta. Porém, para a adsorção do tipo da configuração 2 o valor da área média por molécula é menor que a área de uma molécula, indicando a formação de mais de uma camada de adsorção. Mais uma vez não pode-se concluir que houve somente um tipo de configuração da proteína adsorvida em ambos polímeros. Dependendo dos sítios de adsorção ocorre tanto a adsorção do tipo da configuração 1 quanto do tipo da configuração 2. Mais uma vez não há indicação sobre a formação da camada de proteína.

O valor de q_m para IgG adsorvida em PE é maior que este valor para IgG adsorvida em PMMA. Segundo Nyilas e colaboradores (1975) para um material com maior componente polar de energia livre de superfície (γ_s^p) uma menor quantidade de proteína é adsorvida. Portanto, é esperada uma menor quantidade de proteína adsorvida sobre a superfície do PMMA, pois este polímero apresenta este componente polar de energia livre de superfície maior que o do PE ($\gamma_s^p = 9.9$ para o PMMA e $\gamma_s^p = 1.0$ para o PE).

Os valores de K_d obtidos foram iguais a 7,05.10⁻⁸ M para o PE e 1,03.10⁻⁷ M para o PMMA, estes baixos valores deste parâmetro indicam que existe um grande número de interações de baixa densidade entre a IgG e os polímeros estudados, fazendo com que a proteína tenha maior tendência de permanecer na superfície dos polímeros.

Comparando-se os resultados obtidos com a literatura, observa-se a proximidade dos valores calculados de q_m para IgG em PE e PMMA com resultados alcançados por Young e

colaboradores (1988), que estudaram a adsorção de proteínas na superfície de biomateriais poliméricos através da técnica de radiomarcação e obtiveram um resultado de quantidade adsorvida em torno de $0,35 \ \mu g/cm^2$ para a adsorção de IgG em PE.

4.2.3. Isotermas de Adsorção de Fibrinogênio

Os resultados das áreas integradas da banda amida II calculados a partir da subtração entre os espectros dos polímeros puros e dos polímeros com proteínas para as diferentes concentrações de fibrinogênio em solução são mostrados, juntamente com os valores de concentração superficial desta proteína, na Tabela 4.5 para o PE e na Tabela 4.6 para o PMMA. Os valores de concentração superficial foram obtidos a partir do fator de correlação (0,83) determinado por eletroforese capilar.

Tabela 4.5 — Áreas da banda amida II e concentrações superficiais de Hfg em PE em relação às concentrações de Hfg em solução.

Concentração de Hfg	Área da banda amida II	Concentração superficial
em solução (mg/ml)	(AU^2)	de Hfg adsorvido em PE
		$(\mu g/cm^2)$
0,01	$0,1721 \pm 0,02$	0,1428±0,02
0,05	$0,2255 \pm 0,04$	0,1817±0,03
0,1	$0,3106 \pm 0,02$	0,2578±0,02
0,2	$0,3694 \pm 0,03$	0,3066±0,02
0,5	$0,3466 \pm 0,05$	0,2877±0,04
0,6	$0,3876 \pm 0,02$	0,3217±0,02

Tabela 4.6 – Áreas da banda amida II e concentrações superficiais de Hfg em PMMA em relação às concentrações de Hfg em solução.

Concentração de Hfg	Área da banda amida II	Concentração superficial
em solução (mg/ml)	(AU^2)	de Hfg adsorvido em
		PMMA ($\mu g/cm^2$)
0,01	0,2093	0,1737
0,05	0,2232	0,1853
0,1	$0,3058 \pm 0,03$	0,2538±0,02
0,2	0,3302	0,2741
0,3	$0,3254 \pm 0,03$	0,2701±0,02
0,5	$0,3267 \pm 0,04$	0,2712±0,03
0,6	0, 3369	0,2796

A partir dos valores apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.6 foram construídas as isotermas das Figuras 4.7 e 4.8.



Figura 4.7 - Isoterma de Adsorção de Hfg em PE



Figura 4.8 - Isoterma de Adsorção de Hfg em PMMA

Após o ajuste, foi obtido um valor de $q_m = 0,312 \ \mu g/cm^2$ para Hfg adsorvido em PE. Determinado q_m , foi possível a determinação da espessura da camada adsorvida que foi igual a 24 Å e cálculo da área média por molécula resultou em um valor igual a 18102 Å².

......

O valor calculado para a área média por molécula é maior que o valor da área de uma molécula (considerando uma adsorção como a configuração 1, a área de uma molécula adsorvida é igual a 3318 Å²), indicando a possível formação de uma monocamada nãocompacta, como ocorre com a lisozima e a IgG. Isto pode estar ocorrendo devido à presença de sítios de adsorção na superficie, ou devido à repulsão entre as moléculas do Hfg, uma vez que os experimentos foram realizados a um pH maior que o pI da proteína (entre 5,1 e 6,3) e as moléculas estariam carregadas negativamente. Esta última alternativa é menos provável pois a força iônica do meio era alta (concentração de sal \approx 125 mM), o que resultaria numa contração da dupla camada eletrônica das moléculas da proteína e assim a repulsão não seria tão forte. O valor da espessura da camada adsorvida é menor que o diâmetro da proteína (65 Å) (Brash e Lyman, 1969). Considerando uma adsorção com configuração 2 (área de uma molécula igual a 30875Å²), nota-se a indicação da formação de mais de uma camada de adsorção.

A partir do ajuste feito ao modelo de Langmuir foi determinado o valor de q_m igual a 0,272 µg/cm² para Hfg em PMMA. Assim, foi determinada uma área média por molécula igual a 20764 Å² e a espessura da camada adsorvida foi igual a 21Å. Novamente, os valores indicam a possível formação de uma monocamada não compacta devido à presença de sítios de adsorção na superfície do filme ou à repulsão entre as moléculas, considerando uma adsorção com a configuração 1. Comparando-se o valor da área média por molécula com a área de uma molécula para a adsorção do tipo da configuração 2, observa-se que a área por molécula é menor, indicando mais uma vez a presença de mais de uma camada de adsorção. Novamente não há conclusão quanto à formação da camada de proteína.

Dados os resultados de q_m para Hfg em PE, observa-se que o Hfg segue a mesma tendência da lisozima, os valores são próximos para ambos polímeros, indicando que possivelmente estão ocorrendo interações hidrofóbicas entre a proteína e o polímero. Os valores de q_m obtidos para o Hfg são inferiores ao valor de 0,44 µg/cm² obtido por Young e colaboradores para Hfg em PE (1988).

Os baixos valores de K_d obtidos (5,29.10⁻⁸ M para PE e 2,059.10⁻⁸ M para o PMMA) indicam, que, assim como a lisozima e a IgG, o Hfg tem grande tendência de permanecer na

superficie dos polímeros.

4.2.4 - Isotermas de Adsorção de HSA

Os resultados de área da banda amida II obtidos para HSA também foram convertidos a quantidade adsorvida através do fator de conversão determinado por eletroforese capilar, com valor igual a 0,61. Os valores de área da banda e os valores calculados de concentração superficial são apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8. As Figuras 4.9 e 4.10 apresentam as isotermas de adsorção para HSA em PE e PMMA, respectivamente.

Tabela 4.7 – Áreas da banda amida II e concentrações superficiais de HSA em PE em relação às concentrações de HSA em solução.

Concentração de HSA	Área da banda amida II	Conc. sup. de HSA
em solução (mg/ml)	(AU ²)	adsorvida em PE (µg/cm ²)
0,01	$0,12725 \pm 0,03$	0,0777±0,02
0,05	$0,2258 \pm 0,09$	0,1377±0,05
0,1	0,2487	0,1517
0,2	0,2128	0,1590
0,5	$0,2401 \pm 0,06$	0,1465±0,04
0,6	0,2797	0,1706

Tabela 4.8 - Áreas da banda amida II e concentrações superficiais de HSA em PMMA em relação às concentrações de HSA em solução.

Concentração de HSA	Área da banda amida II	Concentração superficial
em solução (mg/ml)	(AU^2)	de HSA adsorvida em
		PMMA ($\mu g/cm^2$)
0,01	$0,2436 \pm 0,05$	0,1486±0,03
0,05	$0,2856 \pm 0.03$	0,1742±0,02
0,1	$0,31685 \pm 0,07$	0,1933±0,04
0,2	$0,2986 \pm 0,001$	0,1821±0,001
0,3	0,3123	0,1905



Figura 4.9 - Isoterma de Adsorção de HSA em PE



Figura 4.10 - Isoterma de Adsorção de HSA em PMMA

No caso da HSA em PE o resultado de q_m calculado foi igual a 0,164 μ g/cm². Os valores de área média por molécula e espessura da camada foram de 6989 Å² e 13 Å, respectivamente. Neste caso, considerando-se tanto uma adsorção do tipo da configuração 1 como da configuração 2, nota-se a indicação da formação de uma monocamada não-compacta. Para ambas as considerações os valores da área de uma molécula (1257 Å² para adsorção

com configuração 1 e 4600 $Å^2$ para configuração 2) são menores que a área média por molécula e a espessura da camada adsorvida é menor que o diâmetro da proteína.

Na adsorção de HSA em PMMA o valor de q_m obtido foi igual a 0,19 μ g/cm², o qual resultou num valor de área média por molécula igual a 6033 Å² e espessura da camada adsorvida igual a 15Å. Estes valores indicam, também neste caso, a formação de uma monocamada não-compacta.

Os valores de K_d obtidos (1,52.10⁻⁷ M para o PE e 4,35.10⁻⁸ M para o PMMA) foram baixos, indicando uma grande tendência desta proteína permanecer na superfície dos polímeros, devido a um grande número de interações de baixa intensidade.

Neste caso da HSA a quantidade máxima adsorvida em PMMA e em PE se mostraram próximas. Possivelmente podem estar ocorrendo interações hidrofóbicas PMMA e a HSA, ocorrendo o mesmo entre o PE e a HSA. A quantidade máxima obtida se aproxima do valor obtido para monocamada $(0,14 \ \mu g/cm^2)$ por Young e colaboradores para HSA em PE (1988).

A Tabela 4.9 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos para os sistemas estudados. Na Tabela são comparados os valores de quantidade máxima adsorvida e constante de dissociação para cada sistema estudado. A complexidade das moléculas das proteínas estudadas também são comparadas.

Proteína	Polímero	$q_m(\mu g/cm^2)$	K _d (M)	Complexidade das moléculas
Lisozima	PE PMMA	0,245 0,280	9,05.10 ⁻⁶ 1,95.10 ⁻⁵	- Menos complexa - Baixa massa molecular (14700) - Globular
HSA	PE PMMA	0,164 0,190	1,52.10 ⁻⁷ 4,35.10 ⁻⁸	- Baixa complexidade - Baixa massa molecular (69000) - Forma elipsoidal
IgG	PE PMMA	0,423 0,344	5,29.10 ⁻⁸ 2,06.10 ⁻⁸	- Molécula complexa - Alta massa molecular (156000) - Moléculas alongadas
Hfg	PE PMMA	0,312 0,272	7,05.10 ⁻⁸ 1,03.10 ⁻⁷	- Mais complexa - Alta massa molecular (340000) - Moléculas alongadas

Tabela 4.9 – Comparação entre resultados obtidos para os sistemas estudados

Todos os sistemas apresentaram baixos valores de K_d indicando que apesar das interações hidrofóbicas serem ligações fracas, existe um grande número de interações que fazem com que as moléculas das proteínas permaneçam na superfície dos materiais, não sendo facilmente dessorvidas. A lisozima quando comparada às outras proteínas seria mais facilmente dessorvida.

A maior quantidade de IgG se deve ao fato de esta proteína apresentar maior afinidade pelos polímeros estudados. Possivelmente a maior afinidade se deve ao fato de que a molécula desta proteína seja grande. Segundo Horbett e Brash (1987) uma molécula grande forma múltiplos pontos de contato quando adsorvida em superfícies. Porém, o tamanho da molécula não é a única determinante no fenômeno da adsorção, pois se fosse, teria que ser observada maior quantidade de Hfg adsorvido, e isto não ocorre. Devido à alta complexidade da molécula e à falta de conhecimento sobre os componentes dispersivo e polar da proteína, o quais influenciam a adsorção, não é possível explicar exatamente porque ocorre a maior quantidade desta proteína adsorvida. A lisozima apesar de ser uma molécula menor e de baixo peso molecular, é adsorvida em quantidade próxima ao Hfg, o qual é mais complexo. Talvez as duas proteínas apresentem nas condições dos experimentos realizados, o mesmo número de grupos de ligação com as superfícies poliméricas. A HSA sendo uma molécula pequena e de baixo massa molecular adsorve em menor quantidade.

Em geral, deseja-se que um biomaterial apresente uma maior quantidade de HSA e menores quantidades de IgG e Hfg, pois estas últimas estão envolvidas com a agregação e ativação de plaquetas, enquanto a primeira diminui este efeito (Sevastinov, 1991).

Apesar dos resultados quantitativos satisfatórios, foram enfrentados muitos problemas relativos à reprodutibilidade. Talvez a ocorrência destes problemas se deva ao fato de que os espectros dos filmes puros eram coletados anteriormente à adsorção e removidos da superfície do IRE para os ensaios de adsorção, alterando, desta maneira, o "branco" quando eram efetuadas as subtrações.

4.3. Biomateriais Recobertos

A adsorção de proteínas, a obtenção dos espectros e a determinação da quantidade adsorvida para o PE recoberto foi feita da mesma maneira em que foi feita para os materiais puros. Sendo a adsorção feita em soluções das proteínas com concentração igual a 0,6 mg/ml, pois este é um valor de concentração de solução na qual a quantidade das proteínas adsorvidas já havia atingido o patamar da isoterma para os sistemas estudados. Nos casos em que a absortividade molar da proteína era disponível, a determinação foi feita através da Equação 3.1 e para as demais foi feita através do fator de correlação obtido pela eletroforese capilar.

A Tabela 4.10 apresenta os resultados de quantidade adsorvida na superfície de PE recoberto com heparina, bem como os resultados de q_m obtidos para os sistemas nos quais foram utilizados o PE.

	Quant. adsorvida (q _m) em PE	Quant. ads. p/ $C^* = 0,6 \text{ mg/ml}$
	puro (μ g/cm ²)	em PE recoberto (µg/cm ²)
HSA	0,164	0,072
Hfg	0,304	0,245
IgG	0,423	0,591
Lisozima	0,245	1,102

Tabela 4.10 - Resultados de quantidade adsorvida em PE puro e PE recoberto.

Comparando-se os resultados apresentados para PE puro e PE recoberto mostrados na Tabela 4.10 nota-se que a presença de heparina influencia a adsorção das proteínas estudadas de diferentes maneiras. No caso do Hfg e da HSA houve uma diminuição da quantidade adsorvida. A heparina é carregada negativamente estas proteínas também estavam carregadas negativamente no pH das soluções (7,4), pois os pI's das mesmas (4,8 para a HSA e 5,1 - 6,3 para o Hfg) são menores que este valor de pH. Assim, existe a possibilidade de estar ocorrendo repulsão entre as moléculas de heparina e das proteínas. No caso da Lisozima houve um aumento da quantidade adsorvida, possivelmente devido ao pI desta proteína ser maior que o pH da solução de adsorção, estando a proteína carregada positivamente e desta forma, ocorrendo atração entre as moléculas da proteína e de heparina. Houve também um aumento da quantidade de IgG adsorvida. No experimento a IgG se encontra num pH próximo ao seu pI (6.3-7.3), portanto as moléculas desta proteína apresentam menor repulsão no pH do experimento. A menor repulsão tende a deixar o sistema mais compacto.

4.4. Medidas do ângulo de Contato

Os perfis de força x distância de imersão, a partir dos quais foram calculados os ângulos de contato de PMMA puro e recoberto com as proteínas, são apresentados na Figura 4.11. Na Figura 4.12 estão os perfis de PE puro e recoberto com as proteínas.



Figura 4.11- Perfis de força x distância de imersão para (a) PMMA, (b) Lisozima em PMMA, (c) Hfg em PMMA, (d) IgG em PMMA e (e) HSA em PMMA.



Figura 4.12 - Perfis de força x distância de imersão para (a) PE, (b) Lisozima em PE, (c) Hfg em PE, (d) IgG em PE e (e) HSA em PE.

As histereses observadas nos perfis de força x distância de imersão para o Hfg e a IgG, se aproximam à histerese negativa apresentada por Andrade e colaboradores (1985). Tal

histerese é atribuída a efeitos de deformação da superficie durante a medida de ângulo de contato. Nos sistemas estudados a deformação pode estar ocorrendo devido à inclinação das moléculas de Hfg e IgG adsorvidas na superficie. Provavelmente existe disponibilidade de espaço para que as moléculas que estejam ligadas à superficie por sua extremidade (configuração 1) se inclinem com a movimentação da placa dentro do líquido. A complexidade destas duas moléculas também podem estar influenciando na histerese destes sistemas. Segundo Andrade e colaboradores este problema ainda não foi modelado, desta forma não foi possível determinar os ângulos de contato para Hfg e IgG adsorvidos em PE e PMMA.

Para a HSA e a Lisozima, o cálculo dos ângulos de contato foi possível uma vez que os perfis de força x imersão apresentaram regiões lineares definidas para os ciclos de avanço de retrocesso. Foram realizados 7 ciclos para cada medida. Nestas regiões lineares, foram realizadas regressões lineares, que forneceram os valores de a (coeficiente linear) para os sistemas de lisozima e HSA, com os quais foram calculados os ângulos de contato através da Equação 3.5. Os resultados obtidos para o PMMA estão na Tabela 4.11 e para o PE na Tabela 4.12.

PMMA									
Puro		Lisozima		Hfg		IgG		HSA	
θav. (°)	θret.(°)	θav. (°)	θret.(°)	θav. (°)	θret.(°)	θav. (°)	θret.(°)	θav. (°)	θret.(°)
87,25	49,22	_	21,43		. <u> </u>			57,16	23,67
83,65	48,83	73,61	21,00		_			50,77	25,11
83,30	47,46	78,83	21,99		_			45,45	23,91
		57,50	21,54					56,07	24,32
		60,18	21,43					57,83	24,45
		64,28	21,71					57,03	24,12
		68,92	21,56					66,37	23,49

Tabela 4.11 – Ângulos de contato para o PMMA puro e recoberto com as proteínas
PE									
Puro		Lisozima		Hfg		IgG		HSA	
θav. (°)	θret.(°)								
107,78	86,39	77,09	32,58					72,49	42,01
105,10	87,00	75,06	32,78				_	66,41	42,56
106,43	86,52	76,8	31,44		_	_		63,79	42,46
		76,4	31,59					65,92	45,68
_		72,25	30,77					-	-
_		74,49	31,3					-	-
_		71,77	30,56				_	-	-

Tabela $4.12 - \hat{A}$ ngulos de contato para o PE puro e recoberto com proteínas.

Os resultados de ângulo de contato mostram que o PE é mais hidrofóbico que o PMMA, pois o primeiro apresenta ângulo de contato maior que o último.

Observa-se que os ângulos de retrocesso são mais reprodutíveis que os ângulos de avanço. Assim foram levados em consideração os ângulos de retrocesso. Nota-se que os valores dos ângulos não se alteram de forma significativa no decorrer dos ciclos de medidas, o que seria uma indicação de que as moléculas não estariam se reorientando com tempo.

Observa-se também que houve uma diminuição no ângulo de contato após a adsorção das proteínas tanto para o PE como para o PMMA, indicando mais uma vez, que possivelmente as proteínas e os polímeros estariam se interagindo através de interações hidrofóbicas, pois, desta forma os domínios hidrofílicos das proteínas estariam se expondo à água durante as medidas de ângulo de contato, fazendo com que os ângulos diminuíssem.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. Conclusão

O presente trabalho tem características pioneiras na linha de pesquisa implantada no Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. Esta contribuição prende-se ao fato de ter sido a primeira a buscar a implantação da técnica FTIR-ATR nessa linha de pesquisa no laboratório. Tendo vista os resultados apresentados, pode-se concluir que a técnica FTIR/ATR proporcionou resultados satisfatórios para a quantificação das proteínas lisozima, IgG, Hfg e HSA na superfície dos materiais poliméricos polietileno e PMMA. A quantificação de lisozima e IgG foi efetuada através da utilização desta técnica em combinação com o método desenvolvido por Sperline e colaboradores (1987) para o estudo da adsorção de surfatantes em superficies e no qual foi baseado uma aproximação desenvolvida por Fu e colaboradores (1993) para investigar a adsorção quantitativa de proteínas em superfícies. Para o Hfg e a HSA a técnica FTIR/ATR foi utilizada em combinação com a eletroforese capilar, a qual analisou as proteínas eluídas da superficie dos materiais, neste caso a quantificação foi realizada através da determinação de um fator de correlação para cada sistema. A técnica se mostrou capaz de detectar baixas concentrações superficiais de proteínas, apresentou simplicidade de medida e tempos curtos de análise. Porém, algumas dificuldades quanto a reprodutibilidade da técnica foram encontradas, como discutido anteriormente na análise dos resultados.

A partir dos valores de quantidade máxima (q_m) obtidos foram analisadas a espessura da camada de proteína adsorvida e a área média por molécula. Nos sistemas estudados, observou-se que no caso da lisozima, da HSA e do Hfg as quantidades adsorvidas foram próximas para os dois polímeros e, para a IgG ocorreu maior adsorção no polietileno. A quantidade de IgG adsorvida foi maior que a quantidade das outras proteínas, tanto para o polietileno quanto para o PMMA. Isto indica que, apesar destes materiais serem bastante utilizados como biomateriais, eles apresentam limitações quanto à biocompatibilidade, uma vez que a IgG está envolvida com a agregação e ativação de plaquetas e também a respostas do sistema imunológico.

Através do estudo com heparina observou-se que o recobrimento influenciou na adsorção de diferentes formas. Houve diminuição da quantidade de HSA, o que não seria adequado para o aumento da biocompatibilidade, pois a albumina é uma proteína que não ativa o sistema plaquetário, apresentando um efeito de passivação quando adsorvida em superficies. Para o Hfg também houve diminuição da quantidade adsorvida, ao contrário da albumina, isto seria satisfatório, pois o fibrinogênio participa da cascata de coagulação. Assim quanto maior a quantidade de Hfg adsorvida, maior a tendência da formação de coágulo na superfície do biomaterial. No caso da IgG houve aumento da proteína adsorvidas, o que também não é adequado, uma vez que o aumento desta proteína adsorvida diminui a biocompatibilidade, por ser esta proteína participante do mecanismo de defesa do organismo.

Os resultados das medidas de ângulo de contato para lisozima e HSA reforçaram a indicação de que possivelmente as interações que ocorrem entre estas proteínas e ambos polímeros são interações hidrofóbicas.

5.2. Sugestões para próximos trabalhos

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos neste trabalho, a quantificação de proteínas na superficie de materiais poliméricos através da técnica proposta não é tarefa simples. Durante o desenvolvimento do trabalho surgiram problemas e dificuldades necessitando de respostas que possibilitassem sua continuidade. Algumas vezes surgiu mais de uma resposta, sendo necessária a opção por aquela que se apresentava mais adequada ao momento. São algumas destas possibilidades que aparecem aqui como sugestões àqueles que estarão envolvidos no estudo quantitativo de proteínas na superficie de biomateriais poliméricos através da técnica de infravermelho com Transformada de Fourier acoplada à técnica de reflexão total interna.

Uma sugestão para otimização dos resultados obtidos, como melhor reprodutibilidade e melhor sinal da radiação infravermelha com a obtenção de picos com maiores intensidades,

envolve o estudo de proteínas adsorvida na superfície de filmes poliméricos formados diretamente na superficie do elemento de reflexão interna. Uma possibilidade para a obtenção destes filmes seria a utilização da técnica de "spin-coating", que consiste em gotejar a solução polimérica sobre uma superfície em rotação, ocorrendo a distribuição desta solução sobre esta superfície e com a evaporação do solvente o filme se forma. A utilização desta técnica seria adequada para tal finalidade, uma vez que esta técnica permite a formação de filmes com espessura em torno de 0,1 µm. A necessidade da utilização de filmes com espessuras desta ordem reside no fato de que a radiação deve atravessar o filme e atingir a camada de proteína adsorvida na outra extremidade e típicos valores de distância de penetração estão na ordem de 0.2 a 1.8 µm. O uso de filmes formados diretamente sobre a superfície do IRE reduziria problemas com a reprodutibilidade, pois entre a obtenção dos espectros dos filmes sem as proteínas (branco) e dos espectros dos filmes com as proteínas adsorvidas, não ocorria a remoção destes filmes da superficie do IRE, o que pode causar alteração no "branco", influenciando no resultado da subtração entre os espectros. Outra vantagem da técnica de "spin-coating" é a perfeita distribuição da solução polimérica na superficie a ser recoberta e assim, é possível a obtenção de filmes mais homogêneos. A formação do filme sobre a superfície do IRE e sua posterior remoção deve ser efetuada com o devido cuidado dada a sensibilidade do cristal constituinte do IRE, deve-se observar se o solvente da solução polimérica não ataca o cristal.

No que diz respeito à influência da banda de absorção de água, o uso de deutério nas soluções protéicas, seria adequado para o deslocamento da banda de água que se encontra próxima às bandas amida I e amida II das proteínas. Esta medida facilitaria o estudo de materiais como os hidrogéis e proporcionaria melhor reprodutibilidade pois a quantidade de água presente no hidrogel não influenciaria na intensidade da banda de proteína. O uso de deutério também permitiria o estudo de mudanças estruturais de proteínas.

Quanto ao estudo de mudanças estruturais, sugere-se a utilização da técnica de dicroismo circular para verificação de alterações estruturais das proteínas quando no estado adsorvido em relação à estrutura original.

Uma outra sugestão para o estudo de proteínas adsorvidas seria a realização dos experimentos de adsorção sob condições dinâmicas, isto é, submeter os materiais a serem estudados a um fluxo de solução de proteínas, simulando o fluxo sangüíneo, desta forma a adsorção estaria sendo realizada em condições mais próximas às condições fisiológicas. Experimentos nestas condições teriam o intuito de estudar o efeito do tempo de exposição, da vazão, do número de Reynolds do escoamento e da tensão de cisalhamento nas proteínas adsorvidas nas superfícies.

Sugere-se ainda a utilização de materiais biodegradáveis, como o poli(ácido lático), que são materiais utilizados em implantes temporários para determinadas aplicações, onde deseja-se que o material seja degradado com o tempo para que não haja necessidade de posterior cirurgia para remoção do implante. Um exemplo de aplicação deste tipo de biomaterial é na utilização para reparo de cartilagem. Este material vêm sendo extensivamente estudados em outras linhas de pesquisas referentes a biomateriais, mas quanto à investigação de adsorção de proteínas estes materiais poliméricos ainda necessitam de um vasto estudo.

Por último, sugere-se o estudo de adsorção de proteínas utilizando-se diferentes materiais em sistemas terapêuticos que entram em contato diretamente com o sangue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTRIA, K. D., BRYANT, S. M., LC/GC, n.10, p. 26-30, 1997, apud KEMP, G., Capillary Electrophoresis: a versatile family of analytical techniques. Biotecnol. Appl. Biochem., v. 27, p. 9-17, 1998.
- ANDRADE, J. D., Med. Instrum., v. 7, p. 110 120, 1973, apud SEVASTINOV, V. I., Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, cap. 21, in High Performance Biomaterials – A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications, ed. Michael Ssycher, Technomic Publishing CO. INC., Lancaster, 1991.
- ANDRADE, J. D., HLADY, V., Plasma Protein Adsorption: The Big Twelve. Annals of New York Academy of Sciences, p. 158 171, 1987.
- ANDRADE, J. D., SMITH, L. M., GREGONIS, D. E., Surface chemistry and physics and interfacial aspects of biomaterials. **Polymers**, v.1, New York: Plenum Press, 1985.
- BARBUCCI, R., MAGNANI, A., Conformation of Human Plasma Proteins at Polymers Surfaces: the Effectiveness of Surface Heparinization, **Biomaterials**, v. 15, n. 12, p. 955-962, 1994.
- BRANDRUP, J., Physical Constants of some Important Polymers, in Polymer Handbook, Immergut E.H., p. v-13 e V-55, 1975
- BRASH, J. L., LYMAN, D. J., Adsorption of plasma proteins in solution to uncharged, hydrophobic polymer surfaces. Journal of Biomedical Materials Research., v. 3, p. 175 - 189, 1969

- CASTILLO, E. J., KOENING, J. L., ANDERSON, J. M., JENTOF, N., Protein adsorption on soft contact lenses III - Mucin. **Biomaterials**, v. 7, Jan. 1986.
- CASTILLO, E. J., KOENING, J. L., ANDERSON, J. M., JENTOF, N., Protein adsorption on soft contact lenses VI – Comparison of *in vivo* spoilage with the *in vitro* adsorption of tear proteins. **Biomaterials**, v. 7, Mar. 1986
- CASTILLO, E. J., KOENING, J. L., ANDERSON, J. M., JENTOF, N., Protein adsorption on soft contact lenses II – Reversible and irreversible interactions between lysozyme and soft contact lens surfaces. **Biomaterials**, v. 6, Sep. 1985.
- CHITTUR, K. K., FTIR-ATR for Protein Adsorption to Biomaterials Surfaces. Biomaterials, v. 19, p. 357 – 369, 1998.
- CHITTUR, K. K., FINK, D. J., LEININGER, R. I., HUTSON, T. B., FTIR/ATR Studies of proteins Adsorption in Flowing Systems. Approaches for Bulk Correction Analysis in Mistures. Journal of Colloid and Interface Science, v. 111, p. 419, 1986.
- COLEMAN, P. B., Practical Sampling Techniques for Infrared Analysis, CRC Press, Boca Raton, p. 3 e 57, 1993.
- DENG, X. M., CASTILLO, E. J., ANDERSON, J. M., Surface modification of soft contact lenses: silanization, wettability and lysozyme adsorption studies. Biomaterials, v. 7, p. 247 – 251, Jul. 1986.
- DUMITRU, S., Ophthalmic Drugs, cap. 40, p. 674, in High Performance Biomaterials A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications, ed. Michael Ssycher, Technomic Publishing CO. INC., Lancaster, 1991.
- FAHRENFORT, Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infrared reflection spectra of organic compounds. Spectrochim. Acta, v. 17, p. 698, 1961.

- FINK D. J., HUTSON, T. B., CHITTUR, K. K., GENDREAU, R. M., Quantitative surface studies of protein adsorption by infrared spectroscopy. Analytical Biochemistry, v. 165, p. 147 – 154, 1987.
- FINK, D. J., CHITTUR, K. K., Monitoring biological processes by Fourier transform infrared spectroscopy, Enzyme Microb. Technol., v. 9, p. 568 572, Sep. 1986.
- FU, F. N., FULLER, M. P., SINGH, B.R., Use of Fourier Transform Infrared/ Attenuated Total Reflectance Spectroscopy for the Study of Surface Adsorption of Proteins. Appl. Spectroscopy, v. 47, n. 1, p. 98-102, 1993
- GENDREAU, M., Spectroscopy in Biomedical Sciences, CRC Press, 1986.
- GOTT, V. L., WHIFFEN J. D., DUTTON, R. C., Heparin Bonding on Colloidal Graphite Surfaces. Science, v. 142, p. 1297 – 1298, 1963, apud BARBUCCI, R., MAGNANI, A., Conformation of Human Plasma Proteins at Polymers Surfaces: the Effectiveness of Surface Heparinization, Biomaterials, v. 15, n. 12, p. 955-962, 1994.
- GUYTON, A. C., Hemostasia e Coagulação Sangüínea, in Fisiologia Básica, ed. Interamericana, Rio de Janeiro, cap. 7, 1977.
- HALPERN, B. D., TONG, Y.C., Medical Applications, in **Polymers Biomaterials and** Medical Applications, Wiley Interscience, p.265, 1989.
- HARFENIST, E. J., MURRAY, R.K., Plasma Proteins, Immunoglobulins, and Blood Coagulation, in **Harper's Biochemistry**, a Lange Medical Book, Nowalk, cap. 59, 1993
- HLADY, V., Spectroscopic and other Techniques for Studying Adsorption of Bioproducts at Interfaces, in Interacial Phenomena and Products, Marcel Dekker, New York, cap. 9, 1996.

- HOFFMAN, A., Modification of Materials Surfaces to Affect how they Interact with Blood, Blood in Contact with natural and Artifical Surfaces. Annals of New York Academy of Sciences, p. 96-101, 1987.
- HORBETT, T. A., BRASH, J. L, PROTEINS AT Interfaces: Current Issues and Future Prospects, in **Proteins at Interfaces. Physicochemical and Bichemical Studies**, American Chemical Society, Washington, D. C., cap. 1, 1987.
- HORBETT, T. A., Principles underlying the role of adsorbed plasma proteins in blood interaction with foreign materials. Cardiovasc. Pathol., v. 2, n. 3, p. 137S – 138S, July – Sep., 1993
- HORBETT, T. A., RATNER, B. D., SCHAKENRAAD, J. M., SCHOEN, F. J., Some background concepts, in **Biomaterials Science – an introduction to materials science.**, Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., ed. Academic Press, cap. 3, p. 133-141, 1996.
- HORBETT, T. A., Protein Adsorption on Biomaterials, in Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications, Advances in Chemistry Series, Washington, D.C., n. 199, cap. 17, 1982.
- IKADA, Y., Interfacial biocompatibility, in Polymers of Biological and Biomedical Significance, SHALABY, W., IKADA Y., LANGER, R., ed. American Chemical Society, ACS Symposium Series, cap. 3, p.35-48, 1994.
- IMOTO, T., JOHNSON, L. N., NORTH, A. C. T., PHILLIPS, D. C., RUPLEY, J. A., Vertebrate Lysozymes, in Boyer, P. D., The Enzymes, 3rd ed., Academic Press, v. 7, p. 666, 1972
- JEON, J. S., SPERLINE, R. P., RAGHAVAN S., Quantitative analysis of adsorbed serum albumin on segmented polyurethane using FTIR/ATR spectroscopy. Appl. Spectroscopy, v. 46, n. 11, p. 1644 – 1648, 1992.

- KAELBLE, D. H., MOACANIN, J., Polymer, v. 18, p. 475-482, apud SEVASTINOV, V.
 I., Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, cap. 21, in
 High Performance Biomaterials A Comprehensive Guide to Medical and
 Pharmaceutical Applications, ed. Michael Ssycher, Technomic Publishing CO. INC.,
 Lancaster, 1991.
- KINE, B. B., NOVAK, R. W., Acrylic and Methacrylic Ester Polymers, in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. 2nd Ed., Jacqueline, I. K., Wiley Interscience, p.235 -299, 1990.
- KONDO, A., OKU, S., HIGASHITANI, K., Adsorption of γ-globulin, a model protein for antibody, on colloidal particles. Biotechnology and Bioengineering, v. 37, p. 537 – 543, 1991.
- KULIK, E., IKADA, Y, In vitro platelet adhesion to nonionic and ionic hydrogels with different water contents. Journal of Biomedical Materials Research, v. 30, p.295-304, 1996.
- LANGMUIR, I. J., The properties of gases and solids, American Chemical Society, v. 40, p.1361, 1918.
- LEININGER, R. I., HUTSON, T. B., JAKOBSEN, R. J., Spectroscopic approaches to the investigation of interactions between artificial surfaces and proteins. Annals of New York Academy of Sciences, p. 173 – 183.
- LU, D. R., PARK, K., Effect of surface hidrofobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen. Journal of Colloid and Interface Science, v. 144, n. 1, Jun. 1991.
- LYMAN, D. J., MUIR, W. M., LEE, I. J., Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, v. 11, p. 301 –317, 1965, apud SEVASTINOV, V. I., Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, cap. 21, in High Performance Biomaterials – A

Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications, ed. Michael Ssycher, Technomic Publishing CO. INC., Lancaster, 1991.

- LYMAN, D.J., ROWLAND, S. M., Biomaterials in Polymers: Biomaterials and Medical Applications, Wiley-Interscience, p. 52, 1989
- MALMONGE, S. M., Hidrogéis sintéticos para o reparo de defeitos de cartilagem articular. Tese de Doutorado, FEM – UNICAMP, 1997.
- MIYAZAWA, T., Perturbation treatment of the Characteristics Vibrations of the Polypeptide Chains in Various Configurations. Journal of Chemical Physics, v. 32, n. 6, p. 1647, 1960.
- NYILAS, E., MORTON, W. A., LEDERMAN, D. M., CHIN, T. H., CUMMING R. D., Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, v. 21, p. 55-69, 1975, apud SEVASTINOV, V.
 I., Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, cap. 21, in High Performance Biomaterials – A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications, ed. Michael Ssycher, Technomic Publishing CO. INC., Lancaster, 1991.
- PASCHE, B., ELGUE, G., OLSSON, P., REISENFELD, J., RASMUSAON, A., Binding of Antithrombin to Immobilized Heparin under Varying Flow Conditions. Artificial organs, v. 15, n. 6, p. 481-491, 1991.
- PEPPAS, N.A., LANGER, R., New challenges in biomaterials. Science, v. 263, p,1715, 1994 apud ROSA, P.T.V., ARRUDA, A.C.F., SANTANA, C.C., Adsorção de proteínas do sangue na superfície de biomateriais. Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Adsorção, Florianólpolis, 1998.
- PÉREZ-LUNA, V. H., HORBETT, T. A., RATNER, B. D., Developing correlations between fibrinogen adsorption and surface properties using multivariate statistics. Journal of Biomedical Materials Research, v. 28, p. 1111 – 1126, 1994.

- PINTO, T. J. A, SAITO, T., GLEREAN, A., Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre o pericárido bovino e Dracon^(R). Rev. Saúde Pública, v. 27, n. 3, p. 185-9, 1993.
- PITT, W. G., PARK, K., COOPER, S. L., Sequential protein Adsorption and Thrombus Deposition on Polymeric Biomaterials. Journal of Colloid and Interface Science, v. 111, n. 2, Jun. 1986.
- ROSA, P.T.V., ARRUDA, A.C.F., SANTANA, C.C., Adsorção de proteínas do sangue na superfície de biomateriais. Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Adsorção, Florianólpolis, 1998.
- RUCKENSTEIN, E., GOURISANKAR, S. V., Jouranl of Colloid and Interface Science,
 v. 101, p. 436 451, 1984, apud SEVASTINOV, V. I., Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, cap. 21, in High Performance
 Biomaterials A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications, ed. Michael Ssycher, Technomic Publishing CO. INC., Lancaster, 1991.
- SANTIN, M., WASSALL, M. A., PELUSO, G., DENYER, S. P., Adsorption of α₁microbulin from Biological Fluids onto Polymer Surfaces. Biomaterials, v. 18, p. 823, 1997, apud ROSA, P.T.V., ARRUDA, A.C.F., SANTANA, C.C., Adsorção de proteínas do sangue na superfície de biomateriais. Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Adsorção, Florianólpolis, 1998.
- SEVASTIANOV, V. I., Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, in High Performance Biomaterials – A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications. Ssycher M., ed. Technomic Publishing Co., INC., cap. 221, p. 313 – 341, 1991.
- SIMON, I., Optical constants of germaniun. Silicon and pyrite in the infrared, J. Opt. Soc. Am., v. 41, p. 336, 1951.

SINGH, B. R., comunicação pessoal, 1999.

- SOFF, G. A., ROSENBERG, R. D., Physiology of Homeostasis: the Fluid Phase, in Nathan, D. G., OSKI, F. A., Hematology of Infancy and Childhood, Philadelphia, W. B., Saunders Company, p. 1534 – 1560, 1993.
- SPERLINE, R. P., MURALIDHARAN S., FREISER H., In Situ Setermination of Species Adsorbed at a Solid-Liquid Interface by Quantitative Infrared Attenuated total Reflectance Spectrophotometry. Langmuir, n. 3, p.198-202, 1987.
- UEDA, T., ISHIHARA, K., NAKABAYASHI, N., Adsorption-desorption of Proteins on Phospholipids Polymer Surfaces Evaluated by Dynamic Contact Angle Measurement. J. Biomed. Mat. Res., v. 29, p. 381-387, 1995
- VAN STRAATEN, J., PEPPAS, N. A., ATR-FTIR analysis of protein adsorption on polymeric surfaces. Journal of Biomaterials Science – Polymer Edition, v. 2(2), p. 113 –121, 1991.
- WASACZ, F. M., 2º Encontro Brasileiro de Usuários da Nicolet, São Paulo, comunicação pessoal, 1999.
- YONG, B. R., PITT, W. G., COOPER, S. L., Protein adsorption on polymeric biomaterials
 I. adsorption isotherms. Journal of Colloid and Interface Science, v. 124, n. 1, Jul. 1988.
- ZISMAN, W. A., Contact angle, wettability, and adhesion. Advances in Chemistry Series, Fowkes, F. M., ed., v. 43, p.1, 1964, apud SEVASTINOV, V. I., Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, cap. 21, in High Performance Biomaterials A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications, ed. Michael Ssycher, Technomic Publishing CO. INC., Lancaster, 1991.



Espectros de PE e lisozima: — branco; — PE + lisozima; — subtração







Espectros de PMMA e Lisozima: — branco; — PMMA + Lisozima; — subtração









Espectros de PMMA e Hfg: ---- branco; --- PMMA + Hfg; ---- subtração