

• U



C •

Departamento de Física

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Comportamento de proteínas em stents vasculares modificados por pulverização catódica

Carla de Oliveira Ribeiro

Coimbra, 2009

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Comportamento de proteínas em stents vasculares modificados por pulverização catódica

Carla de Oliveira Ribeiro

Orientação e Supervisão: Doutora Ana Paula Piedade

Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra (CEMUC)

Coimbra, 2009

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Doutora Ana Paula Piedade pela orientação e auxílio durante este projecto e com quem aprendi imenso e à Doutora Teresa Vieira por me ter acolhido no CEMUC. Quero também deixar um agradecimento ao Jorge Nunes pela ajuda que me deu sempre que precisei.

Um agradecimento especial ao Professor Doutor Miguel Morgado, por estar sempre presente na vida dos alunos, tentando orienta-los e ajuda-los a superar todas as entranhas que surgem e pelo brilhante trabalho que está a fazer pelo Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica.

Aos meus pais e irmã, que me ajudam e apoiam sempre que preciso e se não fossem eles eu não conseguia chegar até aqui.

Às minhas amigas e antigas colegas de casa com quem adorei viver e conviver.

Aos amigos que fiz nesta bela cidade de Coimbra, espero que o sejam para a vida, e com quem passei excelentes momentos durante estes últimos anos.

A todos, Muito Obrigada! ☺

Resumo

Esta dissertação tem como objectivo principal, o estudo do comportamento de proteínas presentes no sangue quando em contacto com stents vasculares, cuja superfície foi modificada pela deposição de filmes finos com gradiente de funcionalidade. O modo como as proteínas interagem com a superfície destes implantes é de crucial importância, pois são estes compostos biológicos os responsáveis, nos primeiros instantes após a implantação, pelo sucesso ou fracasso do dispositivo.

A modificação dos stents foi efectuada por pulverização catódica, depositando filmes finos com cerca de 500 nm de espessura a partir de alvos de aço inoxidável 316L e poli(tetrafluoroetileno) (PTFE). Os filmes estudados possuíam diferentes teores de flúor e a influência da concentração deste elemento foi estudada no que concerne a molhabilidade superficial, estrutura, morfologia e comportamento em soluções de albumina sérica bovina (BSA) e trombina bovina. O estudo incidiu no comportamento destas proteínas, isoladas e em conjunto, quer em condições estáticas quer em fluxo dinâmico.

O teor de flúor dos filmes finos é um dos factores decisivos no desempenho dos stents vasculares após modificação. Para teores superiores a $\approx 5\%$ atómico a quantidade deste elemento libertado para a solução é muito elevada, o que compromete a integridade estrutural do filme fino. Para as mesmas concentrações foi observado que há uma maior adsorção de proteínas, quando presentes em conjunto na mesma solução, em condições dinâmicas do que em estáticas. Em ambos os casos foi possível diferenciar o tipo de proteína nas superfícies em estudo, o que indicia a possibilidade de utilizar o microscópio electrónico de varrimento como primeira aproximação neste tipo de estudos. Deve ser salientado que mesmo nos casos de maior interacção proteínas/superfície, esta é sempre inferior à observada para o stent não revestido.

Os filmes finos, produzidos e caracterizados ao longo deste trabalho, parecem apontar que esta modificação superficial traz benefícios no que diz respeito à diminuição da restenose em stents vasculares fabricados em aço inoxidável 316L, podendo ainda ser encarados como uma alternativa mais económica aos stents com libertação controlada de fármacos.

Abstract

The aim of the present work is the study of the behaviour of blood proteins when in contact with vascular stents modified by the deposition of functionally graded thin films. The way these biological compounds interact with the surface of these implants is one of the key factors, as they are responsible, within seconds after implantation, for the success or failure of the medical device.

The surface of 316L stainless steel was modified by the deposition of 500 nm thick thin films from 316L and poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) targets using sputtering technique. The influence of the fluorine content of the films was evaluated in surface wettability, structure, morphology and in bovine serum albumin (BSA) and thrombin adsorption. The study targeted the behavior of these two proteins, isolated or together, both in static and dynamic conditions.

The fluorine content is a crucial factor in performance of vascular stents after modification. For content greater than $\approx 5\%$ atomic the amount of this element released to solution is very high, which compromises the structural integrity of the thin film. Moreover it was observed that there is an increased protein sorption, when they are present together in the same solution, in dynamic conditions than static conditions. In both cases it was possible to differentiate the type of proteins on surfaces, suggesting the possibility of use of scanning microscope as a first approximation in this kind of study. It must be noted that even in cases of greater protein/surface interaction, this is always less than the uncoated stent.

Thin films produced and characterized during this study suggests that this surface modification has benefits relatively to reduction of restenosis in stents made of 316L stainless steel and can be viewed as a cheaper alternative to drug eluting stents.

Índice

Índice de Abreviaturas.....	iii
Índice de Símbolos.....	iv
Índice de Tabelas.....	v
Índice de Figuras.....	vi
Introdução	1
Capítulo I – Revisão Bibliográfica.....	3
I.1 – Aterosclerose.....	3
I.2 – Stents.....	5
I.2.1 – Stents metálicos	7
I.2.2 – A superfície do biomaterial	11
I.2.3 – Modificação das propriedades da superfície	12
I.2.4 – Adsorção de proteínas	14
a) <i>Albumina</i>	17
b) <i>Trombina</i>	18
I.3 – Modificação de superfícies.....	20
Capítulo II – Materiais e Métodos	23
II.1 – Deposição dos filmes finos.....	23
II.1.1 – Pulverização catódica	23
II.1.2 – Procedimento	26
a) <i>Preparação das amostras</i>	26
b) <i>Deposição</i>	26
II.2 – Técnicas experimentais de caracterização	27
II.2.1 – Perfilometria	27
II.2.2 – Microsonda electrónica	29
II.2.3 – Microscopia electrónica de varrimento	30
II.2.4 – Determinação dos ângulos de contacto.....	31
a) <i>Determinação da tensão superficial crítica de molhagem</i>	33

b) <i>Determinação da energia superficial</i>	33
II.3 – Comportamento de proteínas em solução	34
II.3.1 – Preparação das soluções	34
II.3.2 – Metodologias aplicadas	35
a) <i>Estudo em condições estáticas</i>	35
b) <i>Estudo em condições dinâmicas</i>	35
II.3.3 – Caracterização das superfícies após imersão	36
a) <i>Morfologia e composição química</i>	36
b) <i>Difracção de raios X</i>	36
c) <i>Quantificação das proteínas</i>	38
Capítulo III – Resultados e Discussão	40
III.1 – Resultados da caracterização dos filmes finos	40
III.1.1 – Composição química	40
III.1.2 – Morfologia	41
III.1.3 – Molhabilidade	42
a) <i>Determinação da tensão superficial crítica de molhagem</i>	43
b) <i>Determinação da energia superficial</i>	46
III.2 – Estudo da adsorção de proteínas	46
III.2.1 – Difracção de raios X	47
III.2.2 – Espectrometria de visível	48
III.2.3 – Microscopia electrónica de varrimento	49
a) <i>Estudo em condições estáticas</i>	51
b) <i>Estudo em condições dinâmicas</i>	55
c) <i>Estudo em stent</i>	60
Conclusões	62
Referências Bibliográficas	63

Índice de Abreviaturas

a-C:H	<i>Carbono hidrogenado amorfo</i>
ADN	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
Arg	<i>Arginina</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CEMUC	<i>Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra</i>
CVD	<i>Chemical Vapour Deposition</i>
DRX	<i>Difracção de Raios X</i>
DES	<i>Drug-Eluting Stents</i>
EPMA	<i>Electron Probe Microanalysis</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gly	<i>Glicina</i>
ICDD	<i>International Center for Diffraction Data</i>
PLLA	<i>Poli(ácido L-láctico)</i>
PTFE	<i>Poli(tetrafluoroetileno)</i>
PVD	<i>Physical Vapour Deposition</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
STM	<i>Scanning Tunneling Microscopy</i>
XPS	<i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i>

Índice de Símbolos

γ_c	<i>Tensão crítica de molhagem</i>
γ_L	<i>Tensão superficial do líquido</i>
γ_L^d	<i>Componente dispersiva da tensão superficial do líquido</i>
γ_L^p	<i>Componente polar da tensão superficial do líquido</i>
γ_L^{pd}	<i>Componente da tensão superficial que provém do momento dipolar do líquido</i>
γ_L^{ph}	<i>Componente da tensão superficial que provém das pontes de hidrogénio do líquido</i>
γ_{Lv}	<i>Tensão superficial na interface líquido-vapor</i>
γ_s	<i>Tensão superficial do sólido (revestimento)</i>
γ_s^d	<i>Componente dispersiva da tensão superficial do revestimento</i>
γ_s^p	<i>Componente polar da tensão superficial do revestimento</i>
γ_{sl}	<i>Tensão superficial na interface sólido-líquido</i>
γ_{sv}	<i>Tensão superficial na interface sólido-vapor</i>
d	<i>Distância entre pontos cristalinos</i>
ΔG	<i>Varição da energia livre de Gibbs</i>
ΔH	<i>Varição da entalpia</i>
ΔS	<i>Varição da entropia</i>
λ	<i>Comprimento de onda</i>
n	<i>Número de ordem de difracção</i>
T	<i>Temperatura</i>
W^A	<i>Trabalho de adesão</i>

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Comparação entre stents de balão expansivo e auto-expansíveis	8
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos diferentes materiais utilizados no fabrico de stents metálicos	9
Tabela 3 - Propriedades mecânicas de alguns metais utilizados em stents	10
Tabela 4 - Supremacia dos stents de aço inoxidável 316L (aprovados pela Food and Drug Administration americana – FDA)	10
Tabela 5 - Vantagens e desvantagens da pulverização catódica	24
Tabela 6 - Condições de limpeza dos alvos e substratos	26
Tabela 7 - Condições utilizadas nas diferentes deposições	27
Tabela 8 - Condições de calibração e análise em microsonda	30
Tabela 9 - Valores da composição química e espessura dos filmes finos	40
Tabela 10 - Valores médios dos ângulos de contacto	42
Tabela 11 - Valores da tensão superficial dos líquidos utilizados nas avaliações dos ângulos de contacto	43
Tabela 12 - Valores da tensão crítica de molhagem (γ_c) dos filmes finos estudados	44
Tabela 13 - Valores de γ_s para os revestimentos e substrato e variação da energia livre para cada conjunto	46
Tabela 14 - Composição química dos filmes finos após imersão em solução com as proteínas em fluxo dinâmico	48
Tabela 15 - Percentagem de flúor libertada para o meio aquoso	48

Índice de Figuras

Figura 1 - Desenvolvimento da aterosclerose.....	3
Figura 2 - Comparação entre angioplastias - a) procedimento de uma angioplastia sem colocação do stent, b) procedimento de uma angioplastia com colocação do stent.....	4
Figura 3 - Processo de adsorção da proteína	16
Figura 4 - Esquema do Efeito de Vroman.....	16
Figura 5 - Modelo 3D da albumina sérica	18
Figura 6 - Processo de formação de trombina	19
Figura 7 - Câmara de deposição com dois cátodos.....	24
Figura 8 - Equipamento utilizado na deposição dos filmes finos.....	25
Figura 9 - Esquema do equipamento de avaliação de rugosidades.....	28
Figura 10 - Exemplo de avaliação por profilometria	29
Figura 11 - Microsonda electrónica	30
Figura 12 - Microscópio electrónico de varrimento.....	31
Figura 13 - Ângulo de contacto entre uma gota de líquido e uma superfície sólida	32
Figura 14 - Goniómetro	32
Figura 15 - Esquema de um difractor de raios X.....	37
Figura 16 - Difractor de raios X.....	38
Figura 17 - Morfologia superficial dos filmes finos após deposição a) 316L, b) F0, c) F5, d) 20 e e) F50.....	41
Figura 18 - Determinação dos ângulos de contacto de cada superfície com água. a) F0, b) F5, c) F20 e d) F50.....	42
Figura 19 - Relação entre os ângulos de contacto estáticos dos filmes finos em água com as respectivas densidades de potência de deposição do PTFE	43
Figura 20 - Gráfico de Zisman para os filmes finos estudados.....	44
Figura 21 - Relação entre a tensão crítica de molhagem e a quantidade de flúor presente nas amostras.....	45
Figura 22 - Correlação entre o valor de γ_c de uma superfície sólida e a sua interacção biológica	45
Figura 23 - Difractograma de BSA em pó	47

Figura 24 - Imagens SEM das superfícies após imersão com água desionizada. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20 e e) F50	50
Figura 25 - Morfologia das proteínas em estudo. a) BSA e b) Trombina	51
Figura 26 - Morfologia superficial após imersão estática em solução de BSA. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20 e e) F50.....	52
Figura 27 - Morfologia superficial após teste estático com trombina. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20, e) F50.....	53
Figura 28 - Morfologia superficial após o teste de imersão estático numa solução com BSA e trombina. a)316L, b)F0, c) F5, d) F20 e e) F50.....	54
Figura 29 - Morfologia superficial das superfícies após testes com solução de BSA em condições dinâmicas. a) 316L, b)F0, c) F5, d) F20 e e) F50	56
Figura 30 - Morfologia superficial após a imersão em solução com ambas proteínas em condições dinâmicas. a) 316L, b)F0, c) F5, d) F20 e e) F50	57
Figura 31 - Visualização 3D das proteínas sorvidas em condições dinâmicas em cada superfície. a) 316L, b) F0, c)F5, d) F20 e e) F50.....	59
Figura 32 - Morfologia superficial dos stent após teste em fluxo dinâmico com as duas proteínas. a) 316L, b) F5.....	60
Figura 33 - Morfologia superficial do stent. a) morfologia superficial da zona curva do stent modificado com F5 e b) ampliação da zona com adsorção da proteína.....	60
Figura 34 - Micrografias da superfície do stent de aço 316L não revestido onde é possível observar duas morfologias distintas de proteínas.....	61

Introdução

A aterosclerose, que afecta parte da população mundial, é um termo geral relativo a diversas doenças onde é observado o espessamento e perda de elasticidade da parede arterial. Actualmente os maus hábitos alimentares, aliados à sedentarização, podem levar à ocorrência de elevados níveis de colesterol na corrente sanguínea. Este facto aumenta o risco de obstrução dos vasos sanguíneos, limitando o fluxo do sangue para o coração.

Os stents são redes, normalmente de ligas metálicas, que servem para desobstruir os vasos sanguíneos. O principal problema da utilização destes dispositivos, e que está associado à implantação de qualquer biomaterial no corpo humano, é a reacção adversa que o organismo pode ter, impedindo o correcto funcionamento de próteses e implantes. No caso específico dos stents vasculares, a falha mais comum relativa ao seu desempenho é a restenose. Este fenómeno consiste essencialmente no crescimento anormal das células do músculo liso da zona intermédia dos vasos sanguíneos, o que induz novamente a diminuição do diâmetro do vaso. Ocorre em cerca de 30-40% dos pacientes que recebem stents vasculares, obrigando a nova intervenção cirúrgica. Com o objectivo de tentar reduzir a taxa de ocorrência de restenose, desde já há algum tempo que outros trabalhos seguem linhas de investigação, onde, mantendo as propriedades do material base que constitui os stents, tentam modificar as suas propriedades superficiais. Deste modo, procuram minimizar as reacções adversas que se iniciam aquando da implantação do stent e que culminam com a explantação do mesmo. Dos estudos efectuados, um dos pontos de concordância é que o iniciar de todo o processo de rejeição começa com a adsorção de determinado tipo de proteínas na superfície do implante. Por este motivo, é de todo o interesse estudar o comportamento de proteínas em solução, na presença de stents cuja superfície foi modificada e compará-lo com os stents não modificados.

No CEMUC tem-se vindo a desenvolver, trabalho científico nesta área e que culminou com a modificação de stents vasculares de aço inoxidável 316L (os mais comuns), através da deposição de um filme fino a partir de dois materiais distintos: o aço inoxidável 316L e o poli(tetrafluoroetileno) (PTFE). O estudo conseguiu a deposição de filmes finos em gradiente de funcionalidade, isto é, junto à superfície do stent em aço os filmes apresentavam características essencialmente metálicas e, ao longo da sua espessura, essas características diminuía e assumiam características mais semelhantes às do polímero. Desta forma, foi assegurada a adesão do revestimento ao stent de aço, e tornou-se a sua superfície mais compatível com a do tecido biológico. Os revestimentos então desenvolvidos foram exaustivamente caracterizados no que concerne a composição química, gradiente de composição química, morfologia, estrutura e propriedades mecânicas. No entanto, o seu comportamento em soluções proteicas não foi avaliado e, de acordo com o referido, este é sem dúvida um dos aspectos fundamentais, para que o tipo de modificação efectuada nos stents vasculares possa ser considerado como adequado para a utilização final.

Assim, o objectivo deste trabalho centrou-se no estudo da adsorção de proteínas (albumina e trombina), em superfícies de aço inoxidável 316L modificadas com um filme fino com gradiente de funcionalidade, tendo em vista a utilização deste filme como revestimento de stents coronários. O comportamento das espécies biológicas foi avaliado isoladamente e com as duas proteínas em simultâneo, tanto em testes em condições estáticas como em estudos dinâmicos. Paralelamente ao estudo da adsorção das proteínas, procurou-se um método rápido, fácil e económico para identificar e distinguir as proteínas sem o recurso a marcadores radioactivos.

A seguir a esta breve introdução, encontra-se a tese dividida em três capítulos. No primeiro é efectuado uma exposição sobre o trabalho de outros investigadores no que respeita a stents, modificação das suas superfícies e interacção destes em sistemas biológicos. No Capítulo II encontra-se o essencial sobre as técnicas de deposição e de caracterização utilizadas. No terceiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados. Finalmente a tese apresenta as conclusões mais significativas do trabalho desenvolvido.

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

I.1 – Aterosclerose

A aterosclerose é um termo geral que designa várias doenças onde se observa o espessamento e a perda de elasticidade da parede arterial. O tipo mais frequente é aquele no qual compostos designados vulgarmente por gordura, como é o caso do colesterol, se acumulam por baixo do revestimento interno da parede do vaso sanguíneo podendo levar à sua obstrução [1]. A aterosclerose das artérias coronárias pode dar origem a anginas no peito, enfartes do miocárdio, arritmias e insuficiência cardíaca [2].

O despoletar do problema está associado ao percurso dos monócitos, quando estes passam da circulação sanguínea para o interior da parede dos vasos e se transformam em células armazenadoras de substâncias gordas. Este fenómeno induz o espessamento de algumas zonas do revestimento interno das paredes [1] de acordo com o esquematizado na Figura 1.

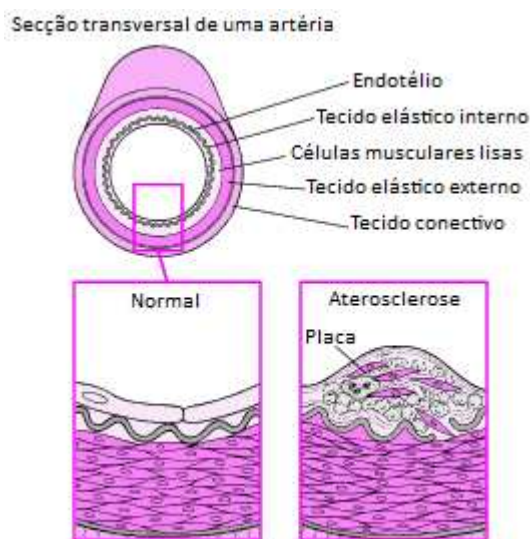


Figura 1 - Desenvolvimento da aterosclerose [1]

Esta situação clínica, se detectada a tempo, pode eventualmente ser resolvida através da administração de fármacos, nomeadamente os que diminuem a viscosidade do sangue. No entanto, na maior parte dos casos quando a doença é detectada, apenas se pode intervir de modo a desobstruir o vaso comprometido, como é o caso da intervenção designada por angioplastia. Esta diz-se percutânea, quando o tratamento é feito através da pele,

transluminal, quando é feito dentro do vaso sanguíneo, e coronária quando é relativa ao coração [3]. Contudo a sua eficácia está limitada à ocorrência de restenose (reoclusão do vaso sanguíneo) que pode ocorrer entre 30-60% dos casos. Com o intuito de diminuir este valor, procede-se clinicamente à implantação de stents, que são redes que servem para manter o interior do vaso aberto e o fluxo sanguíneo normal. Assim, com estes dispositivos a taxa de ocorrência de restenose situa-se entre 15-30% dos implantes [4]. A Figura 2 esquematiza a diferença entre os dois tipos de procedimento. Na angioplastia tradicional um cateter com um pequeno balão é inserido no vaso obstruído. Em seguida o balão é inflado e esvaziado várias vezes até que o bloqueio seja comprimido e o vaso esteja desobstruído, sendo posteriormente retirado o balão. O processo de colocação de stents é uma angioplastia, semelhante à descrita anteriormente, com a diferença que em torno do balão se encontra um stent. Este dispositivo permanece no vaso para o manter aberto após a remoção do balão [5].

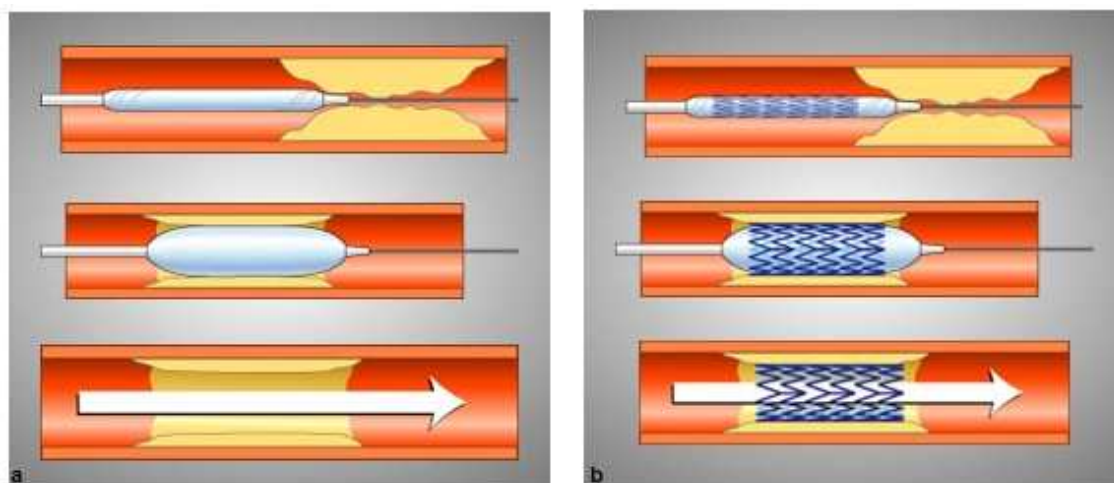


Figura 2 - Comparação entre angioplastias - a) procedimento de uma angioplastia sem colocação do stent, b) procedimento de uma angioplastia com colocação do stent [5]

A restenose deve-se a vários factores tais como: a complexidade da lesão, a diabetes, o sexo e a geometria e o tipo de material do stent. O processo de restenose pode ser caracterizado em três fases distintas: perda prematura devido à recuperação elástica do dispositivo, perda tardia devida à remodelação negativa do vaso sanguíneo e hiperplasia gradual da neointima. A primeira etapa é um efeito mecânico que ocorre logo após a intervenção e que está relacionado com o material e a geometria do stent, pois em vez de o dispositivo se deformar plasticamente, deforma-se elasticamente o que conduz à recuperação da sua forma inicial. A remodelação do vaso é um processo pouco conhecido no qual miofibroblastos adventícios respondem a sinais inflamatórios que presumivelmente surgem devido à formação de um trombo e do tipo de proteínas que eventualmente se liga à superfície do stent. A neointimização é o último evento na restenose sendo também o que mais contribui para a oclusão do vaso e que consiste numa proliferação anormal das células constituintes da parede sanguínea no sentido da corrente sanguínea [6].

I.2 – Stents

Os stents são redes tubulares, normalmente feitas de ligas metálicas, cuja função é desobstruir o vaso sanguíneo, mantendo o lúmen arterial aberto (através de pressão mecânica). O seu uso começou no final da década de sessenta através de Dotter que, para combater o elevado índice de restenose que se seguia à angioplastia, propôs um implante de uma prótese endovascular que promovesse a sustentação da parede do vaso após a intervenção [7]. A sua denominação provém do dentista Charles Thomas Stent (1807-1885), que criou um material moldável cuja finalidade era manter na posição correcta, enxertos de pele na cavidade oral e por semelhança, este tipo de prótese recebeu o nome de stent [7,8].

Apesar da técnica de Dotter não ter obtido grandes repercussões nos Estados Unidos, esta não foi esquecida, tendo sido empregue e modificada em vários centros europeus. Em 1977 surgiu a técnica da angioplastia percutânea com balão para cirurgias cardiovasculares que revolucionou a área da cardiologia invasiva. Desde então foi observado um rápido crescimento tecnológico e um constante aperfeiçoamento neste campo. Em 1987 realiza-se com sucesso o primeiro implante de um stent numa artéria coronária humana [6,7,9]. No final da década de noventa, 35% das 900 mil intervenções percutâneas realizadas em todo o mundo anualmente foram feitas com recurso a stents [7].

O tratamento de doenças das artérias coronárias e periféricas usando stents metálicos tem sido o mais revolucionário e o mais rapidamente adoptado nas intervenções médicas nos dias de hoje. No entanto, surgiram argumentos que indicavam os benefícios de remover o stent após este ter feito a desobstrução, o que levou ao desenvolvimento de stents biodegradáveis [10]. O argumento mais óbvio é o que facto da presença de objectos estranhos no interior dos vasos estar associado a reacções inflamatórias, desenvolvimento progressivo da neointima, danificações no endotélio e risco de trombose. O primeiro stent biodegradável implantado em humanos foi feito com poli(ácido L-láctico) (PLLA) e os resultados reportados foram encorajadores [11]. Contudo, uma das grandes desvantagens neste tipo de stent é o tempo de degradação do dispositivo. Um estudo feito com stents de PLLA (Igaki-Tamai® *stent*) revelou que ocorria, em alguns casos, uma retracção muito significativa do stent o que o impedia de desempenhar a sua função. Noutros casos a retracção estabilizou rapidamente e ao fim de seis meses o desempenho foi satisfatório com um grau de hiperplasia inicial comparável aos stents metálicos. Ao fim de quatro anos, os dispositivos estavam completamente degradados, não tendo sido detectados novos desenvolvimentos de hiperplasia [10]. Stents de ferro puro e com ligas de magnésio também têm sido estudados, apresentando resultados promissores, sendo considerados como uma opção a utilizar em crianças cujos vasos sanguíneos estão em crescimento [12]. No entanto, a sua utilização ainda se encontra num estágio muito preliminar pois muitos dos efeitos de toxicidade local e sistémica, bem como o comportamento dos materiais resultantes da degradação ainda não

são totalmente conhecidos [13]. O stent biodegradável ideal deve degradar-se em componentes não tóxicos para o organismo e deve desaparecer dentro de meses a anos sem deslocamentos significativos do local de implantação [6]. Esta propriedade é essencial neste tipo de dispositivo uma vez que se este desaparecer antes do tempo pretendido, a artéria poderá voltar a fechar. O recurso a materiais degradáveis tem ainda muitos desafios pela frente, mas o principal é a falta de evidências clínicas que demonstrem vantagens claras para este tipo de abordagem. Os sistemas poliméricos enfrentam desafios específicos na tentativa de apresentarem a resistência adequada à retracção, bem como na redução dos tempos de degradação. Os stents de magnésio parecem ser os mais promissores nesta categoria cujos tempos de degradação estão próximos dos valores exigidos. Os stents feitos em ferro enfrentam grandes dificuldades, pois apesar de apresentarem resultados preliminares promissores, necessitam de demonstrar de forma inequívoca a aceitabilidade dos seus produtos de degradação [10].

Na tentativa de uma solução intermédia entre os stents metálicos e os biodegradáveis surgiram os stents com libertação controlada de fármacos “*drug-eluting stents*” (DES), que não são mais do que dispositivos metálicos revestidos com um polímero, que serve como reservatório para a libertação de fármacos com a finalidade de controlar a restenose [6]. Os fármacos mais utilizados são a rapamicina (sirolimus) e o paclitaxel cujos efeitos anti-proliferativos e anti-inflamatórios interferem no ciclo celular. O ciclo de formação e crescimento das células compreende quatro fases: a fase G1 onde ocorre crescimento celular, a fase S onde ocorre a duplicação do ADN, a fase G2 que é um intervalo entre a duplicação de ADN e a divisão celular e por fim chega o processo de divisão celular designado por fase M ou mitose. A rapamicina actua nos estádios iniciais do ciclo inibindo a passagem das células da fase G1 para a fase S. O paclitaxel trava o ciclo celular durante a fase M, prevenindo a migração das células musculares lisas constituinte da zona média dos vasos sanguíneos [8,11]. Este tipo de stent gera muita controvérsia a nível dos benefícios para o paciente pois, apesar de diminuir a ocorrência de restenose nos primeiros meses, induz um forte aumento do risco de trombose tardia [6]. A forma do stent é extremamente importante neste tipo de endoprótese uma vez que o fármaco deve ser libertado directamente na parede do vaso, o que implica que exista um contacto perfeito entre o stent e a parede. Se tal não se verificar, o fármaco vai ser libertado para o fluxo sanguíneo e não chegará às paredes do vaso nas quantidades e concentrações correctas [11]. Os DES ainda têm que enfrentar muitos desafios que incluem aspectos de engenharia, relativos à integridade e durabilidade dos revestimentos nos dispositivos, e também é necessário compreender e controlar os mecanismos cinéticos e farmacológicos destes sistemas de libertação de fármacos. Neste momento um dos maiores desafios centra-se na exploração de soluções para colocar os fármacos de forma a posteriormente haver uma libertação controlada dos mesmos. Para isso o desenvolvimento dos revestimentos deve ser feito em conjunto com o desenvolvimento das tecnologias para sistemas de colocação e libertação dos fármacos, tendo em conta que os medicamentos

utilizados devem maximizar o crescimento das células endoteliais e minimizar a proliferação das células do músculo liso [10].

Apesar de melhorar a evolução angiográfica e clínica dos pacientes, a ocorrência de restenose continua a ser o principal problema da utilização de stents [13]. Este problema pode ter origem em vários factores, sendo o mais frequente aquele que surge logo após a colocação do stent, devido ao crescimento de uma camada interna de tecido através da migração e proliferação do tecido muscular liso [14]. Diferentes materiais e modelos foram estudados de forma a optimizar estas endopróteses.

Segundo alguns autores, um stent ideal deverá possuir: elevada biocompatibilidade, para poder interagir com o meio biológico sem provocar efeitos adversos; elevada radiopacidade, para uma boa visualização, facilitando o implante; grande força radial, de modo a resistir à recuperação elástica; boa taxa de expansibilidade, de maneira a sofrer uma dilatação suficiente em conformidade com o vaso; sistema de implante simples e de fácil manuseio; flexibilidade, para poder passar por artérias de pequeno diâmetro e cruzar vasos tortuosos; resistência à compressão externa sem deformação permanente; pequeno perfil; resistência à trombose e à corrosão e baixo custo [8,13]. Sem dúvida que o material que é capaz de satisfazer o maior número destes requisitos é o aço inoxidável 316L

O tipo de stent utilizado neste trabalho é o stent metálico, desta forma, a secção seguinte apresenta algumas características sobre este tipo de endoprótese.

I.2.1 – Stents metálicos

Os stents metálicos são distintos entre si, nomeadamente, no que concerne ao mecanismo de implante (com balão ou auto-expansíveis), à geometria (configuração de células abertas ou fechadas), à composição química do metal ou liga metálica e à espessura do dispositivo. A Tabela 1 faz uma comparação entre os stents que necessitam de balão para expandir e os stents auto-expansíveis.

Tabela 1 - Comparação entre stents de balão expansivo e auto-expansíveis [8,9]

Balão expansivo	Auto-expansíveis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Construído num estado comprimido e é expandido ao diâmetro do vaso através do balão que é inflado, ocorrendo deformação plástica; ▪ Após a colocação, apenas consegue diminuir o seu diâmetro ao longo do tempo – recuo crónico; ▪ Colocado com maior precisão; ▪ Boa resistência à compressão radial; ▪ Pouca elasticidade; ▪ Resistente ao processo de expansão do balão; ▪ Bastante rígido; ▪ Não depende da temperatura; ▪ Normalmente feito de aço inoxidável 316L; ▪ Indicado para o eixo aorto-ilíaco, artérias renais, lesões ostiais da artéria subclávia e lesões nos orifícios dos troncos supra-aórticos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Construído com o diâmetro do vaso ou ligeiramente acima. Antes da implantação, é comprimido ao seu menor diâmetro. Ao ser ejectado, expande-se ao diâmetro do vaso previamente dilatado; ▪ Continua a abrir ao longo do tempo, sofrendo assim um recuo crónico negativo; ▪ Colocado com menor precisão; ▪ Muito flexível, o que permite a expansão a um diâmetro predeterminado; ▪ Pouca resistência à compressão radial; ▪ Menos rígido; ▪ Maleável a baixas temperaturas; ▪ Normalmente feito de ligas de Ni-Ti (Nitinol®); ▪ Indicado para o eixos aorto-ilíaco e femoro-poplíteo, carótidas e lesões não ostiais da artéria subclávia.

Quanto à geometria, um stent com uma configuração fechada não muda de forma mesmo quando este é flectido, por outro lado, o stent de configuração aberta altera a sua conformação, especialmente na zona de crescimento celular [11]. Por este motivo um stent com células fechadas, de maneira geral, tem a vantagem de conseguir uma cobertura mais uniforme do vaso, enquanto um stent com configuração aberta tem a seu favor o facto de possuir maior flexibilidade [8]. Convém utilizar stents com configuração fechada quando se pretende obter DES, uma vez que a configuração aberta pode promover uma libertação de medicamento de forma desregulada [11].

O stent pode ser feito de ligas metálicas como é o caso das ligas de aço inoxidável 316L, de platina-irídio (Pt-Ir), de Nitinol® (Ni-Ti) e de cobalto-crómio (Co-Cr), ou de metais como o tântalo (Ta), o titânio (Ti), o ferro (Fe) e o magnésio (Mg) sendo que estes dois últimos são encontrados nos stents metálicos biodegradáveis [13]. A Tabela 2 indica algumas vantagens e desvantagens de diferentes materiais utilizados em stents metálicos e na Tabela 3 estão listadas algumas das propriedades mecânicas desses materiais.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos diferentes materiais utilizados no fabrico de stents metálicos [6,11,13,15]

Metal	Prós	Contras
316L	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Boas propriedades mecânicas; ▪ Excelente resistência à corrosão; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Natureza ferromagnética; ▪ Baixa densidade; ▪ Reacções alérgicas devido à libertação de iões;
Pt-Ir	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Radiopacidade; ▪ Resistente à corrosão; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pobres propriedades mecânicas; ▪ Susceptível a reacções inflamatórias; ▪ Biocompatibilidade limitada;
Ni-Ti	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Boas propriedades mecânicas; ▪ Liga com memória de forma; ▪ Alguma resistência à corrosão; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Libertação de iões níquel; ▪ Efeitos tóxicos nos tecidos;
Co-Cr	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Boas propriedades mecânicas; ▪ Obtenção estruturas ultra-finas; ▪ Radiopacidade; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixa plasticidade; ▪ Baixa maquinabilidade;
Ta	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Excelente resistência à corrosão; ▪ Elevada densidade; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Propriedades mecânicas inadequadas; ▪ Fractura-se facilmente;
Ti	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Excelente resistência à corrosão; ▪ Excelente biocompatibilidade; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Propriedades mecânicas inadequadas; ▪ Baixa ductilidade;
Fe	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biodegradável; ▪ Boas propriedades mecânicas; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Degradação muito lenta;
Mg	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biodegradável; ▪ Promove vasodilatação das artérias; ▪ Baixo potencial trombogénico. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Propriedades mecânicas inadequadas (por isso não se utiliza Mg puro, mas ligas de Mg); ▪ Não é radiopaco.

Tabela 3 - Propriedades mecânicas de alguns metais utilizados em stents [13]

Metal	Módulo elástico (GPa)	Tensão limite de elasticidade (MPa)	Tensão rotura (MPa)	Densidade (g/cm ³)
316L	190	331	586	7,9
Ta	185	138	207	16,6
Ti	110	485	760	4,5
Ni-Ti	83 (fase austenítica) 28-41 (fase martensítica)	195-690 (fase autenítica) 70-140 (fase martensítica)	895	6,7
Co-Cr	210	448-648	951-1220	9,2
Mg	44	162	250	1,84

De acordo com o referido anteriormente, o material mais utilizado neste tipo de implantes é o aço inoxidável 316L (Tabela 4), pois alia o facto de possuir boas propriedades mecânicas a uma excelente resistência à corrosão. Em contrapartida, a sua natureza ferromagnética (60-65% Ferro) e a baixa densidade torna-o incompatível com a Imagiologia por Ressonância Magnética e pouco visível fluoroscopicamente [13]. A resistência à corrosão deve-se à existência de uma camada protectora de Cr₂O₃. Contudo, o crómio reduz a resistência mecânica, pois estabiliza a fase ferrítica que é mais frágil que a austenítica. De modo a anular este efeito, o teor de níquel é aumentado estabilizando a fase austenítica [16]. Por outro lado, a possível libertação de iões níquel, crómio e molibdénio para a corrente sanguínea pode conduzir a reacções alérgicas desencadeando reacções inflamatórias, que por sua vez podem induzir à hiperplasia da neointima e restenose [13].

Tabela 4 - Supremacia dos stents de aço inoxidável 316L (aprovados pela Food and Drug Administration americana – FDA) [13]

Nome do Stent	Fabricante	Metal	Data de aprovação
Biodiv Ysio™ AS	Biocompatibles Cardiovascular Inc. CA	Aço inoxidável 316L	Setembro/2000
BeStent™ 2	Medtronic, Inc., Minnesota	Aço inoxidável 316L	Outubro/2000
CYPHER™	Cordis Corporation, FL	Aço inoxidável 316L	Abril/2003
MULTI-LINK VISION™	Guidant Corporation, CA	Ligas de Cr-Co L-605	Julho/2003
NIRflex™	Medinol Ltd., Israel	Aço inoxidável 316L	Outubro/2003
TAXUS™ Express ² ™	Boston Scientific Corporation	Aço inoxidável 316L	Março/2004
Liberté™ Monorail™	Boston Scientific Corporation, MN	Aço inoxidável 316L	Abril/2005
Rithron-XR	Biotronik GmbH, Alemanha	Aço inoxidável 316L	Abril/2005

A espessura do stent está intimamente relacionada com a restenose e com o aumento da lesão. Aumentar a espessura, significa maior radiopacidade, maior força radial e melhor suporte arterial, mas também induz maiores danos na parede do vaso, dando origem a maior hiperplasia íntima. De acordo com a literatura há estudos que indicam que a taxa de restenose é bastante inferior em stents com espessuras finas [11].

De modo a contornar estas limitações, reduzir a libertação de iões metálicos, reduzir a trombogenicidade e melhorar a textura de forma a promover a endotelização, uma variedade de técnicas de tratamento de superfície e revestimentos têm sido estudados e testados [10]. Deve ser salientado que todas estas consequências negativas, advêm das reacções que ocorrem nos instantes iniciais após implantação entre o sistema biológico e a superfície do stent, pelo que é de todo o interesse aprofundar quais as propriedades/características da superfície que interessa considerar.

I.2.2 – A superfície do biomaterial

No contacto de um dispositivo metálico com a corrente sanguínea há uma série de acontecimentos que alteram a sua superfície, de modo a prepara-la para a colonização do tecido. De uma forma geral, logo após o implante ocorre a formação de um trombo e o aparecimento de uma inflamação aguda que provoca, posteriormente, a formação da camada neoíntima. O aumento da inflamação após a colocação do stent está associado à danificação da camada média dos vasos sanguíneos, pelo que o sucesso do implante depende da ocorrência de uma trombose mínima (ou em caso óptimo na sua ausência) e de uma rápida endotelização, isto é, um rápido revestimento da parede do stent por células endoteliais da parede mais interna do vaso. Logo após a intervenção cirúrgica ocorre dissecção da camada íntima e média. No local da dissecção, o fluxo sanguíneo torna-se turbulento devido às irregularidades da camada íntima, contribuindo para a deposição de plaquetas e fibrina o que induz a formação do trombo, a proliferação de fibroblastos e a hiperplasia da íntima [8].

Em qualquer esforço para minimizar estes problemas, há sempre que ter em consideração que o primeiro contacto entre um biomaterial e o corpo humano é feito exclusivamente através da superfície do implante. A sua topografia, carga eléctrica, energia livre e estabilidade química são factores essenciais a considerar na trombogenicidade e interacções com o tecido. Com efeito, estudos demonstraram que a taxa de trombose é elevada em superfícies rugosas, pelo que tipo de acabamento superficial é essencial nestas endopróteses. Por outro lado, as superfícies metálicas utilizadas neste tipo de implante possuem normalmente uma carga superficial electropositiva, enquanto os constituintes do sangue tendem a ser electronegativos. Como consequência, as proteínas, nomeadamente o fibrinogénio, são atraídos para as superfícies formando uma fina camada logo após o implante,

o que leva a uma maior probabilidade de formação de trombos. Por fim, a energia superficial bem como a estabilidade da composição química afectam a molhabilidade da superfície, tendo sido demonstrado que a trombogenicidade da superfície de um material aumenta com a energia da superfície e com a tensão superficial crítica de molhagem [8, 13].

Apesar de ainda não existirem fortes evidências científicas, os estudos efectuados indiciam fortemente que a optimização da superfície pode ajudar a reduzir a taxa de restenose em 20-30% comparativamente a stents não tratados [10]. Uma grande variedade de técnicas de modificação de superfície e revestimentos tem sido explorados, tendo como objectivos a redução da libertação dos iões metálicos, a redução da trombogenicidade da superfície e encontrar texturas que promovam a endotelização.

I.2.3 – Modificação das propriedades da superfície

De acordo com o referido anteriormente, os stents metálicos podem induzir o crescimento de tecido que dá origem a restenoses, formação de aneurismas e são susceptíveis de fracturar. Além disso, as suas extremidades podem originar traumas na parede do vaso o que provoca a estimulação da resposta celular resultando em hiperplasia da íntima e, uma vez mais, eventual restenose [17].

A prática de revestir estas endopróteses pode melhorar as propriedades da superfície de forma significativa. A energia de superfície pode ser reduzida, a textura nivelada e o potencial neutralizado de modo a aumentar a biocompatibilidade e hemocompatibilidade destes dispositivos [13]. Idealmente, o material a utilizar na modificação de stents deve ser resistente à trombose, mecanicamente estável e facilmente incorporado no tecido e não deve incentivar respostas proliferativas, inflamatórias ou degenerativas [8]. Outro factor a ter em conta é a integridade do revestimento, pois é crucial que este não perca a sua integridade aquando da implantação do dispositivo, nem quando em contacto com os fluidos biológicos [13].

Os materiais estudados como revestimento, e para os quais se obteve vários graus de sucesso, são de natureza diversa e incluem, mas não se limitam a:

- materiais inorgânicos: ouro [11, 13], carbono [10, 13], óxido de irídio [10, 13], carboneto de silício [10, 11, 12], tântalo [10] e Nitinol® [17];
- materiais poliméricos: poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) [8, 17, 18], poli(ácido láctico) [13], poli(éster) [8], poli(uretana) [19], poli(etileno teraftalato) [17], poli(n-butyl metacrilato) [20]) e ácido hialurónico [13];
- drogas farmacêuticas: heparina [8, 11, 13], paclitaxel [8,11,13] e sirolimus [8, 11, 13];
- material biológico: células endoteliais [13].

No entanto, a grande maioria destes materiais apresentam algumas desvantagens que impossibilitam a sua utilização como revestimento de stents metálicos. O ouro, apesar de biocompatível e apresentar uma boa radiopacidade, induz a activação de plaquetas e formação da neointima. No que concerne ao carbono, há controvérsias relativamente ao seu desempenho para a diminuição da restenose. A utilização do óxido de irídio, por promover a conversão de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, poderá ser um material vantajoso. Com efeito é espectável que possa reduzir as reacções inflamatórias consequentes da formação de peróxido de hidrogénio, que é um dos produtos de reacção da corrosão de alguns metais e ligas metálicas [13].

Quanto aos materiais poliméricos, um estudo com poli(uretana) revela bons resultados a nível da adsorção de proteínas [19], enquanto outro estudo com poli(n-butil metacrilato) parece indicar resultados promissores no que respeita à rápida re-endotelização nos dispositivos vasculares [20].

Em stents revestidos com heparina foram observados resultados favoráveis na redução da trombose e das respostas vasculares proliferativas [11, 13]. Sabe-se que este fármaco reduz a adesão dos leucócitos e plaquetas, o que diminui a coagulação, além de inibir a migração e proliferação das células do músculo liso [11].

Os stents actuais são normalmente revestidos com materiais poliméricos, mas o facto de as suas características serem bastante distintas das propriedades do metal, acaba por dar origem a um novo problema que se traduz na fraca adesão ao dispositivo. Muitas vezes o material polimérico desprende-se do stent antes de este chegar ao local correcto, o que pode acarretar complicações muito graves, em especial se o revestimento for também utilizado como suporte para a libertação de fármacos.

Tendo em consideração todos os estudos já efectuados na literatura, o Grupo de Nanomateriais e Microfabricação do CEMUC (Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra) tem vindo a desenvolver desde já algum tempo, revestimentos sobre a forma de filmes finos (espessura com cerca de 500 nm) com gradiente de funcionalidade para aplicações biomédicas, nomeadamente para o revestimento de stents vasculares. A inovação deste revestimento efectuado a partir de PTFE e aço inox 316L é ser metálico junto ao stent, adquirindo na sua superfície propriedades mais compatíveis com o tecido biológico. Deste modo consegue-se um compromisso óptimo entre a adesão do filme ao stent e uma melhor biocompatibilidade entre o filme e o tecido biológico.

A selecção dos materiais que constituem o filme foi efectuada tendo em consideração as propriedades/características de cada material individualmente. Assim, o PTFE é um polímero não biodegradável, quimicamente inerte [17] e com baixa energia superficial [13], o que limita o crescimento interno de tecido [8]. Enquanto revestimento, melhora a capacidade

de resistir à corrosão das ligas metálicas [21], possui uma superfície luminal electronegativa que o torna antitrombogénico [17] e apresenta excelentes propriedades tribológicas [22]. Além disso, estudos com stents de aço inoxidável revestidos com este polímero têm sido feitos, tendo-se obtido resultados bastante promissores [17]. Marin *et al.* avaliaram a relação entre o revestimento de PTFE e o desenvolvimento de hiperplasia da íntima através da colocação de stents em pacientes e concluíram que o diâmetro luminal médio no segmento revestido foi significativamente maior que no segmento não revestido, sugerindo que este tipo de revestimento pudesse evitar a restenose [18].

A escolha do aço inox 316L é intuitiva uma vez que se trata do mesmo material que constitui o stent a ser revestido. Deste modo, é assegurada a compatibilidade química entre o implante e o revestimento o que à partida, é uma garantia de adesão máxima.

Apesar do estudo da optimização dos parâmetros de deposição e da caracterização mecânica, física e química deste tipo de revestimento ter já dado origem a publicações científicas de investigadores do CEMUC [23, 24], nunca foi avaliado o seu comportamento aquando na presença de proteínas constituintes do fluxo sanguíneo. Este parâmetro é da máxima importância pois, de acordo com o explanado ao longo deste capítulo, a reacção adversa da nova superfície com este tipo de compostos biológicos pode inviabilizar a sua utilização na modificação dos stents vasculares.

1.2.4 – Adsorção de proteínas

In vivo, as propriedades mecânicas dos implantes são afectadas pelas interacções tecido-material, em particular pelas interacções com plaquetas, células do músculo liso e vários componentes da matriz extra-celular. Contudo, antes da chegada destes constituintes biológicos, a adsorção de proteínas pertencentes aos fluidos biológicos como o sangue, as lágrimas ou a urina ocorre instantaneamente [19]. Assim, as células vão interagir sobretudo com a camada proteica formada e não com o implante em si, o que torna o processo de adsorção numa etapa crítica para a biocompatibilidade do dispositivo [16]. A formação desta camada de proteínas pode ser benéfica para certas aplicações biomédicas, onde a imobilização de proteínas específicas e enzimas é necessária e desejável tais como, em imunoensaios e em biossensores. No entanto, para determinados dispositivos médicos em contacto com o sangue (como os stents, os cateteres e as válvulas cardíacas), a complexa camada de proteínas plasmáticas adsorvidas é normalmente desfavorável e pode, potencialmente, levar a maiores complicações como induzir a formação do trombo, respostas inflamatórias e infecções microbiais [25]. Deste modo, o estudo do comportamento da adsorção de proteínas em interfaces sólido-líquido é alvo de grande importância em aplicações biológicas,

nomeadamente nos implantes médicos, pelo que a investigação da adsorção de proteínas na superfície dos implantes precisa de ser criticamente avaliada [26].

A adsorção apenas pode ocorrer se a termodinâmica do processo o permitir, ou seja quando a variação da energia livre de Gibbs é negativa (Equação 1) indicando que o processo atingiu o patamar mais estável e com menor energia [16].

$$\Delta G_{ads.} = \Delta H_{ads.} - T\Delta S_{ads.} < 0 \quad \text{Equação 1}$$

Na equação acima a variação da energia livre de Gibbs ($\Delta G_{ads.}$) é dada pela variação da entalpia ($\Delta H_{ads.}$), temperatura (T) e variação da entropia ($\Delta S_{ads.}$).

A adsorção de proteínas é um processo molecular dependente do tempo e é fortemente dependente das propriedades da interface, do solvente e das proteínas envolvidas. A maioria das proteínas têm estruturas 3D bem definidas e as interações com a interface após a adsorção causam deformações estruturais que podem resultar em consequências biológicas adversas [19].

As proteínas são biopolímeros complexos constituídas por quatro níveis estruturais, designados por estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária compreende a sequência específica dos 20 L-aminoácidos codificados pelo ADN celular. A organização desta cadeia polipeptídica primária em α -hélices, folhas- β e "loops" que ligam estes dois elementos, constitui a estrutura secundária. Os elementos da estrutura secundária ao organizarem-se em conjunto formam a estrutura terciária. Finalmente, quando existe mais que uma cadeia polipeptídica organizada ocorre a formação da estrutura quaternária. Neste tipo de estrutura, cada cadeia polipeptídica possui um terminal inicial (N-terminal) e um terminal final (C-terminal) que estão respectivamente carregados positivamente e negativamente [27].

Quando uma molécula é adsorvida podem ocorrer diversos fenómenos: desorção, ocorrência de difusão superficial, ou processos de relaxação de modo a que a energia do sistema diminua. A relaxação pode ocorrer sob a forma de alterações conformacionais que levam ao aumento da área de contacto entre a molécula e a superfície. Devido a estas alterações, a forma e dimensão das moléculas podem ser diferentes daquelas que apresentavam em solução. Se estas alterações forem permanentes, diz-se que a proteína foi desnaturada [16]. A Figura 3 esquematiza de uma forma geral, o processo de adsorção de uma proteína pela superfície. Neste modelo, P indica a concentração da proteína na solução, $P \cdot S$ é a concentração da proteína adsorvida de forma reversível e $\overline{P} \cdot \overline{S}$ a concentração da proteína adsorvida de forma irreversível, k_d , k_i e k_f são as constantes que indicam as taxas de reacção directa, inversa e final (irreversível) [27].

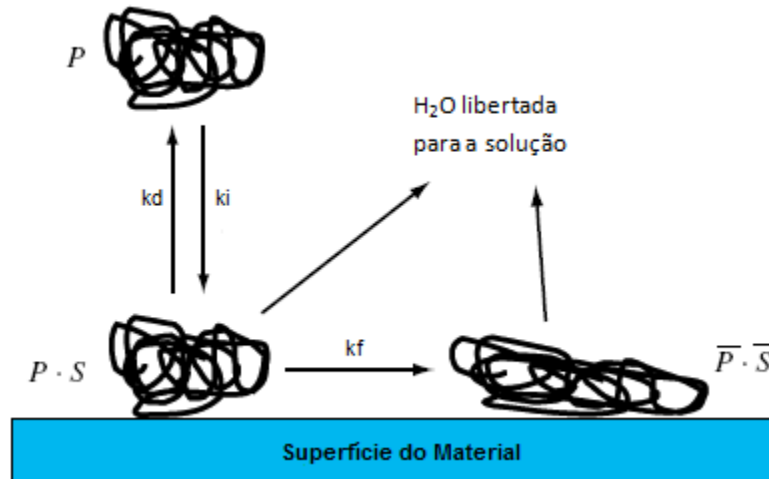


Figura 3 - Processo de adsorção da proteína (adaptado [27])

Se existirem várias espécies proteicas em solução (como no caso do sangue) o processo de adsorção é mais complexo, uma vez que há competição entre as diferentes proteínas na reação com a superfície. Em determinadas situações pode ocorrer o denominado *Efeito de Vroman*, no qual as proteínas de menor peso molecular são adsorvidas primeiro, mas posteriormente, vão sendo substituídas por proteínas com maior peso molecular e maior afinidade com a superfície (Figura 4) [16, 27].

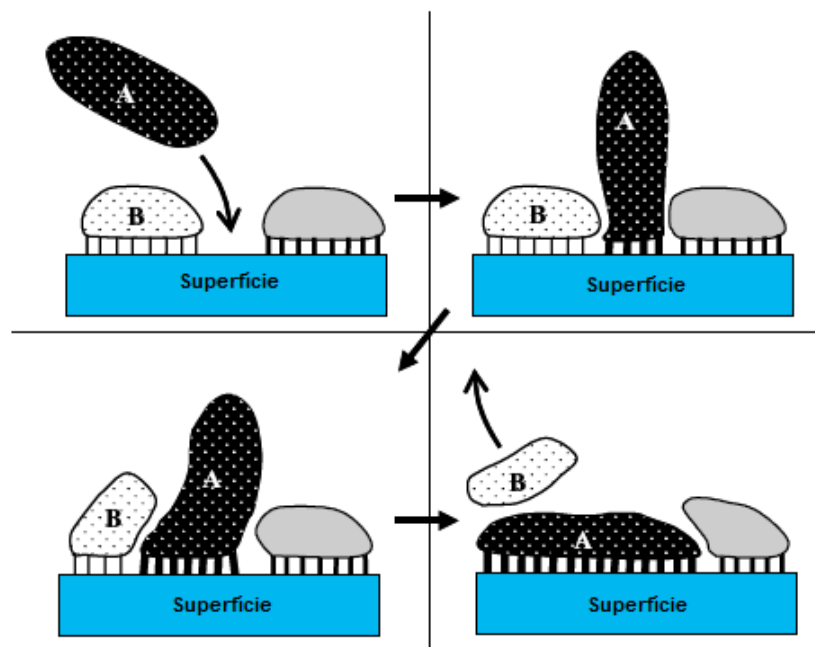


Figura 4 - Esquema do Efeito de Vroman (adaptado de [27])

A obtenção de superfícies resistentes à formação do trombo é feita através da inibição por meio de três processos: inibição da adsorção de proteínas, inibição da formação da trombina e inibição directa da adesão e agregação das plaquetas [19]. Um estudo de adsorção de proteínas em amostras de aço inoxidável 316L modificadas concluiu que a adsorção de proteínas é muito menor em superfícies lisas e hidrófilas, quando comparadas com superfícies rugosas e hidrófobas [28].

No caso específico de stents vasculares, a sua interacção com as diferentes proteínas do sangue constitui um aspecto crítico para o sucesso do dispositivo. Existem proteínas que podem ser consideradas “amigáveis”, uma vez que a sua adsorção pela superfície não interfere no funcionamento do dispositivo. Por outro lado, há proteínas que são “não amigáveis” e que não devem ser adsorvidas pela superfície do stent, uma vez que podem desencadear reacções adversas.

Em seguida é apresentado um resumo das duas proteínas utilizadas neste estudo: a albumina e a trombina. A escolha da albumina deve-se à sua importância no organismo humano, uma vez que é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo (cerca de 60% de todas as proteínas) e ser considerada uma proteína “amigável”. A trombina é uma proteína que esta relacionada com o processo de formação de trombos, sendo por este motivo considerada uma proteína “não amigável”, daí a sua inclusão no estudo.

a) Albumina

Como foi já referido, a albumina é a proteína mais abundante existente no plasma sanguíneo (cerca de 60%) [25, 29]. É uma proteína globular com dimensões $15 \times 3,8 \times 3,8$ nm³, peso molecular de 66,3 kDa e a sua concentração no plasma é cerca de 40g/L. É produzida no fígado e a sua função está relacionada com o transporte de ácidos gordos (que são insolúveis no plasma) para os tecidos e com a regulação da pressão osmótica sanguínea [16, 19]. A estrutura primária desta proteína é composta por uma sequência de 585 aminoácidos. No estado sólido a estrutura terciária confere à albumina uma forma semelhante a um coração (heart-shape) (Figura 5) ou um triângulo equilátero, constituída por três domínios homólogos (denominados por I, II e III) que possuem um certo grau de liberdade de movimento entre si e que é devida à dobra das suas cadeias polipeptídicas em três domínios α -hélice [16, 25]. As estruturas em α -hélice constituem 67% da estrutura secundária desta proteína. Se no estado sólido esta proteína apresenta consenso relativamente à sua estrutura terciária, o mesmo não acontece quando se encontra em solução. Embora alguns autores indiquem que em solução neutra a estrutura da albumina é semelhante à do estado sólido, outros afirmam que adquire uma forma elipsóide [16].



Figura 5 - Modelo 3D da albumina sérica [25]

Devido à sua elevada concentração no sangue e de acordo com as leis de massa e de transporte, esta proteína é a primeira a chegar à superfície do implante, pelo que o seu papel é primordial na adsorção inicial de proteínas na superfície de implantes [25].

A organização molecular da camada proteica adsorvida é controlada pela composição química e pela topografia da superfície do implante. Contudo, há controvérsia no que respeita ao tipo de superfícies que potenciam a adsorção da albumina. Alguns estudos indicam que a albumina adsorve preferencialmente em superfícies lisas, outros referem que a taxa de adsorção aumenta em superfícies porosas, quando comparadas com as primeiras [30]. Norde *et al.* estudaram as alterações conformacionais da BSA provocadas pela adsorção e concluíram que em silício (superfície hidrófila) ou após dessorção desta superfície, a proteína mantém a sua estrutura conformacional, enquanto que a adsorção em poli(etileno) (superfície hidrófoba) provoca alterações permanentes, isto é, desnaturação [16].

Além das vantagens já enunciadas sobre a adsorção amigável da albumina há estudos que indicam que a adsorção de albumina na superfície do dispositivo inibe a formação de trombos [29].

b) Trombina

A trombina é a proteína mais proeminente da família das proteases serinas e como tal, quebra ligações que envolvam o aminoácido arginina [31]. O seu peso molecular é de 36 kDa e é constituída por duas cadeias polipeptídicas (A e B) que estão unidas por meio de uma ligação dissulfeto [32]. A cadeia A possui 49 aminoácidos e a B tem 259 aminoácidos. Esta proteína depende do pH estando activa em meios com pH 5 – 10, o seu pH óptimo catalítico é de 8,3 e

precipita para valores de pH inferiores a 5. *In vivo* a forma predominante desta proteína é a protrombina que é produzida no fígado e em condições normais a sua concentração no plasma sanguíneo é de 5 -10 g/L [33].

A principal função da trombina é a conversão do fibrinogénio em fibrina, que em combinação com plaquetas do sangue, forma um coágulo que está na origem dos trombos [31, 34]. A conversão é feita através da quebra selectiva das ligações Arg-Gly existentes no fibrinogénio [20]. A trombina é formada a partir da protrombina por meio de um factor de activação (factor Xa) que quebra sucessivamente duas ligações peptídicas desta proteína, constituída por uma única cadeia polipeptídica com aproximadamente 608 aminoácidos e três cadeias de oligossacarídeos [31]. Há evidências que a trombina durante o processo da cascata de coagulação pode acelerar o seu processo de formação activando factores específicos e que na presença de cálcio esteja envolvida na activação de outros factores de coagulação (factor V e factor VIII) [32].

Em condições normais, a protrombina é transformada em trombina apenas quando ocorre lesão de tecidos e/ou do sistema circulatório pelo que a fibrina e os trombos apenas são formados como consequência de um fenómeno hemorrágico [34]. Desta forma, é importante que o stent não adsorva a trombina de modo a evitar a formação de coágulos e reoclusão do vaso sanguíneo. A Figura 6 esquematiza, de uma genérica, o processo de formação de trombina.

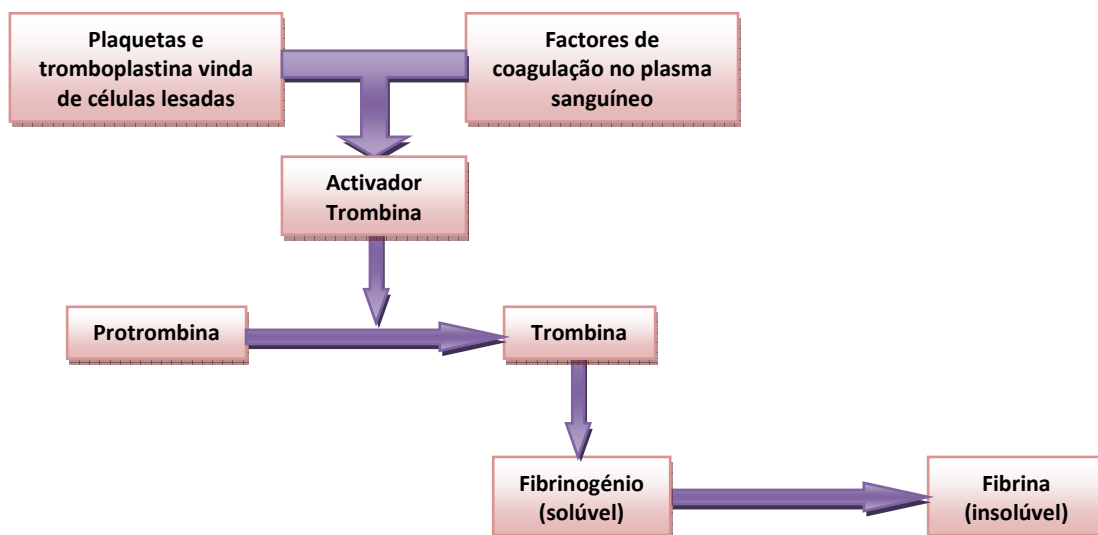


Figura 6 - Processo de formação de trombina

I.3 – Modificação de superfícies

Em conformidade com todo o enquadramento feito nos sub-capítulos anteriores, quando se aborda as interacções entre um dispositivo implantável e o tecido biológico, deve-se considerar não só as propriedades do implante enquanto maciço (propriedades que assegurem o desempenho global satisfatoriamente), mas também a resposta imediata que o organismo dá a superfície do “material invasor”. Em muitos casos, nos quais se incluem os stents vasculares, o material escolhido para a manufactura do dispositivo não consegue apresentar as propriedades/características necessárias para cumprir ambas as vertentes enunciadas. Por este motivo, surge a necessidade de modificar a superfície do material base, de modo a conseguir a melhor resposta como um todo, e na sua interacção superficial.

De uma maneira geral, define-se modificação de superfícies como um “*modo de adaptação das propriedades da superfície às solicitações do serviço*”. Assim, os processos de modificação têm como fim a melhoria das propriedades mecânicas e/ou de biocompatibilidade das superfícies dos implantes, pois estas desempenham um papel crucial na resposta dos organismos. A adaptação pode ser feita através do tratamento da superfície ou por meio de revestimentos. Existe uma grande variedade de processos de revestimento (químicos e físicos) que podem ser utilizados consoante os materiais e os resultados pretendidos. Para a modificação de superfícies metálicas os métodos mais utilizados são os seguintes: deposição química em fase de vapor (*Chemical Vapour Deposition - CVD*), deposição física em fase de vapor (*Physical Vapour Deposition - PVD*), deposição iónica e descarga de plasma [16, 35].

O CVD é um processo em que ocorrem reacções químicas entre a superfície do substrato e os reagentes gasosos, resultando na deposição de compostos não voláteis [16]. A reacção é activada pelo fornecimento de energia térmica [35].

No PVD o material a ser depositado é extraído de uma fonte e acumula-se no substrato formando a camada de revestimento [16]. A técnica de pulverização catódica (*sputtering*) e evaporação encontram-se nesta categoria [35].

A deposição iónica é uma técnica onde há formação de iões do material de revestimento num canhão de iões que os impele na direcção do substrato para formar o revestimento [35].

A descarga de plasma (*plasma glow discharge*) é uma técnica de limpeza e modificação de superfícies efectuada a baixa temperatura e a baixa pressão. Durante o tratamento pode ocorrer oxidação ou nitruração consoante o gás utilizado no bombardeamento da superfície (Ar, O₂, N₂) [16].

Por meio das técnicas de deposição e através da selecção dos parâmetros de deposição, é possível criar materiais com praticamente, todas as propriedades desejadas. Através da alteração dos parâmetros adequados é possível, para um material com a mesma composição química, obter estruturas cristalinas com tamanhos de grãos variáveis e diferentes orientações cristalinas preferenciais e até estruturas amorfas [35].

Neste trabalho foi usado um método de modificação PVD, mais propriamente a técnica de pulverização catódica. No Capítulo II esta técnica será abordada com mais detalhe. A pulverização catódica é um dos processos de deposição mais utilizados para a obtenção de filmes finos. A sua grande popularidade deve-se à simplicidade que envolve este processo físico, à sua versatilidade, à sua flexibilidade para alterações e normalização dos parâmetros de deposição e à sua vertente ecológica uma vez que se trata de um processo ambientalmente limpo [36]. No caso específico do uso desta técnica para a modificação da superfície de biomateriais, apresenta ainda a vantagem de o material já se encontrar esterilizado quando sai da câmara de deposição.

Apesar da deposição de filmes finos com gradiente de funcionalidade para stents vasculares apenas se encontrar descrito na literatura por investigadores do CEMUC, estudos com objectos semelhantes ao deste trabalho e que utilizam a técnica de pulverização catódica foram já efectuados com recurso a outros materiais. Materiais como o titânio e carbono hidrogenado amorfo (a-C:H) foram depositados em amostras de silício para avaliar a adsorção inicial de proteínas [37].

Um estudo utilizando filmes finos de Nitinol®, depositado através de pulverização catódica em estruturas tridimensionais, revelou que apesar de algumas dificuldades a nível da obtenção de filmes homogéneos (sem fissuras ou diferentes níveis de rugosidade), esta metodologia é particularmente útil no desenvolvimento de dispositivos médicos empregues em pequenos vasos sanguíneos [38].

Karagkiozaki *et al.* estudaram filmes finos de nitreto de titânio utilizando diversas condições de deposição de modo a adaptar a suas propriedades e funcionalidades, nomeadamente a nível da diminuição da trombogenicidade e consequente melhoria da hemocompatibilidade dos stents com resultados bastante promissores [39].

Esta técnica de revestimento também foi a escolhida pela BioDiamond para revestir stents de aço inoxidável 316L com filmes finos de carbono do tipo diamante (*Diamond-like*) [40]. A mesma técnica foi a eleita pela Isoflux Inc. para estudar o efeito de um revestimento de tântalo em stents de Nitinol® que revelou ser resistente à corrosão e que ao mesmo tempo mantém as propriedades do stent inalteradas [41].

Um dos materiais a ser considerado para a modificação de stents vasculares é o PTFE devido às suas propriedades de inércia química. No entanto, um dos principais problemas da deposição de filmes de PTFE em superfícies de aço inoxidável é a fraca adesão destes à superfície do substrato o que provoca a falha catastrófica do revestimento. Para contornar este problema Liu *et al.* depositaram e testaram filmes co-depositados a partir de alvos de titânio e de PTFE em superfícies de aço inoxidável, através da técnica de pulverização catódica, obtendo resultados promissores [22]. No entanto, a compatibilidade química entre substrato e filme fino não é assegurada uma vez que nenhum dos materiais utilizados é o aço inoxidável 316L, material constituinte do stent vascular.

No presente trabalho a modificação da superfície de aço 316L foi efectuada pela deposição, com recurso á técnica de pulverização catódica, de filmes finos a partir de alvos de aço 316L e PTFE. Deste modo o stent e o filme fino apresentam um contínuo de composição química que assegura uma adesão óptima entre substrato e revestimento, pelo que o stent revestido funciona como um todo e não como o somatório de dois materiais distintos.

Capítulo II – Materiais e Métodos

II.1 – Deposição dos filmes finos

II.1.1 – Pulverização catódica

A pulverização catódica (do inglês “*sputtering*”) é um processo físico onde há a ejeção atomística do material, designado por alvo, que é depositado sob a forma de um filme fino na superfície a revestir, designada por substrato. Este processo ocorre através do bombardeamento da superfície do alvo (polarizado negativamente) com iões gasosos (Ar^+) sob elevada tensão de aceleração, numa câmara em vácuo e que utiliza baixas pressões de trabalho.

Este processo encontra-se inserido na categoria de deposição física em fase vapor (“*Physical Vapour Deposition*” - PVD) e a deposição dos revestimentos compreende três fases:

- Transformação do material a depositar para a fase gasosa;
- Transporte do vapor entre a fonte e o substrato;
- Condensação do vapor à superfície do substrato e respectiva formação de revestimentos [35].

Quando numa atmosfera rarefeita se aplica uma diferença de potencial de algumas centenas de Volt entre o cátodo (alvo) e o ânodo (porta-substratos), estabelece-se entre eles uma descarga eléctrica luminosa (plasma). Nestas condições é possível, dentro de uma câmara de deposição, acelerar os iões originados pela descarga e orientá-los no sentido do cátodo, recorrendo-se ao efeito do campo eléctrico induzido. Inversamente, os electrões dirigem-se para o espaço inter-eléctrodos e ao colidirem com os átomos do gás ionizam-nos positivamente. Os iões ao chocarem com o cátodo ejectam átomos do alvo em todas as direcções, que se depositam em todos os obstáculos que encontrarem, e ao mesmo tempo libertam ainda mais iões que alimentam a ionização do gás [42]. O esquema que se segue (Figura 7) é o de uma câmara de deposição com dois cátodos, que é o tipo de câmara utilizado neste trabalho.

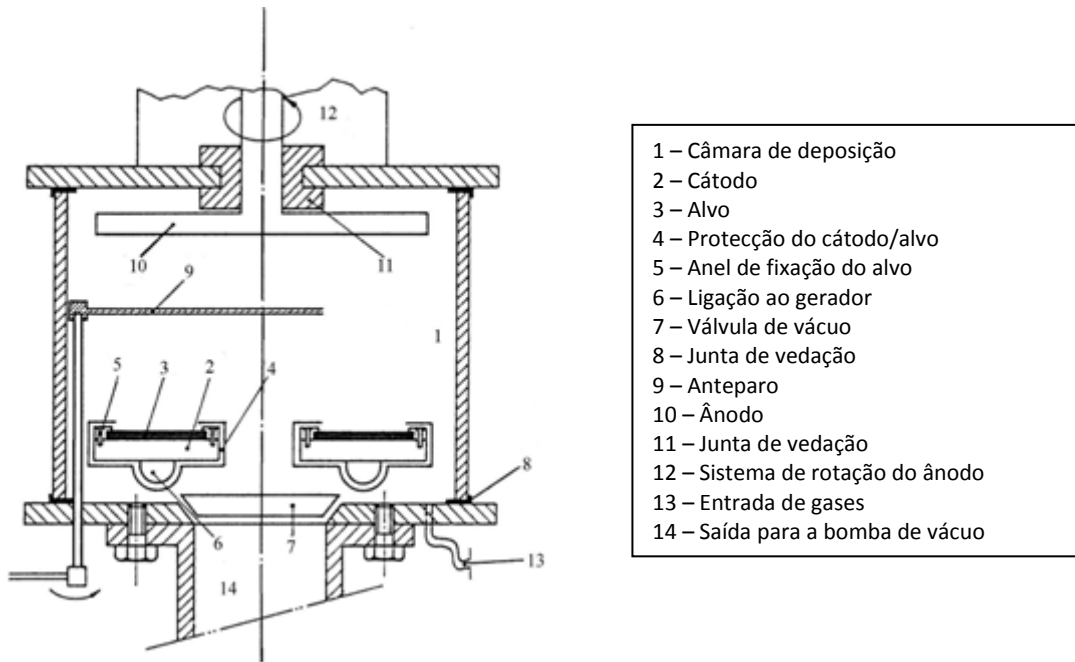


Figura 7 - Câmara de deposição com dois cátodos [35]

O princípio físico deste processo PVD reside fundamentalmente na troca de momento linear (e conseqüente energia mecânica) entre os iões ionizados do gás e os átomos constituintes do alvo. Normalmente, são utilizados gases inertes sendo o árgon o mais utilizado devido à sua grande compatibilidade de massa, relativamente aos materiais empregues nos revestimentos, permitindo otimizar o rendimento de pulverização [42]. A Tabela 5 indica algumas vantagens e desvantagens desta técnica.

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens da pulverização catódica [21]

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ser limpa do ponto de vista ambiental; ▪ Facilidades em controlar a espessura dos revestimentos; ▪ Homogeneidade de espessura em superfícies planas; ▪ Não ser um processo térmico ou químico, mas sim um processo onde não só existe troca de momento entre iões do plasma e átomos do alvo, como também entre os átomos e iões e a superfície do substrato ou das camadas de filme já depositadas; ▪ Boa adesão; ▪ Taxas de deposição relativamente elevadas. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Custo do equipamento, principalmente devido aos acessórios para a produção de vácuo; ▪ Por vezes são detectados poros ou aglomerados nos revestimentos; ▪ Os revestimentos possuem normalmente uma estrutura colunar, o que pode afectar o seu comportamento em termos de resistência à corrosão; ▪ Dificuldade em depositar com homogeneidade peças de formas complexas.

As deposições foram efectuadas com recurso ao equipamento Edwards Coating System E306A (Figura 8) que possui dois cátodos. Este equipamento admite a possibilidade de trabalhar em modo dípodo ou magnetrão, com ou sem polarização do substrato [43]. Neste estudo foi utilizado o modo magnetrão, sem polarização do substrato para todas as deposições.



Figura 8 - Equipamento utilizado na deposição dos filmes finos

A câmara de deposição consiste num cilindro em aço inoxidável com diâmetro de 300mm e altura 250mm. Os cátodos são feitos de cobre e possuem um diâmetro de 120mm. O ânodo apresenta um diâmetro de 250mm e encontra-se posicionado em frente ao cátodo a uma distância de 65mm, possuindo a hipótese de rodar em torno do seu eixo, mantendo a polarização do substrato. O sistema de vácuo permite que a câmara seja inicialmente evacuada a uma pressão inferior a 1,5Pa através de duas bombas: uma bomba rotativa de dois estágios com capacidade de bombagem de $0,14\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, seguida por uma bomba turbomolecular com uma velocidade de $0,32\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ até um vácuo limite inferior a 10^{-4}Pa . A leitura das pressões dentro da câmara é feita por meio de duas células: uma Pirani PRL-10 que mede pressões até 0,1Pa e uma célula Penning CP25-K para pressões inferiores. O gás de descarga é introduzido dentro da câmara, sendo ajustado automaticamente através de uma válvula de fuga servo-assistida MV12 com um controlador modelo 80-1 [43].

II.1.2 – Procedimento

a) *Preparação das amostras*

Numa primeira fase, para cada deposição foram utilizados como substratos o aço inoxidável 316L, uma lâmina de vidro e duas placas de silício. A lâmina de vidro serve para determinar os ângulos de contacto do filme enquanto os substratos de silício permitem analisar a espessura do filme. Na segunda fase de deposições, apenas se utilizaram como substratos amostras de aço inoxidável 316L.

Antes de cada deposição, os substratos foram limpos em banho de ultrassons. Este processo envolveu a imersão das amostras em acetona, em álcool e por fim em água desionizada. Estas permaneceram em cada líquido durante 10 minutos dentro do banho de ultrassons. Depois foram secas em corrente de ar quente e coladas no porta-substratos. Sobre uma amostra de silício foi colocada uma gota de cola de cerâmica, que posteriormente e após o seu destacamento, será usado para medir o degrau causado pelo filme e determinar a espessura do revestimento.

b) *Deposição*

Após a introdução do porta-substratos na câmara de deposição, esta foi evacuada durante cerca de 24 horas de modo a atingir um vácuo último inferior a 10^{-4} Pa. O procedimento foi iniciado pela introdução do gás (árgon) até uma pressão de 0,7 Pa e foram efectuadas as limpezas dos alvos e dos substratos utilizando sempre as mesmas condições de trabalho (Tabela 6). Os alvos e os substratos foram separados por um anteparo para evitar a contaminação cruzada.

Tabela 6 - Condições de limpeza dos alvos e substratos

	Potência (W)	Pressão (mbar)	Tempo (min)
Alvos	250	7×10^{-3}	10
Substrato	250	7×10^{-3}	10

A fase que se seguiu foi a deposição propriamente dita, e a Tabela 7 especifica as condições utilizadas para cada deposição.

Tabela 7 - Condições utilizadas nas diferentes deposições

Designação	PTFE			316L		
	Densidade potência (W.cm ⁻²)	Pressão (mbar)	Tempo (min)	Densidade potência (W.cm ⁻²)	Pressão (mbar)	Tempo (min)
F0	--	--	--	5,09	7x10 ⁻³	15
F5	0,51	7x10 ⁻³	15	5,09	7x10 ⁻³	15
F20	0,64	7x10 ⁻³	15	5,09	7x10 ⁻³	15
F50	1,27	7x10 ⁻³	15	5,09	7x10 ⁻³	15

II.2 – Técnicas experimentais de caracterização

As respostas e propriedades que os biomateriais exibem quando expostos a diversos ambientes dependem de factores como a composição química, a morfologia e a molhabilidade. De entre as várias técnicas disponíveis para a determinação da composição química, tais como o XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*), espectroscopia de infravermelhos e espectrometria de massa a utilizada neste estudo foi a microsonda electrónica - EPMA (*Electron Probe Microanalysis*). No estudo da morfologia foi utilizado a microscopia electrónica de varrimento - SEM (*Scanning Electron Microscopy*), apesar de técnicas como o AFM (*Atomic Force Microscopy*) e STM (*Scanning Tunneling Microscopy*) também fossem alternativas. A espessura dos filmes finos foi determinada por profilometria e o estudo da molhabilidade das superfícies foi feito através da determinação dos ângulos de contacto estáticos com diferentes soluções.

Em seguida são apresentadas em maior detalhe as técnicas experimentais utilizadas neste estudo.

II.2.1 – Profilometria

Para determinar a espessura dos filmes finos foi utilizado um equipamento MAHR, Perthomer S4P (Figura 9) com uma resolução vertical máxima de 0,1 nm. Este equipamento utiliza o método de agulha como princípio de medição: uma agulha, em ponta de diamante de raio 5 µm, é colocada em contacto com a superfície da amostra através da aplicação de uma força de 1,2 mN, e desloca-se horizontalmente sobre a superfície com uma velocidade linear constante [43].

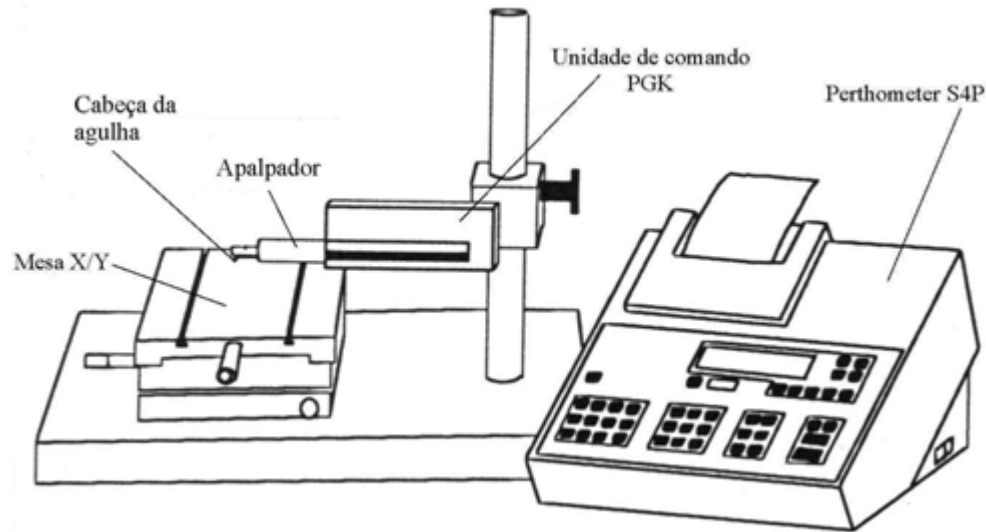


Figura 9 - Esquema do equipamento de avaliação de rugosidades [43]

Como consequência dos movimentos mecânicos da ponta da agulha a avaliação da superfície origina uma imagem a duas dimensões (Perfil-D) que permite, após análise, modificar ou não as condições inicialmente seleccionadas (filtro, tipo de perfil, etc.).

Esta técnica foi usada na medição das espessuras dos filmes depositados sobre placas de silício que possuíam, como já foi referido, uma gota de cola cerâmica. Neste caso a geometria da agulha utilizada foi a T1 RFHBT-50 e os valores apresentados são a média de pelo menos quatro medições (Figura 10).

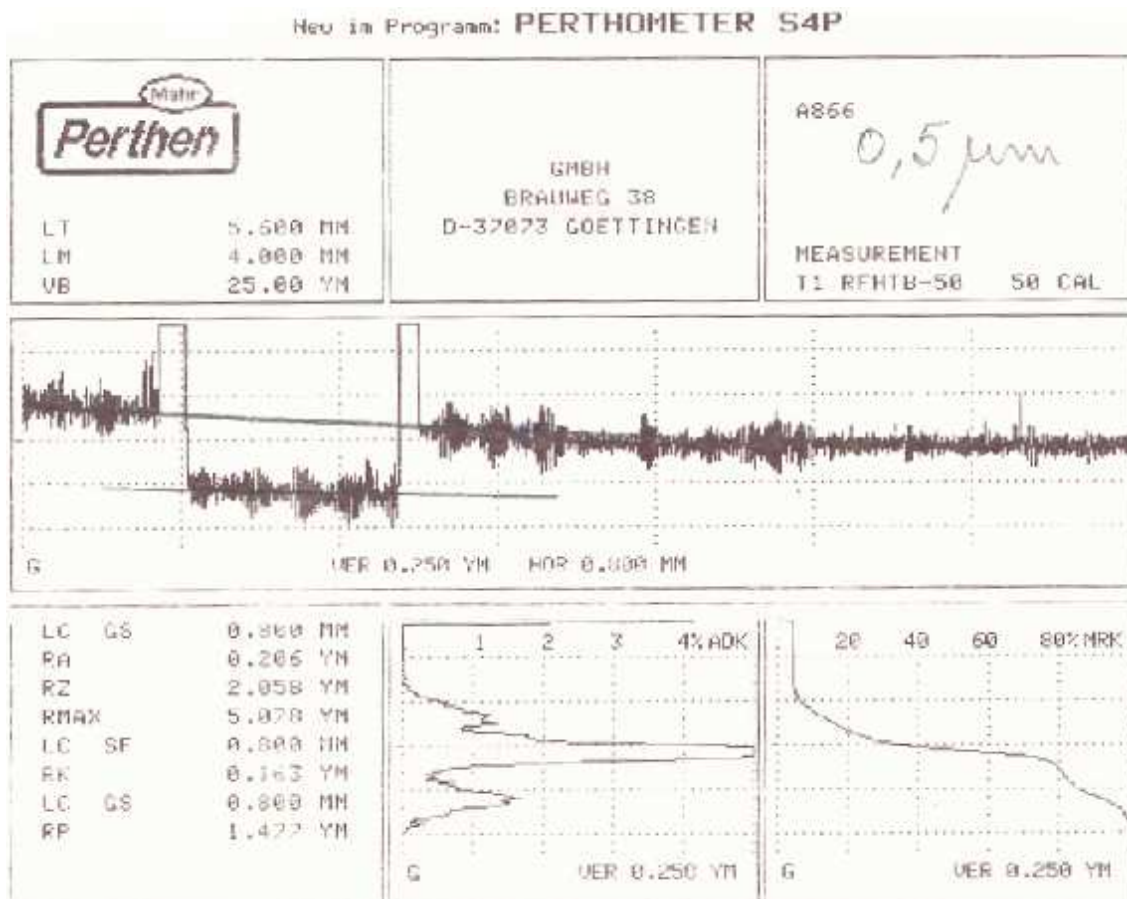


Figura 10 - Exemplo de avaliação por profilometria

II.2.2 – Microsonda electrónica

A microsonda electrónica é uma técnica analítica que permite avaliar a composição química elementar de amostras sólidas. O seu princípio baseia-se na emissão de raios X de uma amostra, depois de sujeita ao bombardeamento por um feixe de electrões [43]. O feixe de electrões é focado na superfície da amostra, por meio de uma série de lentes electromagnéticas e estes electrões produzem raios X característicos dentro do volume da amostra. Os comprimentos de onda específicos e as intensidades da radiação podem ser medidos para determinar as concentrações dos elementos químicos. Todos os elementos (excepto H e He) podem ser detectados uma vez que cada elemento emite uma gama de raios X específica [44].

É uma técnica com elevada sensibilidade e resolução espacial e na maioria dos casos as suas análises são rápidas, demorando cerca de 1 a 2 minutos cada análise individual.

O equipamento utilizado foi da marca CAMECA (Figura 11), modelo Camebax SX50 e as condições de calibração e análise química elementar dos filmes finos estão especificadas na Tabela 8.



Figura 11 - Microsonda electrónica

Tabela 8 - Condições de calibração e análise em microsonda

Elementos	Tensão (kV)	Corrente (nA)	Padrão
C	10	40	Grafite
O	10	40	Andradite
F	10	40	Fluorite
Fe	10	40	Ferro
Cr	10	40	Crómio
Ni	10	40	Níquel

A técnica permite ainda mapear os elementos químicos distribuídos de uma forma não uniforme na superfície de qualquer amostra. Assim, foi utilizado para proceder à identificação da localização das proteínas nos filmes finos estudados.

II.2.3 – Microscopia electrónica de varrimento

O princípio de funcionamento consiste em realizar o varrimento da superfície da amostra, por um feixe electrónico finamente focado, modulando o brilho de cada ponto da imagem obtida num monitor de visualização, através da intensidade do sinal emitido pela amostra [36]. Um feixe de electrões (10 a 50 keV) incide na amostra varrendo a sua superfície e das várias interacções resulta a emissão de electrões (retrodifundidos e secundários) e de fotões. Parte dos electrões são colhidos por detectores cuja saída é usada para modular o

brilho de um tubo de raios catódicos. Cada ponto da superfície onde o feixe incide é visualizado imediatamente no ponto correspondente do monitor [21].

Foram utilizados dois equipamentos, um microscópio Philips XL30 e um microscópio JEOL modelo JSM-5310 (Figura 12), com uma tensão de 10kV e 15kV. As micrografias foram efectuadas para ampliações de 250x, 500x e 5000x e, quando necessário, foram também feitas observações a outras ampliações.



Figura 12 - Microscópio electrónico de varrimento.

II.2.4 – Determinação dos ângulos de contacto

A molhabilidade de uma superfície depende do equilíbrio termodinâmico entre as três interfaces do sistema: sólido, líquido e vapor. A equação de equilíbrio entre estes estados é dada pela equação de Young:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad \text{Equação 2}$$

onde γ_{SV} , γ_{SL} e γ_{LV} são, respectivamente as tensões de superfície das interfaces sólido-vapor, sólido-líquido e líquido-vapor e θ é o ângulo de contacto [43].

O ângulo de contacto corresponde ao ângulo formado entre a tangente à interface líquido-vapor e a interface sólido-líquido, no ponto triplo (Figura 13).

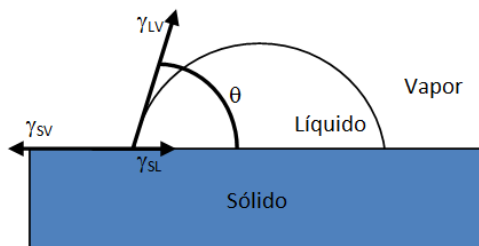


Figura 13 - Ângulo de contacto entre uma gota de líquido e uma superfície sólida

Se este ângulo for maior que zero graus, o líquido não se espalha na superfície, ou seja, a superfície oferece uma resistência a ser molhada que é tanto maior quanto maior for o ângulo formado. Por outro lado, se o ângulo for igual a zero significa que o líquido molha completamente a superfície [43]. Desta forma o ângulo de contacto representa uma medida quantitativa do processo de molhabilidade de uma superfície.

Os ângulos de contacto estáticos foram medidos directamente, através de um goniómetro, usando um aparelho Krüss GmbH, modelo G-23 (Figura 14) e dois líquidos diferentes. Os líquidos utilizados foram água destilada e formamida pois apresentam tensões superficiais e características hidrófilas/hidrófobas distintas.



Figura 14 - Goniómetro

As medições foram efectuadas por deposição de uma gota de líquido com volume de $8\mu\text{l}$ e $10\mu\text{l}$ para a formamida e água destilada, respectivamente. Esses volumes são controlados por um parafuso micrométrico que está acoplado ao êmbolo da seringa. O mesmo procedimento foi repetido no mínimo cinco vezes para cada líquido e em cada superfície e o valor médio calculado, é indicado como sendo o valor do ângulo de contacto (θ).

a) *Determinação da tensão superficial crítica de molhagem*

A tensão superficial (γ_L) de cada líquido é o resultado do somatório de duas componentes, uma dispersiva (γ_L^d) e outra polar (γ_L^p), sendo que esta última é o produto de duas outras componentes, uma que provém do momento dipolar (γ_L^{pd}) e a outra que considera as pontes de hidrogénio (γ_L^{ph}). A partir dos valores dos ângulos de contacto e dos valores da tensão superficial de cada líquido é possível calcular a tensão superficial crítica de molhagem de uma superfície sólida através de um gráfico de Zisman, onde o eixo das abcissas corresponde aos valores de γ_L e o eixo das ordenadas é dado pelos valores de $\cos\theta$. A intersecção de cada recta com a equação $y=1$ indica o valor da tensão superficial crítica de molhagem (γ_c) que corresponde ao valor da tensão superficial do líquido que molha completamente a superfície [43].

b) *Determinação da energia superficial*

Os valores dos ângulos de contacto apenas permitem o cálculo da energia superficial de uma forma indirecta. O equilíbrio termodinâmico das energias livres das superfícies é descrito pela equação de Young (Equação 2) cuja variação da energia livre é dada por,

$$\Delta G_{12}^A = -W^A = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad \text{Equação 3}$$

onde W^A é o trabalho de adesão γ_1 e γ_2 referem-se à energia dos sistemas envolvidos e γ_{12} é a energia da interface dos dois sistemas. Considerando que os dois sistemas são um sólido e um líquido a equação pode ser reescrita,

$$\Delta G_{SL}^A = \gamma_{SL} - \gamma_S - \gamma_L \quad \text{Equação 4}$$

Assumindo que $\gamma_L = \gamma_{LV}$ e $\gamma_S = \gamma_{SV}$ e combinando as equações 3 e 4 obtemos a equação de Young-Dupré:

$$\Delta G_{SL}^A = -\gamma_L(1 + \cos\theta) \quad \text{Equação 5}$$

A energia da interface esta relacionada com a média geométrica da energia superficial de cada fase de acordo com

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2(\gamma_1\gamma_2)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 6}$$

A energia superficial de cada fase resulta do somatório das suas componentes polar e dispersiva, ou seja,

$$\gamma_1 = \gamma_1^p + \gamma_1^d \quad \text{Equação 7}$$

$$\gamma_2 = \gamma_2^p + \gamma_2^d \quad \text{Equação 8}$$

Combinando as equações 5, 6, 7 e 8 obtém-se,

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_L^d \gamma_S^d} + 2\sqrt{\gamma_L^p \gamma_S^p} \quad \text{Equação 9}$$

Resolvendo um sistema de duas equações a duas incógnitas, com os valores dos ângulos de contacto obtidos para dois líquidos diferentes, obtém-se γ_S^d e γ_S^p da superfície sólida. Como,

$$\gamma_S = \gamma_S^p + \gamma_S^d \quad \text{Equação 10}$$

é possível determinar a energia livre superficial dos revestimentos [43], bem como ter uma avaliação semi-quantitativa da adesão dos filmes finos ao substrato de aço 316L.

II.3 – Comportamento de proteínas em solução

De acordo com a IUPAC adsorção é “ *Um aumento na concentração de uma substância dissolvida na interface de uma fase líquida ou condensada devido à operação das forças superficiais*” [45] e sorção “*O processo pelo qual uma substância é sorvida (adsorvida ou absorvida) numa outra substância*” [46]. Assim, o processo de interacção das proteínas com as superfícies que pode iniciar-se como uma sorção, com o tempo passa a adsorção. Por este motivo neste trabalho a designação utilizada foi sempre de adsorção.

II.3.1 – Preparação das soluções

As proteínas utilizadas foram a albumina sérica bovina (BSA) e a trombina bovina (ambas Sigma®). As soluções, em água desionizada (miliQ), tinham uma concentração de 10 mg/mL de BSA e de 0,125 mg/mL para a trombina. A preferência da água desionizada ao invés de soluções tampão foi para evitar a interacção dos iões, que existem neste tipo de solução, com as superfícies em estudo e que poderiam de alguma maneira camuflar a interacção das proteínas.

II.3.2 – Metodologias aplicadas

a) Estudo em condições estáticas

Esta primeira fase do estudo consistiu numa avaliação da adsorção das proteínas em condições estáticas. Para isso, as amostras foram mergulhadas nas soluções proteicas em estudo (utilizando cada proteína isoladamente e em conjunto) e aí permanecem durante duas horas a uma temperatura de 37°C. Após o tempo de imersão as amostras foram lavadas com água desionizada e colocadas numa solução aquosa de glutaraldeído (5% v/v) durante 10 minutos e em seguida em soluções com uma concentração crescente de álcool etílico de, respectivamente, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (v(álcool)/v(água)) com uma duração de 10 minutos em cada solução. Este procedimento permitiu a desidratação e a fixação das proteínas para posterior análise em microscopia electrónica de varrimento e microsonda electrónica.

Os compostos biológicos não são condutores eléctricos pelo que, para que a análise em SEM e em microsonda seja viável, antes da caracterização, as amostras foram revestidas por pulverização catódica, com uma fina camada de ouro (≈ 30 nm).

b) Estudo em condições dinâmicas

Na segunda etapa do estudo, simulou-se o fluxo por meio de uma bomba peristáltica. Assim, foram seleccionados tubos de silicone com 70cm de comprimento e 2mm de diâmetro, e num dos quais determinou-se a velocidade de fluxo do tubo.

A partir deste momento o procedimento foi semelhante ao anterior. A solução foi colocada num recipiente a 37 °C (temperatura do corpo humano), dentro mesmo colocou-se também as duas extremidades do tubo, de modo a fazer a circulação da solução durante 2 horas. Findo este período as amostras foram lavadas e repetiu-se o processo de preparação para o SEM e microsonda electrónica. Este procedimento foi repetido para cada tipo de amostra em estudo e utilizando soluções contendo BSA e BSA+trombina.

A última etapa desta fase consistiu na colocação de um stent de aço 316L que foi revestido com o filme fino que apresentou as melhores características, no interior de um tubo de silicone semelhante aos tubos utilizados. Seguidamente submeteu-se esse tubo ao fluxo contínuo com uma solução aquosa com as duas proteínas, utilizando a mesma metodologia aplicada nas amostras. Esta etapa teve como objectivo comparar o comportamento do filme fino com o de um stent sem revestimento semelhante aos existentes no mercado.

II.3.3 – Caracterização das superfícies após imersão

a) Morfologia e composição química

Existe uma grande variedade de técnicas utilizadas para estudar as interações das proteínas com superfícies sólidas. Destas destacam-se a Microscopia de Força Atómica [26, 29, 47, 48], Elipsometria [29] e o recurso a marcadores radioactivos [26, 30]. Estas técnicas para além de dispendiosas, não estão muito acessíveis e algumas delas são pouco amigas do ambiente. Um dos objectivos do presente estudo foi tentar encontrar um método que fosse acessível, cujos resultados fossem rápidos e que não necessitassem de equipamentos nem reagentes dispendiosos. Por este motivo foi utilizada a técnica de microscopia electrónica de varrimento com duas finalidade, a saber: distinguir a morfologia das duas proteínas envolvidas e avaliar, de um modo semi-quantitativo, a quantidade de composto biológico na superfície dos filmes finos.

Para verificar possíveis alterações da composição química elementar das superfícies em estudo após o contacto com as soluções de proteínas, as amostras foram submetidas também à microsonda electrónica.

b) Difracção de raios X

Dependendo do material depositado e das condições de preparação, os filmes finos preparados por meio da pulverização catódica podem apresentar uma estrutura cristalina ou amorfa. Quando os átomos de um material encontram-se arranjados numa família de planos paralelos, diz-se que esse material é cristalino, caso contrário são designados por materiais amorfos. Através da difracção dos raios X (DRX) é possível identificar a estrutura cristalina dos materiais [36] quer sejam inorgânicos ou orgânicos, como é o caso das proteínas.

Uma vez que os comprimentos de onda dos raios X são próximos das distâncias interplanares nos sólidos cristalinos, pode-se obter picos de difracção de várias intensidades quando um feixe de raios X interage com um sólido cristalino. Um pico de difracção resulta da interferência construtiva dos feixes difractados nos planos cristalinos da amostra. A condição para a observação de um pico é traduzida pela lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin(2\theta) \quad \text{Equação 11}$$

em que d é a distância entre os planos cristalinos, θ é o ângulo entre o vector do feixe incidente e o plano de Bragg responsável pela difracção, λ é o comprimento de onda e n é o número de ordem de difracção [36].

O difractómetro é o equipamento utilizado neste tipo de medições. A Figura 15 esquematiza o funcionamento do instrumento. Para a realização destas medidas, a amostra é girada um ângulo θ , enquanto o detector é girado 2θ . Quando a condição de Bragg é satisfeita obtemos um pico no sinal do detector. Sabendo o valor de 2θ e o valor do comprimento de onda é possível determinar o espaçamento entre planos cristalinos que difractam os raios X. Desta forma obtém-se o espectro característico da amostra [49].

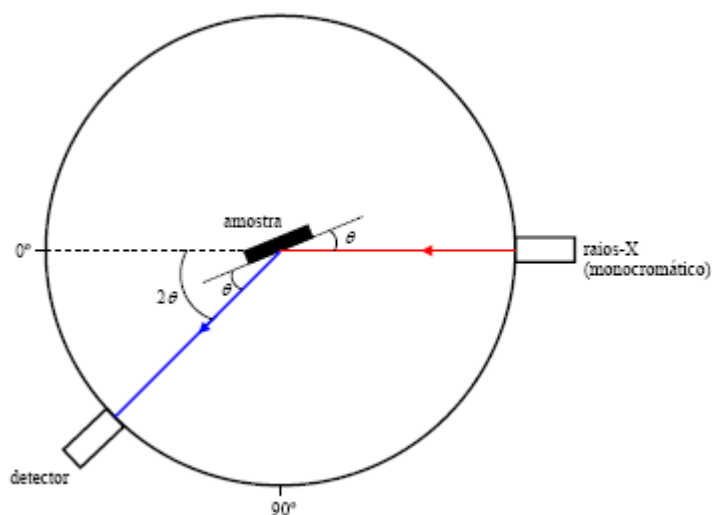


Figura 15 - Esquema de um difractómetro de raios X [49]

O equipamento utilizado foi um difractómetro Philips (Figura 16), modelo X'Pert tendo sido utilizada uma tensão de aceleração de 40 kV e uma corrente de 35 mA. O equipamento está equipado com um detector unidireccional, em arco de círculo de 120° com uma resolução de $0,01^\circ$ e geometria Bragg-Brentano. O anticátodo do difractómetro é de cobalto ($K\alpha_1 = 0,178896$ nm e $K\alpha_2 = 0,179285$ nm) com colimador e monocromador de grafite. O maior número de ensaios foi efectuado num intervalo de difracção de 2θ entre 20° e 120° , com um passo de $0,025^\circ$ e tempo de aquisição de 0,5s por passo.



Figura 16 - Difractómetro de raios X

Os dados foram tratados em computador, no programa PC-APDW Philips, para a identificação e indexação das fases presentes nos filmes por comparação dos resultados com os tabelados nas fichas ICDD (*International Center for Diffraction Data*).

c) Quantificação das proteínas

A concentração de proteínas foi determinada com recurso ao reagente de Bradford. Este reagente permite determinar a concentração de proteínas em soluções.

O principal componente do reagente de Bradford é o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. Este componente ao ligar-se a proteínas altera o valor da absorvância de 465nm para 595nm. A interação do reagente em soluções com proteínas resulta numa alteração da cor da solução, que inicialmente é castanha, para tons de azul de acordo com a concentração da proteína. Posteriormente a absorvância é medida através de um espectrofotómetro utilizando o comprimento de onda de 595nm. Por comparação dos resultados calculados com os valores da curva padrão que apresenta valores de concentração conhecidos é possível determinar a concentração de proteína em estudo [50].

O reagente de Bradford utilizado é da Sigma® e foram realizados ensaios padrão de 3,1mL que consiste na mistura de 1 parte de solução a analisar com 30 partes de reagente. Antes de adicionar o reagente é necessário preparar as soluções de concentração conhecida de modo a construir a curva padrão. Para tal, diluiu-se a solução de BSA inicial até obter uma concentração de 1mg/mL. Com esta nova solução fizeram-se novas diluições para obter soluções de 0,2mg/mL, 0,4mg/mL, 0,6mg/mL e 0,8mg/mL. As diluições foram feitas com água desionizada MiliQ. Após a preparação das soluções adiciona-se o reagente em todas as soluções, incluindo as soluções com concentração desconhecida, tendo-se medido a absorvância a 595nm. A curva padrão é construída relacionando os valores de densidade

óptica (absorbância a 595nm) com os valores das concentrações de proteínas que são conhecidas. Através da curva padrão é possível determinar a concentração de proteína presente em cada solução. Esta concentração é multiplicada pelo factor de diluição total de cada amostra, e o valor calculado é subtraído ao valor da concentração inicial da solução, antes de ter estado em contacto com as superfícies em estudo, para determinar a quantidade de proteína sorvida. Este valor é em seguida dividido pela área da superfície exposta para calcular a concentração de proteína por área.

De notar que este método apenas permite indicar a quantidade de proteína presente numa solução, não permitindo diferenciar os tipos de proteínas presentes.

Capítulo III – Resultados e Discussão

III.1 – Resultados da caracterização dos filmes finos

III.1.1 – Composição química

Através da microsonda electrónica determinou-se a composição química elementar dos filmes finos depositados com as diferentes condições de deposição e designados de acordo com a percentagem atómica de flúor presente no filme (Tabela 9). Na mesma tabela é apresentada a espessura dos filmes finos determinada por profilometria.

Tabela 9 - Valores da composição química e espessura dos filmes finos.

Revestimento	Espessura (nm)	Composição química (% atómica)					
		C	O	F	Cr	Fe	Ni
F0	600	3,6	4,0	--	17,2	66,3	8,9
F5	500	8,5	9,9	4,8	13,9	55,4	7,6
F20	500	15,8	2,3	19,5	9,7	45,3	7,4
F50	400	6,8	10,2	50,7	5,8	23,0	3,5

Os valores da composição química elementar dos filmes finos revelam um aumento progressivo da percentagem atómica do flúor (F), que é um composto químico característico do PTFE, em detrimento da quantidade de ferro (Fe), que é um elemento presente no aço inoxidável 316L. Este efeito era esperado uma vez que a densidade de potência aplicada ao alvo de PTFE foi aumentada de um filme fino para o outro com o objectivo de incrementar a quantidade dos elementos constituintes do PTFE incorporada no filme fino.

No estado puro, o PTFE apresenta uma composição química elementar de 67% de flúor e 33% de carbono [51]. Como nenhuma das superfícies apresenta esta composição, conclui-se que houve interacções entre o PTFE e o aço inoxidável 316L.

A composição química do aço 316L e do filme fino F0 é semelhante uma vez que a pulverização catódica não altera os valores relativos da composição química dos materiais, desta forma e de modo a evitar a repetição dos valores, apenas é indicado os valores do filme fino F0.

A espessura dos filmes finos diminui, não linearmente, com a percentagem de flúor incorporado no filme fino. A deposição a partir de um único alvo (revestimento F0) apresenta uma maior velocidade de deposição do que a co-deposição a partir de dois alvos, sendo tanto menor quanto maior a densidade de potência do alvo polimérico. As taxas de deposição dos

elementos constituintes dos alvos indicam que este resultado seria o expectável pois as taxas dos elementos metálicos são sempre superiores às dos elementos C e F.

III.1.2 – Morfologia

A morfologia superficial de cada filme fino foi observada por microscopia electrónica de varrimento (SEM) e as respectivas micrografias apresentadas na Figura 17.

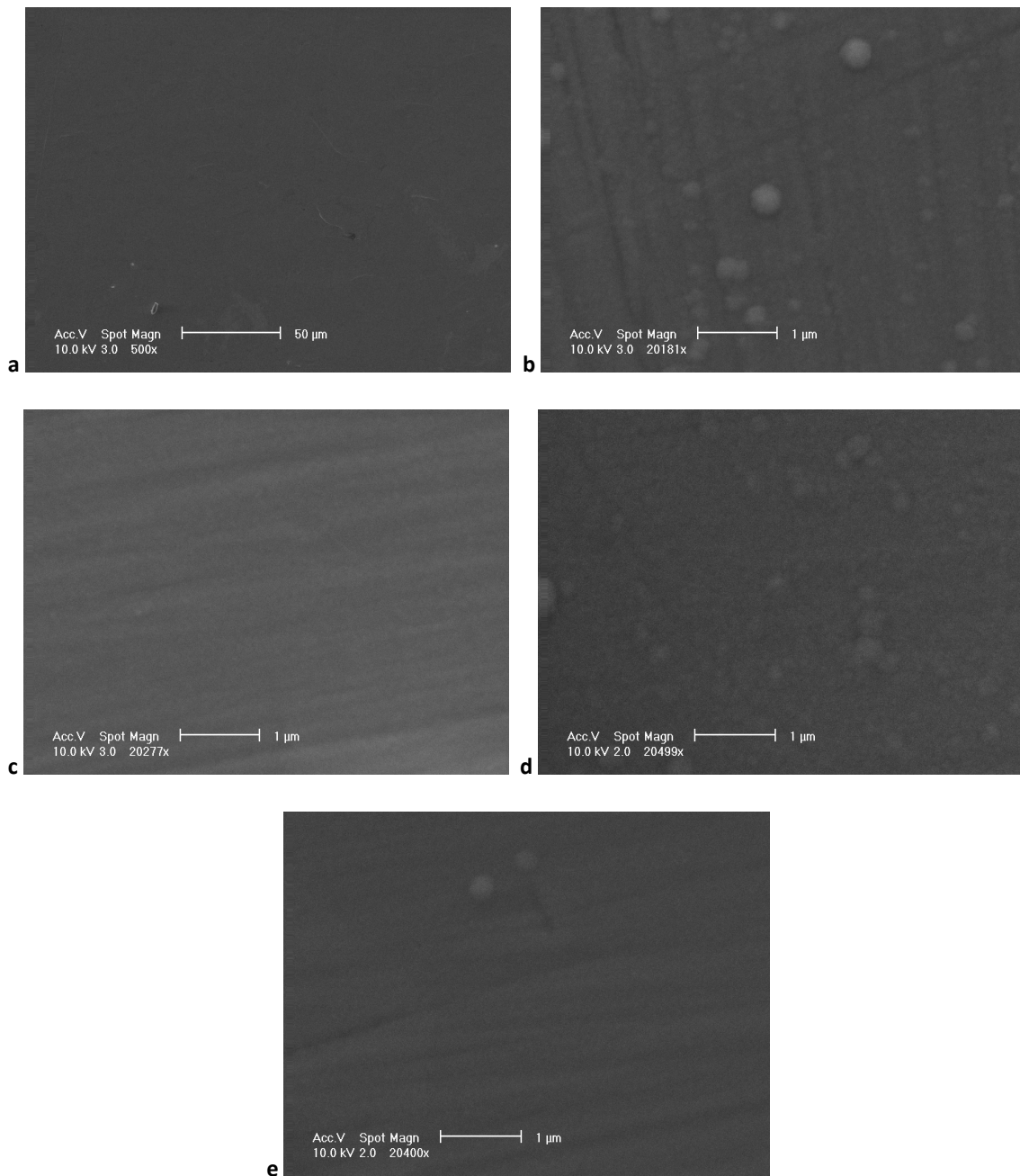


Figura 17 - Morfologia superficial dos filmes finos após deposição a) 316L, b) F0, c) F5, d) 20 e e) F50

A morfologia do filme F0 é mais nivelada do que as apresentadas pelos filmes finos que contêm flúor na sua composição química. Tal efeito pode apenas ser devido ao facto de estes filmes corresponderem à co-deposição de dois materiais distintos (polímero e metal) o que poderá ser responsável por um ligeiro aumento da rugosidade superficial. No entanto, deve ser referido que em qualquer uma das superfícies estudadas a rugosidade é muito baixa e todos os filmes, para as ampliações estudadas, não apresentam porosidade superficial aparente.

III.1.3 – Molhabilidade

Os ângulos de contacto estáticos foram medidos por meio de um goniómetro. A Figura 18 ilustra uma sequência de imagens representativas da interacção da água com cada superfície. Os ângulos de contacto são determinados pelo software do computador através das imagens recolhidas. A Tabela 10 indica os valores dos ângulos de contacto estático para os dois líquidos utilizados. Os volumes das gotas de água e formamida utilizados nas medições foram respectivamente 10 μ l e 8 μ l. Tanto as imagens como os valores médios apresentados na tabela evidenciam o aumento do ângulo de contacto, com a água, com o aumento do teor em flúor dos filmes finos. Tal facto seria expectável uma vez que o PTFE é um polímero muito hidrófobo.

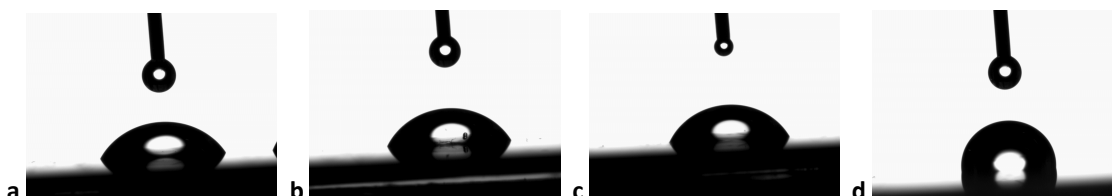


Figura 18 - Determinação dos ângulos de contacto de cada superfície com água. a) F0, b) F5, c) F20 e d) F50

Tabela 10 - Valores médios dos ângulos de contacto

Substrato	Água (°)	Formamida (°)
F0	57,51	31,33
F5	60,84	41,68
F20	61,41	45,72
F50	94,55	71,32

Através da Tabela 10 e do gráfico da Figura 19 é possível concluir a existência de uma relação directa entre o aumento do ângulo de contacto e o aumento de flúor dos filmes finos

resultante de um aumento da densidade de potência de PTFE, durante a deposição dos mesmos. Outra coisa não seria de esperar uma vez que o PTFE, como já foi referido, é um polímero com propriedades hidrófobas. Como nenhum dos filmes finos apresenta a composição química elementar do PTFE puro, também era esperado que nenhum dos filmes finos atingisse os valores dos ângulos de contacto deste polímero que com a água tem o valor de 110° [52].

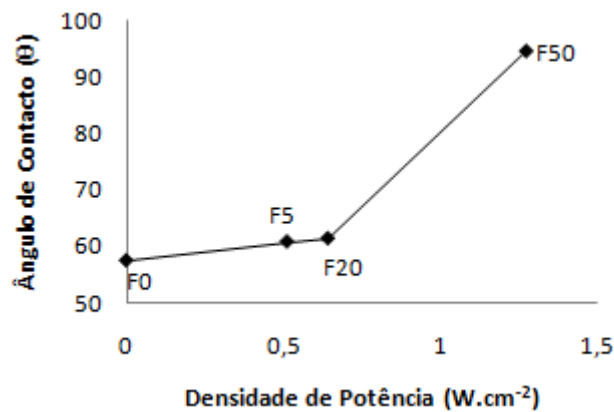


Figura 19 - Relação entre os ângulos de contacto estáticos dos filmes finos em água com as respectivas densidades de potência de deposição do PTFE

a) Determinação da tensão superficial crítica de molhagem

Ambos os líquidos utilizados apresentam valores não nulos para todos os componentes de tensão superficial (Tabela 11) pertencendo por isso a uma mesma série. Este facto facilita a comparação entre os diversos valores obtidos para os ângulos de contacto, permitindo que a variação do ângulo de contacto registada por dois desses líquidos em contacto com a mesma superfície seja atribuída às características desta e não devida a diferentes tipos de interacções químicas originadas pela diferença entre líquidos [43].

Tabela 11 - Valores da tensão superficial dos líquidos utilizados nas avaliações dos ângulos de contacto [43]

Líquidos	γ_l (mJ.m ⁻²)	γ_l^d (mJ.m ⁻²)	γ_l^{pd} (mJ.m ⁻²)	γ_l^{ph} (mJ.m ⁻²)
Água	72,8	29,1	1,3	42,4
Formamida	58,2	35,1	1,6	21,5

Com os valores de γ_l para cada líquido e a média aritmética dos ângulos de contacto calculados, construiu-se o gráfico de Zisman (Figura 20).

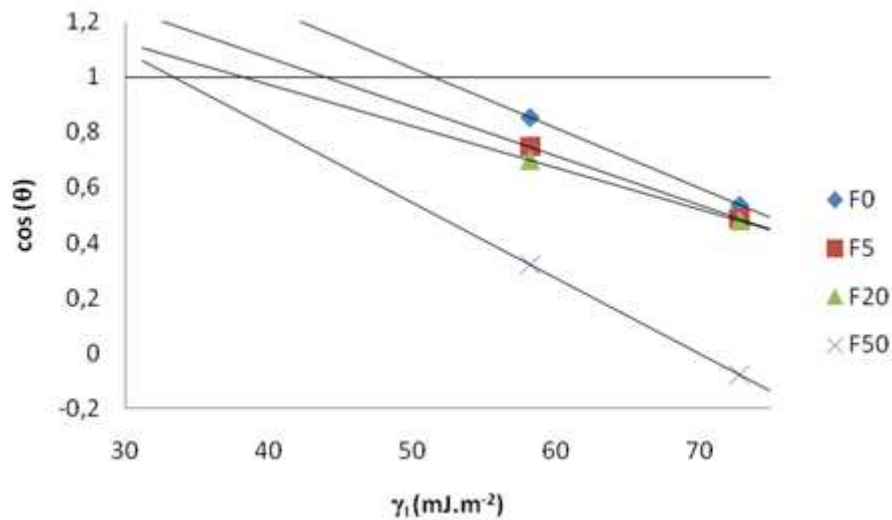


Figura 20 - Gráfico de Zisman para os filmes finos estudados

A partir do gráfico representado na Figura 20, determinou-se os valores da tensão crítica de molhagem para cada filme fino como sendo a intersecção entre a recta dada pelos pontos experimentais e a recta $\cos \theta = 1$ (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores da tensão crítica de molhagem (γ_c) dos filmes finos estudados

Superfícies	γ_c (mJ.m ⁻²)
F0	51,22
F5	44,18
F20	39,67
F50	33,38

Todos os valores de γ_c são superiores aos encontrados na literatura para o PTFE maciço ($\gamma_c = 18$ mJ.m⁻²) [43], este facto pode indicar que as superfícies dos filmes não são tão hidrófobas quanto as do polímero original, o que confirma os resultados tanto da composição química como dos ângulos de contacto.

A relação entre os valores de γ_c de cada filme fino com os respectivos valores correspondentes à quantidade de flúor presente é apresentada no gráfico representado na Figura 21.

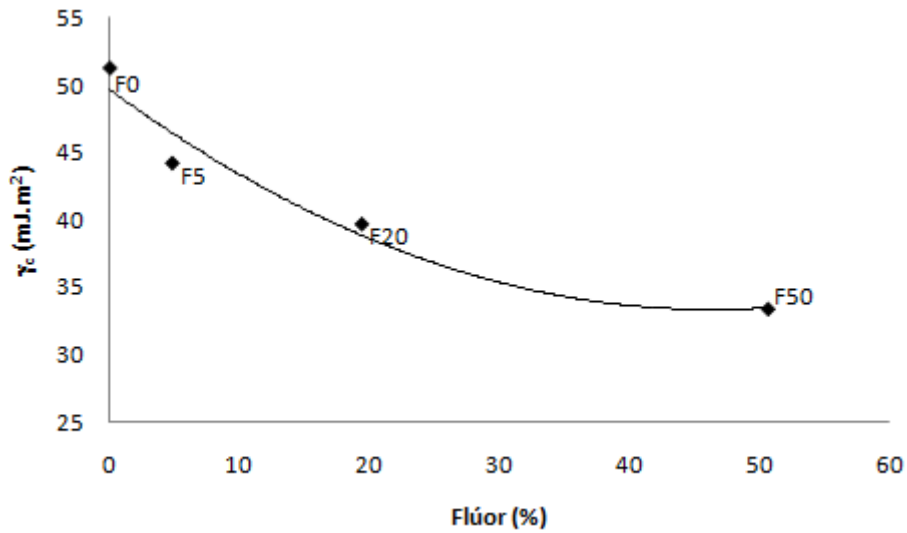


Figura 21 - Relação entre a tensão crítica de molhagem e a quantidade de flúor presente nas amostras

A relação entre ambos é inversa mas não linearmente inversa. Verifica-se também que os valores de γ_c obtidos por pulverização catódica são todos superiores a 30 mJ.m⁻², facto que para alguns autores significa que estão todos acima da zona mínima de bioadesão e hipotética biocompatibilidade (Figura 22) [43].

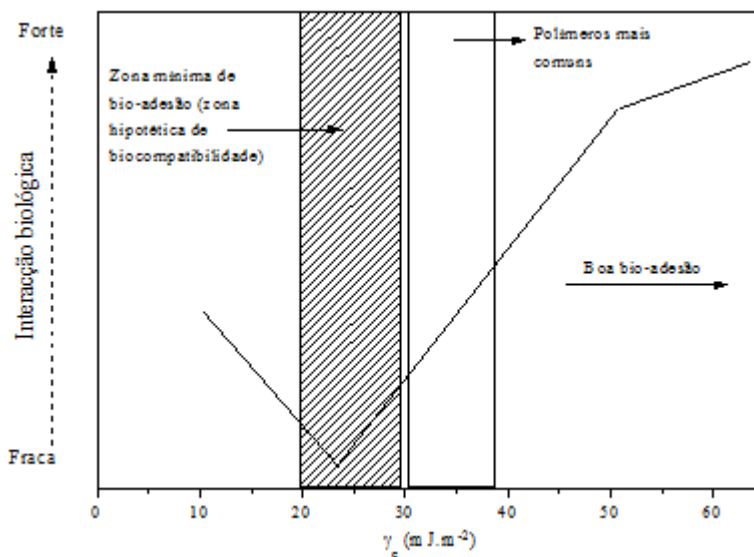


Figura 22 - Correlação entre o valor de γ_c de uma superfície sólida e a sua interacção biológica [43]

b) *Determinação da energia superficial*

O valor dos ângulos de contacto permite ainda o cálculo da energia livre superficial que, quando determinada como diferença para outra superfície, é indicativa do trabalho necessário para separar duas superfícies contíguas, isto é, dá origem a uma ideia comparativa da adesão entre duas superfícies. Depois de efectuados os cálculos, de acordo com o explanado no Capítulo II, são apresentados na Tabela 13 os valores da variação da energia livre entre os filmes em estudo e a superfície do aço 316L, utilizado como substrato nas deposições. Todos os valores são negativos indicando uma adesão elevada entre cada filme fino e o substrato. No entanto, deve ser salientado que o maior valor absoluto foi registado para o filme F0, o que é explicável pelo facto de ser o sistema em que ocorre maior compatibilidade química entre o substrato e o filme fino, uma vez que ambos são aço 316L. Logo a maior adesão calculada por este método é apresentada para este sistema, sendo no entanto de salientar que todos os outros conjuntos apresentam valores muito semelhantes.

Tabela 13 - Valores de γ_s para os revestimentos e substrato e variação da energia livre para cada conjunto

Superfície	γ_s^d (mJ.m ⁻²)	γ_s^p (mJ.m ⁻²)	γ_s (mJ.m ⁻²)	γ_{12} (mJ.m ⁻²)	ΔG_{12}^A (mJ.m ⁻²)
F0	43,97	9,32	53,29	0,38	-97,61
F5	32,83	12,35	45,18	1,28x10 ⁻³	-89,88
F20	26,41	15,58	41,99	0,04	-86,65
F50	49,28	-0,66	48,62	0,08	-93,24
316L [53]	36,40	8,30	44,70	--	--

III.2 – Estudo da adsorção de proteínas

O estudo da interacção das proteínas com a superfície de biomateriais pode ser efectuado recorrendo às mais diversas técnicas. A avaliação simultânea de mais de um tipo de proteína numa mesma superfície apresenta dificuldades que impedem a utilização dos procedimentos mais usuais. Também a quantificação em materiais/superfícies cuja composição química se altera ao longo do tempo, é um obstáculo por vezes intransponível. Uma das metodologias mais usuais para contornar este tipo de dificuldades é a utilização de diferentes marcadores radioactivos, em cada uma das proteínas, para posterior quantificação de cada uma das proteínas marcadas. Este género de abordagem, além de economicamente caro, é ambientalmente incorrecto devido ao tipo de resíduos que produz. Este último aspecto é agravado pelo facto de, durante o presente trabalho, se ter tido a preocupação de utilizar uma técnica amiga do ambiente para modificar a superfície dos stents vasculares. Por todos estes motivos, o estudo da adsorção de proteínas foi efectuado por diferentes abordagens, a

saber: difracção de raios X, espectrometria de visível, microscopia electrónica de varrimento e microsonda electrónica cujos resultados a seguir se apresentam.

III.2.1 – Difracção de raios X

A difracção de raios X permite a identificação dos planos de difracção de materiais cristalinos. Para avaliar a possibilidade desta técnica poder ser utilizada na identificação e quantificação das proteínas adsorvidas na superfície dos filmes finos em estudo, foi inicialmente efectuado um varrimento da BSA sob a forma de pó. A Figura 23 apresenta o difractograma correspondente a esta proteína onde pode ser observado que a estrutura não tem ordem estrutural, pois apresenta um pico muito largo normalmente designado por bossa, ao contrário de picos de difracção de materiais cristalinos cuja largura a meia altura são cerca de um décimo da apresentada neste difractograma. Este resultado inviabiliza a utilização da técnica de DRX para a identificação e possível quantificação das proteínas, pois a ausência de estrutura cristalina e a baixa intensidade da bossa registada, não permite a sua correcta visualização quando se encontrar adsorvida na superfície dos filmes finos.

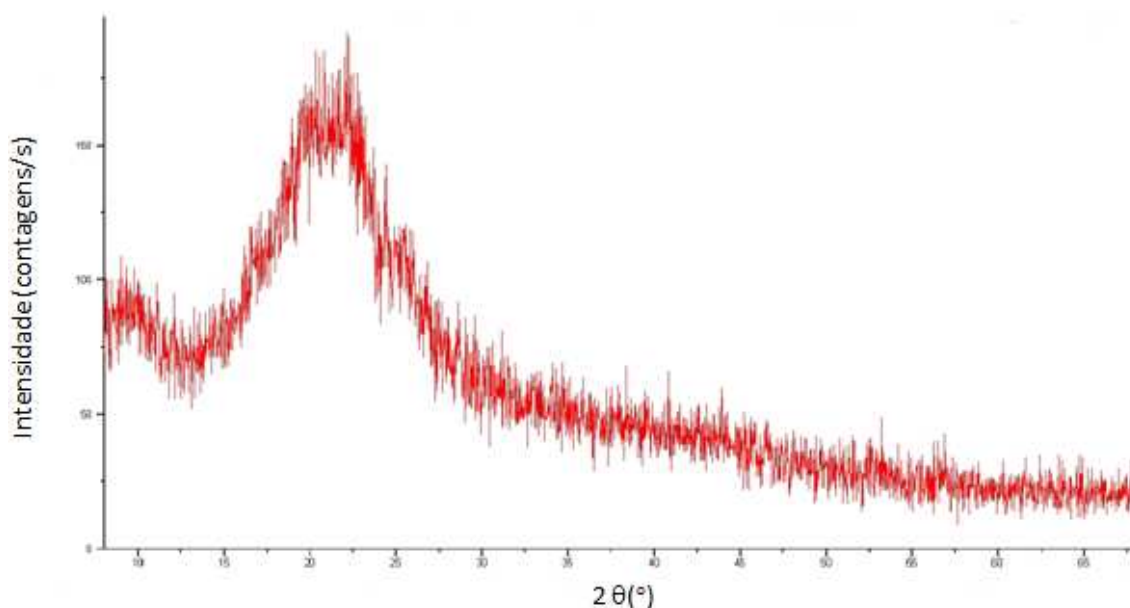


Figura 23 - Difractograma de BSA em pó

III.2.2 – Espectrometria de visível

De acordo com o exposto na alínea c) do sub-capítulo II.3.3 a quantificação das proteínas adsorvidas na superfície dos filmes finos foi efectuada por reacção com o reagente de Bradford. Os resultados da absorbância a 595 nm não foram conclusivos, pois os valores nas soluções após reacção com as superfícies foi superior aos valores das soluções antes da reacção, o que é impossível, pois não é possível ter mais proteína do que a inicialmente colocada. Os valores anormais são devidos à libertação dos iões constituintes dos filmes finos. Com efeito, de acordo com os valores da Tabela 14, os resultados da composição química dos filmes finos após teste durante duas horas, demonstram a evidente a perda de flúor dos filmes finos. A diminuição do teor deste elemento atinge, em alguns casos, quase 100% do valor inicial de acordo com os valores da Tabela 15.

Tabela 14 - Composição química dos filmes finos após imersão em solução com as proteínas em fluxo dinâmico

Superfície	Composição química (% atómica)					
	C	O	F	Cr	Fe	Ni
316L	12,3	1,4	--	18,7	60,0	7,1
F0	15,0	18,2	--	15,4	44,9	6,5
F5	11,3	4,6	2,5	18,0	56,1	7,5
F20	9,9	0,9	0,5	18,79	62,1	7,8
F50	26,9	18,8	8,2	15,2	27,7	3,3

Tabela 15 - Percentagem de flúor libertada para o meio aquoso

Superfícies	% F libertado
F5	47,9
F20	97,4
F50	83,8

Apesar de o flúor ser o elemento que maior diminuição regista, na comparação entre as Tabelas 9 e 14, é também evidente que para o filme F0 há diminuição do teor de Fe após o teste de imersão. A libertação destes iões é a responsável pela alteração dos valores da densidade óptica a 595 nm de acordo com as especificações do próprio fornecedor do reagente utilizado.

Deve ser salientado o facto de o crómio (Cr) e o níquel (Ni) não apresentarem variações significativas nos valores atómicos. Este facto leva a concluir que estes elementos químicos não interagem nem se libertam para o meio aquoso. Representa um aspecto muito positivo,

uma vez que desta forma é possível evitar inflamações e reacções alérgicas devido à libertação destes elementos.

III.2.3 – Microscopia electrónica de varrimento

Após as tentativas falhadas, foi utilizada a microscopia electrónica de varrimento para observar as modificações da morfologia superficial dos filmes finos após os testes de adsorção de proteínas. Este estudo foi inicialmente efectuado em condições estáticas, primeiro com cada uma das proteínas separadamente e depois estudando o efeito das duas proteínas em simultâneo. Em seguida, os testes foram repetidos em condições dinâmicas, novamente com o contributo de cada proteína isolada e conjuntamente.

A primeira abordagem consistiu em sujeitar a superfície do aço 316L, não modificado e modificado com os diferentes filmes finos em estudo, a duas horas de imersão apenas em água sem proteínas como soluto. Este teste preliminar destinou-se a avaliar a contribuição do solvente nas possíveis alterações morfológicas para, por comparação, avaliar o verdadeiro contributo da presença das proteínas em solução. As micrografias da Figura 24 evidenciam alterações na morfologia superficial dos filmes finos após imersão em água, sendo particularmente evidente para o filme F50 onde a libertação de flúor leva à desintegração estrutural do filme fino.

Ainda tendo em consideração que se pretende distinguir entre as duas proteínas adsorvidas foi avaliada a morfologia de cada uma das proteínas individualmente, cujas micrografias são apresentadas na Figura 25.

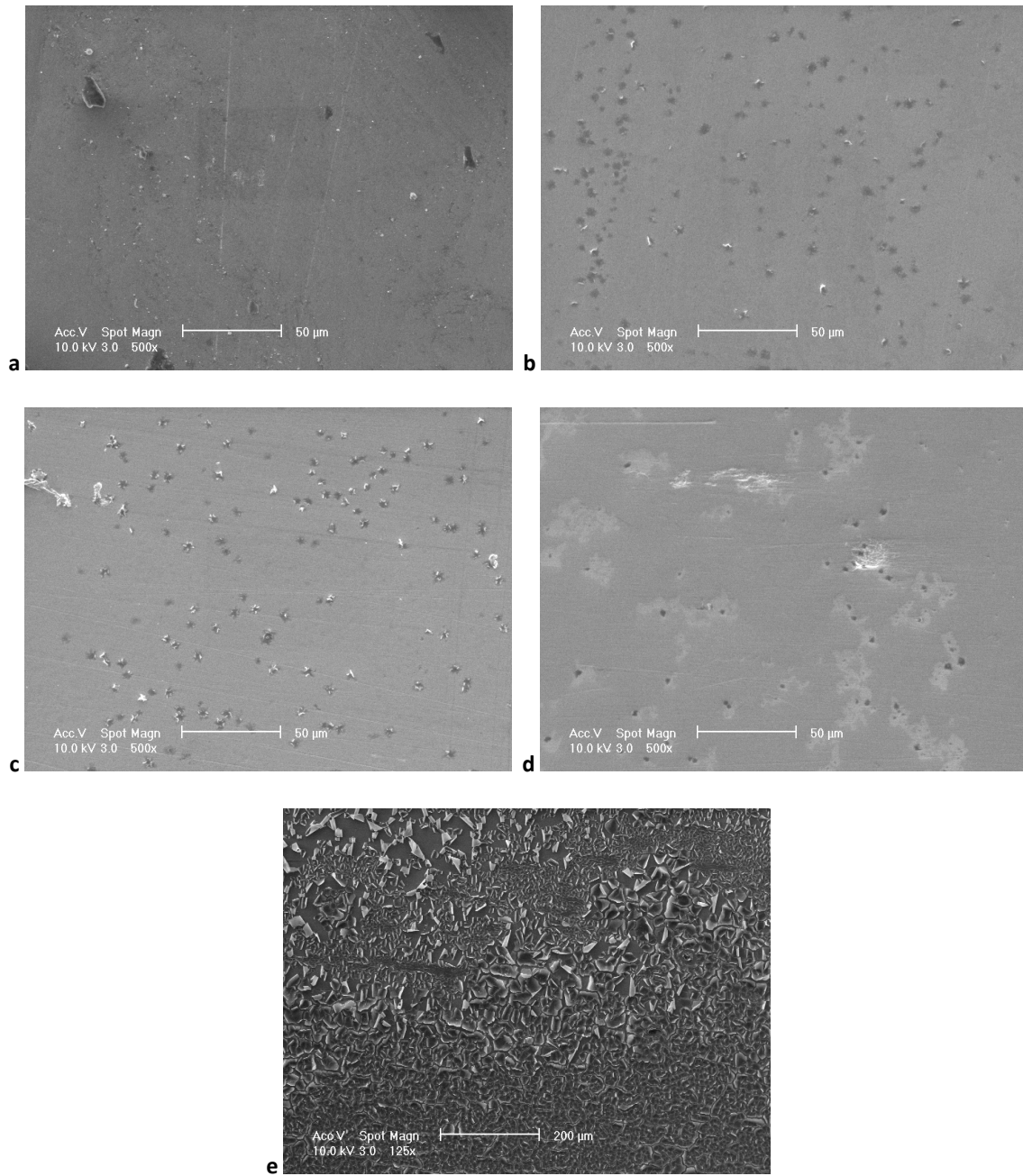


Figura 24 - Imagens SEM das superfícies após imersão com água desionizada. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20 e e) F50

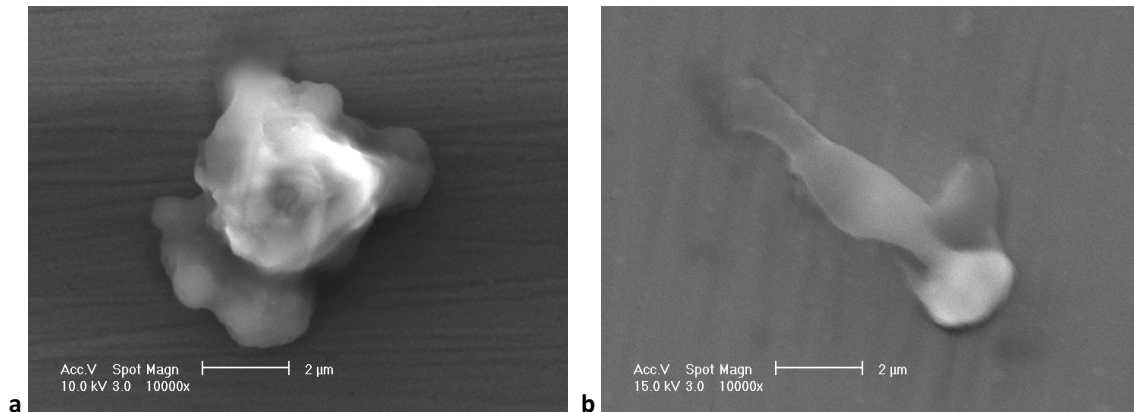


Figura 25 - Morfologia das proteínas em estudo. a) BSA e b) Trombina

A Figura 25a revela que a albumina apresenta uma estrutura globular, o que confirma o descrito na literatura [16, 19]. A trombina, Figura 25b, apresenta uma forma alongada, bastante distinta da albumina. Estes resultados indicam a possibilidade desta técnica ser usada para distinguir os dois tipos de proteína sem recorrer a marcações com isótopos radioactivos.

a) Estudo em condições estáticas

A primeira proteína a ser avaliada individualmente foi a BSA. As micrografias de SEM (Figura 26) permitem concluir que existe adsorção de proteína em todas as superfícies analisadas. Tendo como elemento de comparação a amostra de aço inoxidável 316L sem qualquer tipo de revestimento é evidente que o simples facto de revestir o stent (mesmo se esse revestimento for do mesmo material do stent) contribui para a diminuição da sorção de BSA.

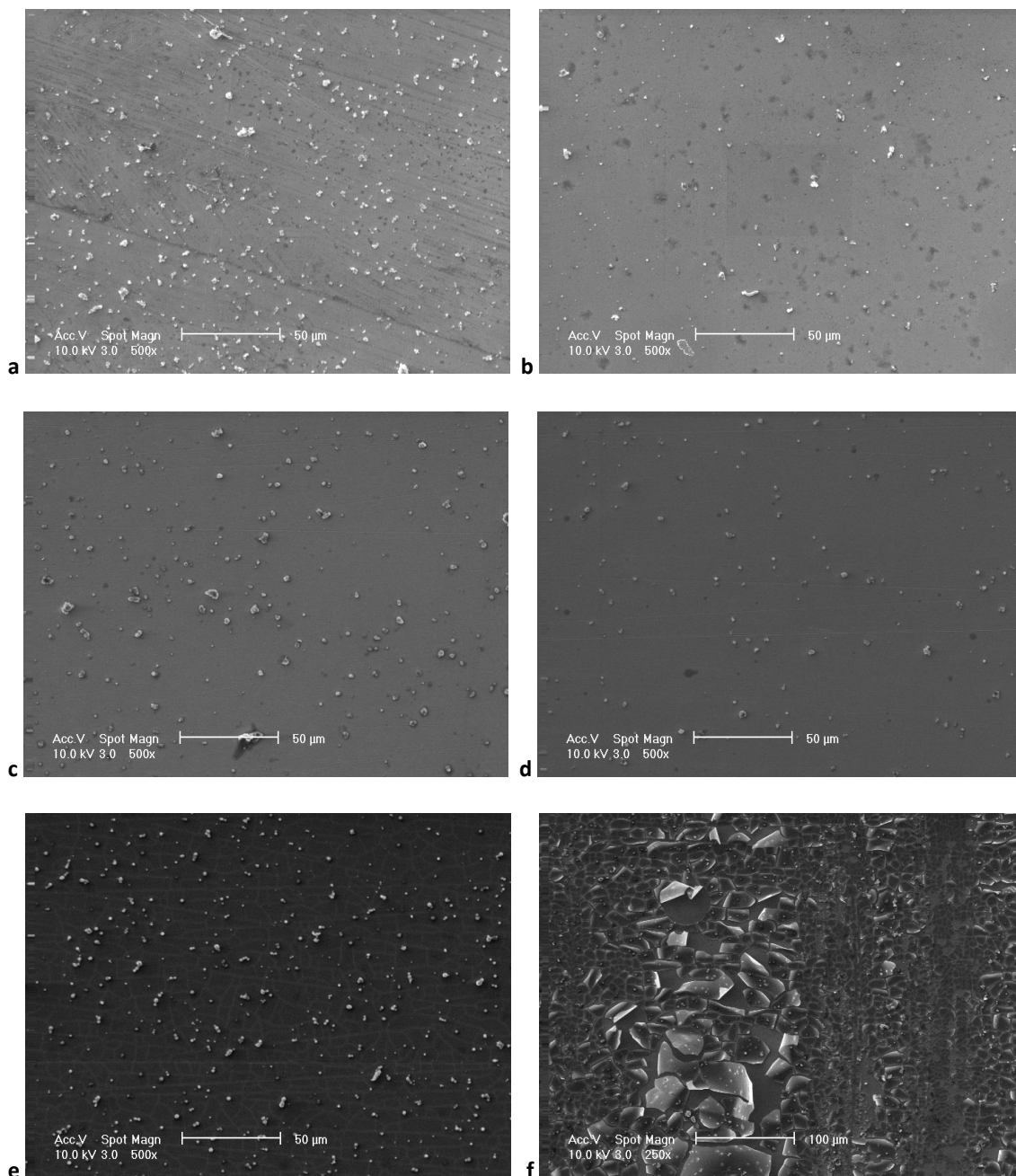


Figura 26 - Morfologia superficial após imersão estática em solução de BSA. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20, e) e f) F50

Em relação ao filme F50 (Figura 26e e f) houve desintegração de partes do filme que mais uma vez, se deve à elevada quantidade de flúor libertada para o meio aquoso. Esta libertação sugere que o flúor se encontra no filme fino sob a forma de composto iónico, o que foi confirmado anteriormente por investigadores do CEMUC [23], onde foi identificado que o flúor se encontrava no filme fino sob a forma de FeF_2 . A libertação deste elemento ocorre em todos os filmes que contém PTFE, contudo é mais evidente e catastrófica no filme fino F50 pois o elemento constitui 50% dos átomos do revestimento.

Na segunda etapa deste estudo foi utilizada a trombina e a Figura 27 apresenta a morfologia das superfícies após os testes de imersão.

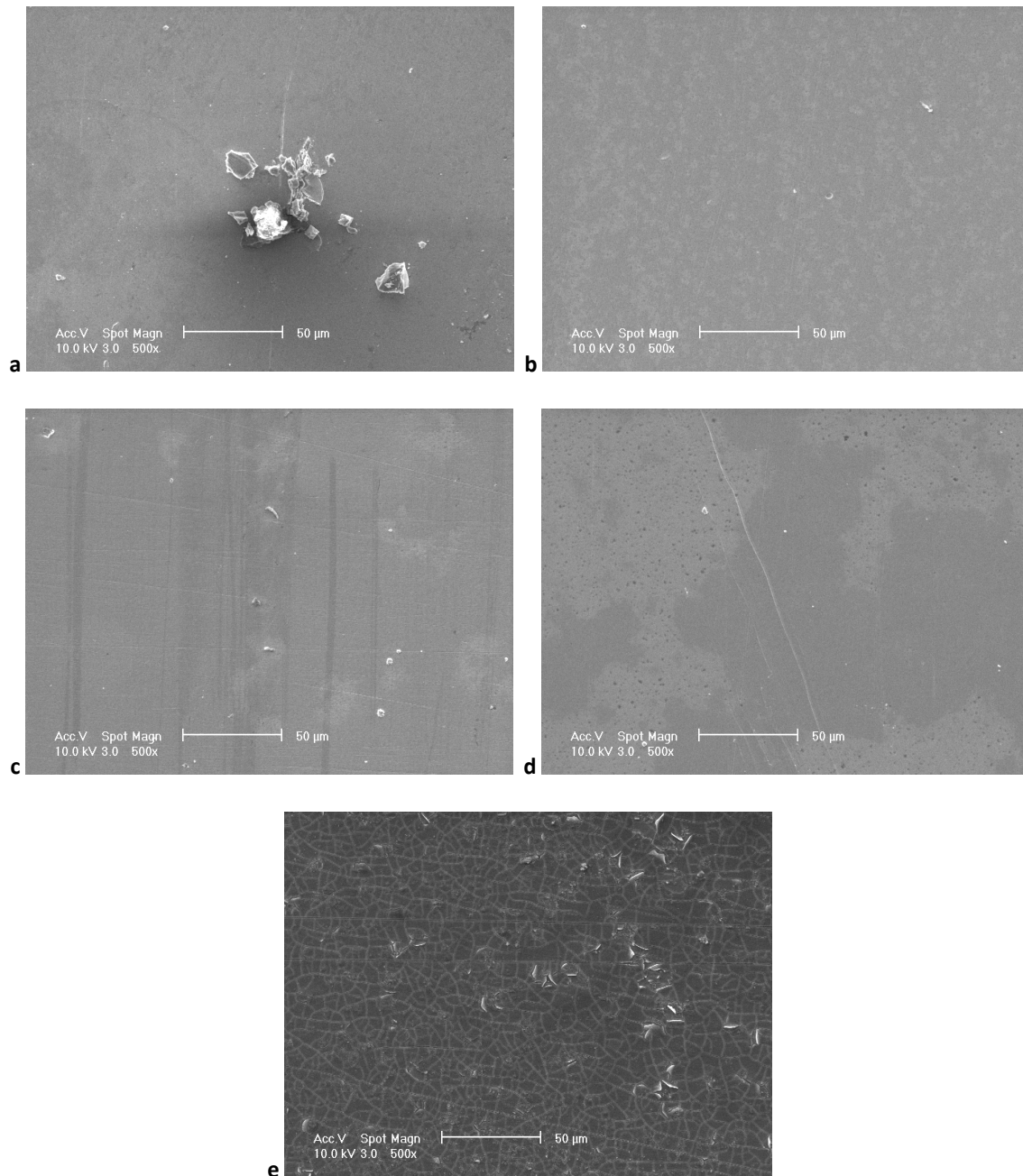


Figura 27 - Morfologia superficial após teste estático com trombina. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20, e) F50.

A sequência de micrografias indica que a sorção de trombina é mínima ou inexistente em todas as amostras. Este aspecto é bastante positivo, pois desta forma não havendo sorção de trombina, também não há problemas de ocorrência das cascatas de coagulação e inflamatórias associadas a este tipo de proteína. Deve no entanto ser referido que este baixo teor de trombina nas superfícies pode ser devido ao facto de a concentração de proteína em

solução ser inferior à da BSA. No entanto, também na corrente sanguínea a concentração de trombina é inferior à de BSA que, como foi já referido, constitui cerca de 60% do total de proteínas presentes no sangue. Mais uma vez, verifica-se a perda de integridade estrutural do filme fino F50.

A morfologia das superfícies após imersão numa solução contendo ambas as proteínas pode ser visualizada na Figura 28.

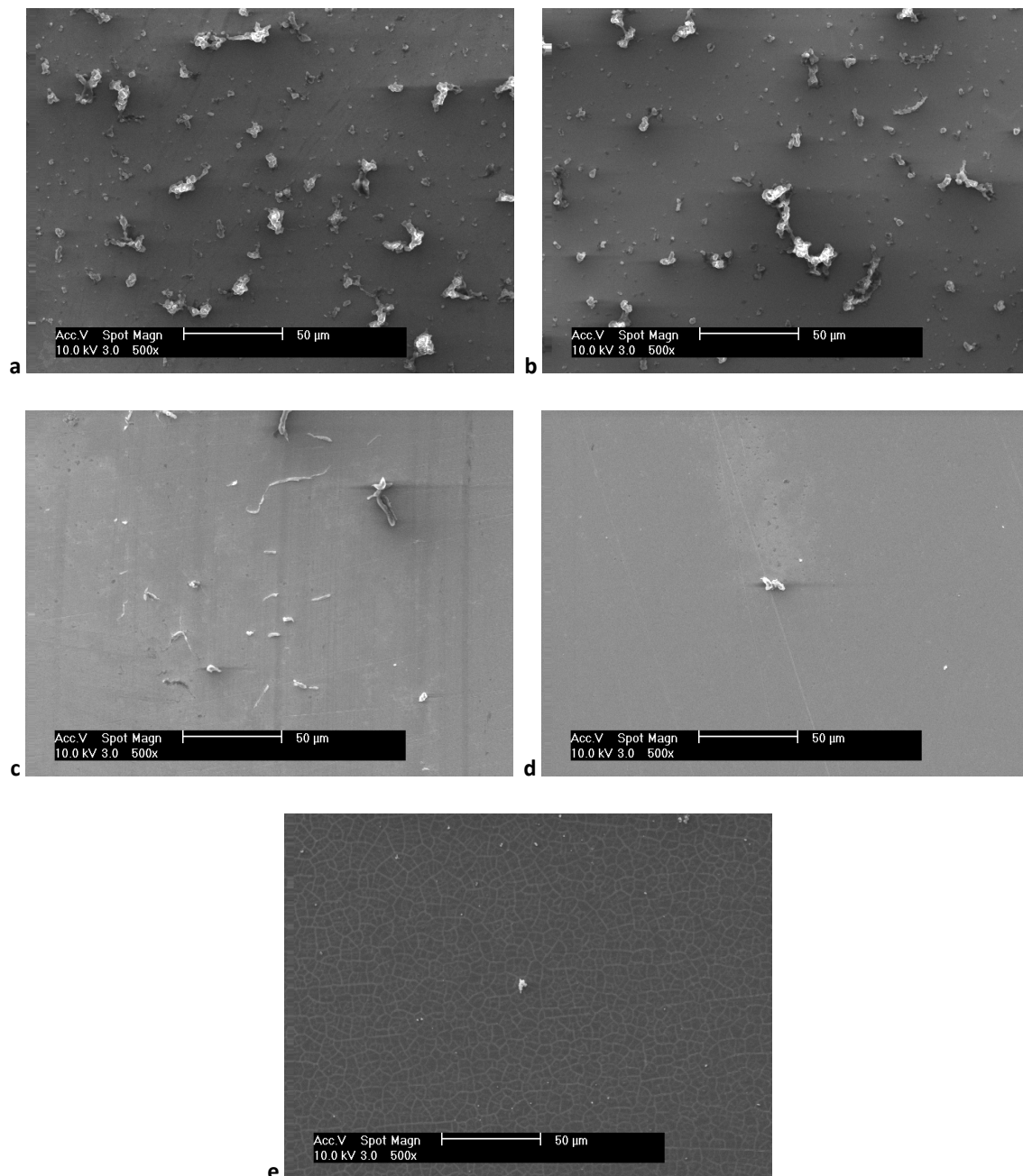


Figura 28 - Morfologia superficial após o teste de imersão estático numa solução com BSA e trombina. a)316L, b)F0, c) F5, d) F20 e e) F50

Uma observação genérica permite concluir que há uma menor quantidade de proteínas adsorvidas em qualquer uma das superfícies testadas e, quando essa adsorção existe, a BSA parece ser a única proteína adsorvida. Uma análise mais detalhada permite afirmar que as maiores quantidades de albumina se encontram nas superfícies que não têm flúor (316L e F0). Com o aumento do teor de flúor, a quantidade de proteína adsorvida diminui, sendo praticamente inexistente para os filmes com teores mais elevados daquele elemento químico.

Uma explicação para a prevalência da BSA em relação à trombina é a ocorrência do *Efeito de Vroman*, isto porque a BSA tem um peso molecular superior ao da trombina e por outro lado a quantidade de BSA presente na solução também é bastante superior. Deste modo, a probabilidade de interagir primeiro com as superfícies é maior e, se porventura a trombina for adsorvida primeiro, a regra do peso molecular promove a desadsorção da trombina para a adsorção de BSA.

A comparação entre as morfologias superficiais dos testes de imersão em solução de proteínas, com os dos testes de imersão apenas em água destilada, permite observar que há uma maior degradação dos filmes finos quando são apenas expostos a água desionizada. Isto acontece pois as proteínas aumentam a força iônica da solução, o que origina uma diminuição do efeito osmótico. A libertação de elementos dos filmes finos é mais rápida se a solução tiver baixa força iônica, pois tende a equilibrar as concentrações na superfície e na solução. Assim, a presença de proteínas em solução resulta “num efeito protector” no que respeita a integridade estrutural das proteínas.

b) Estudo em condições dinâmicas

Neste estudo foi utilizada uma bomba peristáltica com uma velocidade de fluxo de 0,25 mL/s. O copo com a solução de proteína(s) foi colocado numa placa de aquecimento, de modo a manter a temperatura a 37°C e as duas extremidades do tubo de silicone foram colocadas dentro do copo, onde também se encontrava a amostra. O teste durou duas horas sem agitação.

A Figura 29 ilustra o comportamento da BSA nas amostras quando estas foram submetidas ao fluxo dinâmico da solução aquosa desta proteína.

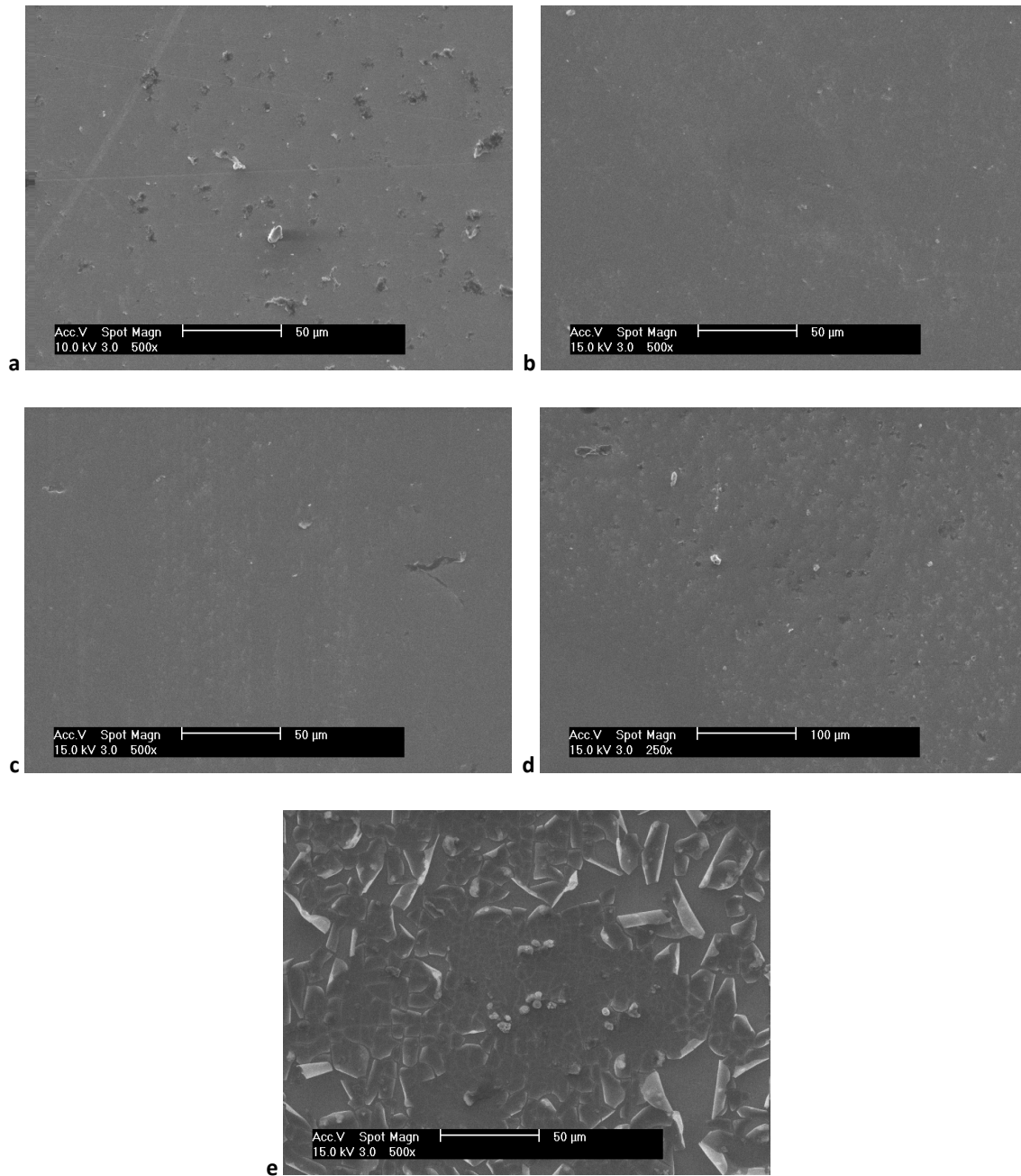


Figura 29 - Morfologia superficial das superfícies após testes com solução de BSA em condições dinâmicas. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20 e e) F50

A comparação destas imagens com as resultantes do teste estático com a mesma proteína, permite concluir uma diminuição da adsorção de BSA quando o teste foi efectuado em condições dinâmicas. Este resultado pode ser devido ao facto de, em condições dinâmicas, o tempo médio de interacção da proteína com as superfícies ser inferior e pode não ser o suficiente para que ocorra uma interacção inicial que leve posteriormente à adsorção proteica. Novamente é evidente o destacamento do filme fino F50.

O último estudo, e também o mais significativo para este trabalho, foi aquele no qual os filmes foram estudados num fluxo dinâmico de uma solução aquosa das duas proteínas. As micrografias seguintes (Figura 30) permitem a observação da morfologia após este teste.

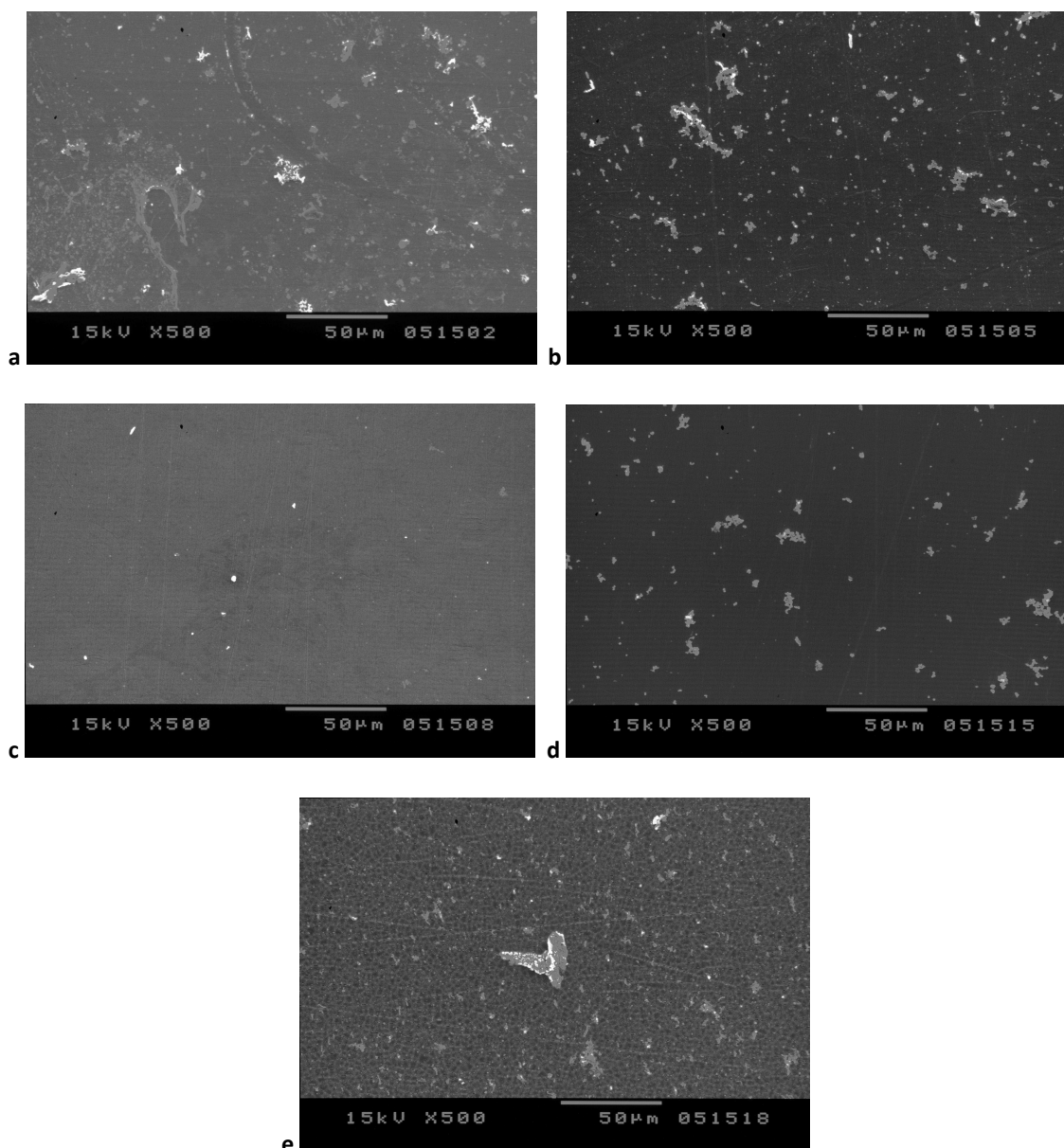


Figura 30 - Morfologia superficial após a imersão em solução com ambas proteínas em condições dinâmicas. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20 e e) F50

As imagens permitem observar que a presença do PTFE diminui a adsorção de proteínas uma vez que as superfícies que apenas contém aço inoxidável 316L apresentam uma maior quantidade de aglomerados proteicos. Mas, para a maioria das superfícies, ocorre uma maior quantidade de proteínas adsorvidas, do que acontece no teste apenas com BSA. Uma das possíveis explicações para este facto reside, conjuntamente, no aumento da força iónica

da solução (devido á adição de mais proteína) e na presença de um fluxo dinâmico. Com efeito, estando a solução em circulação, a concentração dos elementos libertados das superfícies do filme fino localizada na superfície dos filmes diminui pois estão a ser libertados e removidos para a solução. Contrariamente, no teste feito em condições estáticas os elementos químicos tendem a ficar junto ao local da sua libertação, aumentando assim a sua concentração junto à superfície. Esta conjugação de factores pode tornar as superfícies “mais atractivas” para uma interacção, e posterior adsorção, das proteínas.

Finalmente, uma outra observação interessante é o facto de existir uma composição óptima para diminuir a adsorção de proteínas na superfície dos filmes finos que, conforme o já referido, é um dos objectivos deste trabalho. As propriedades/características óptimas parecem ocorrer no filme fino designado por F5.

Uma melhor visualização das proteínas na superfície de cada superfície após o teste dinâmico de uma solução com as duas proteínas foi efectuada recorrendo aos mapas de distribuição elementar do azoto (Figura 31). Este elemento apenas existe nas proteínas e não nas superfícies estudadas. O mapeamento foi efectuada na microsonda electrónica e as imagens 2D foram tratadas no programa de distribuição gratuita ImageJ para uma melhor visualização tridimensional. Assim, através da visualização dos gráficos é possível complementar o que foi observado com o SEM.

Deste modo, é mais uma vez visível que o filme fino F5 apresenta uma superfície óptima para a não-adsorção de proteínas. Verifica-se a ocorrência de uma diminuição da adsorção até chegar a superfície F5 e um aumento da adsorção nos filmes com maior percentagem atómica de flúor. A presença de azoto é bastante uniforme e em quantidades mais elevadas no filme F50. É importante ter em conta que a microsonda electrónica apenas detecta os elementos químicos seleccionados, não indicando o estado em que a proteína se encontra (se esta desnaturada ou não).

Do estudo efectuada o filme fino que apresentou o melhor desempenho, no que diz respeito à concepção de uma superfície que diminua a adsorção de proteínas é, sem dúvida, o filme designado por F5. O desfecho lógico para este trabalho foi revestir um stent vascular com as condições de deposição do referido filme fino e comparar o seu desempenho, em condições dinâmicas e na presença das duas proteínas, com o de um stent de aço 316L não revestido.

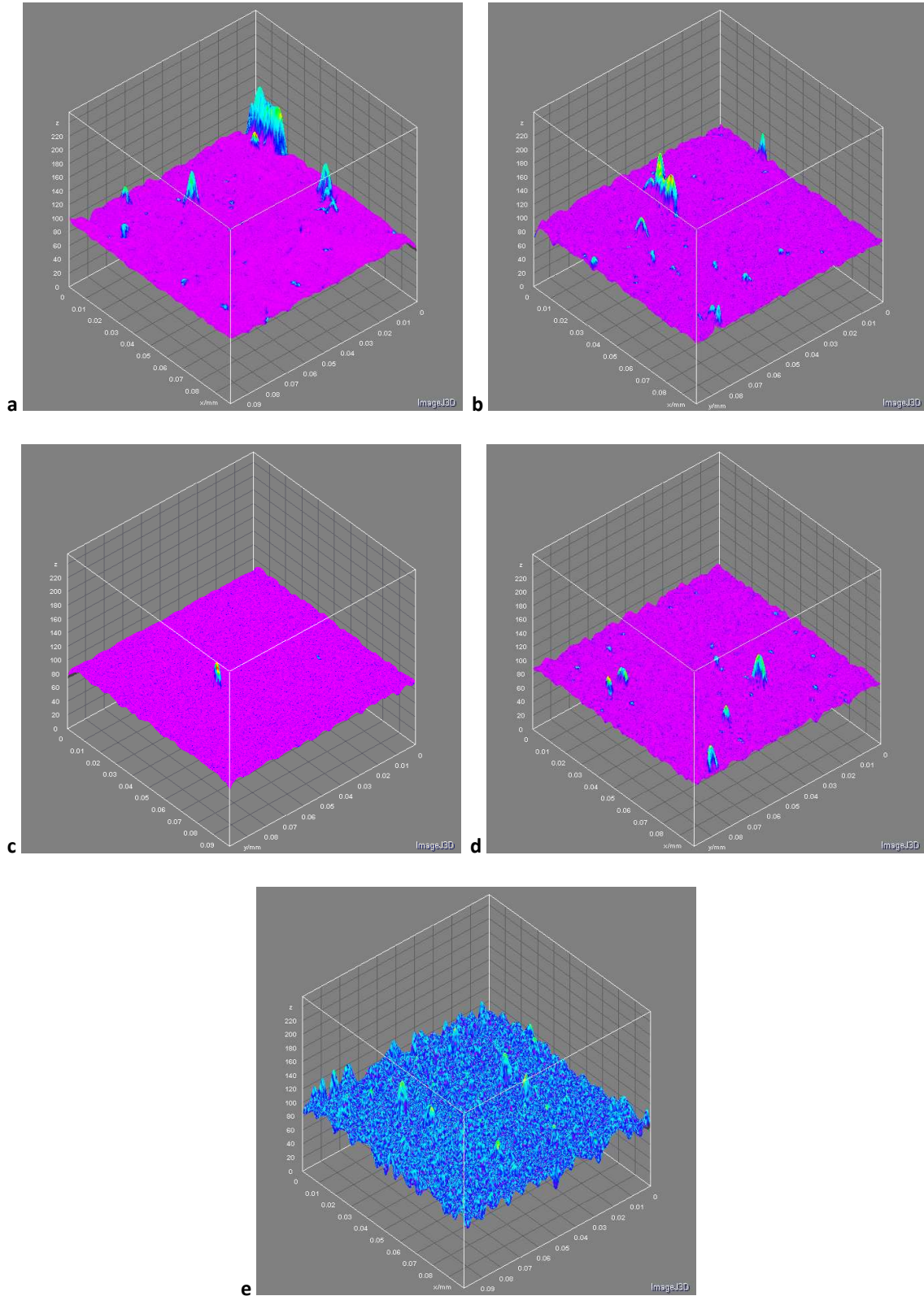


Figura 31 - Visualização 3D das proteínas sorvidas em condições dinâmicas em cada superfície. a) 316L, b) F0, c) F5, d) F20 e e) F50

c) *Estudo em stent*

No estudo em condições dinâmicas, e dada a geometria cilíndrica do stent, este foi colocado no interior do tubo de silicone na extremidade que correspondia à entrada do fluxo. As micrografias de SEM dos stents (Figura 32) revelam claramente os benefícios de revestir o dispositivo, vindo deste modo comprovar os resultados já apresentados, uma vez que a adsorção de proteínas é muito superior no stent de aço 316L não revestido.

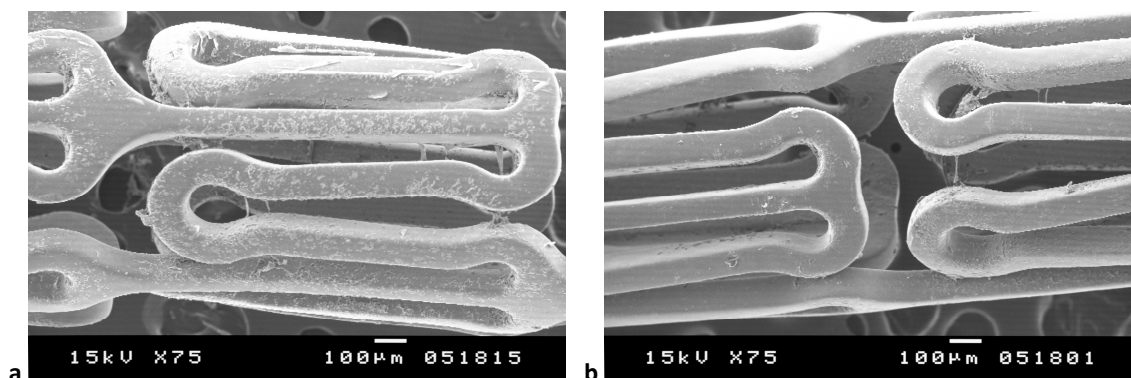


Figura 32 - Morfologia superficial do stent após teste em fluxo dinâmico com as duas proteínas. a) 316L, b) F5

É notória a presença de uma película de proteínas adsorvidas, mais ou menos uniforme no stent que não foi revestido. Por outro lado o dispositivo modificado com o filme fino F5 apresenta uma taxa de adsorção muito menor e com maior incidência nas zonas curvas do stent. Estes resultados estão evidenciados nas micrografias seguintes (Figura 33).

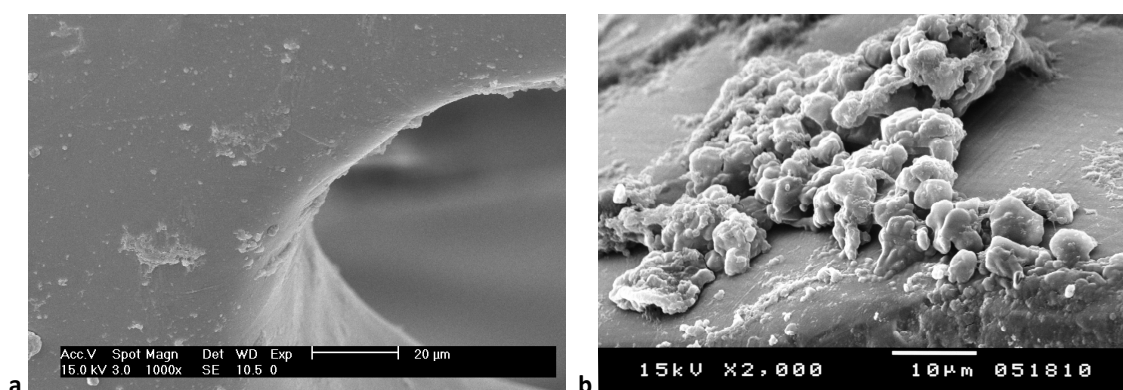


Figura 33 - Morfologia superficial do stent. a) morfologia superficial da zona curva do stent modificado com F5 e b) ampliação da zona com adsorção da proteína.

A observação das micrografias evidencia a morfologia das proteínas e parecem indicar que embora a proteína predominante seja a BSA, também é possível detectar trombina em ambos stents. Apesar da presença de trombina ser um aspecto negativo, esta é bastante menor no stent revestido. Este facto a confirmar-se, é um aspecto favorável uma vez que se a concentração desta proteína é menor no stent revestido, mais dificilmente poderá desencadear reacções adversas que possam culminar com a rejeição do dispositivo ou com a ocorrência de restenose. Estas observações basearam-se na existência de fios de proteínas que se formaram, fazendo uma ligação entre duas partes do stent (Figura 34). Estes fios são trombina, uma vez que a albumina sendo uma proteína globular, supostamente não consegue formar este tipo de estruturas.

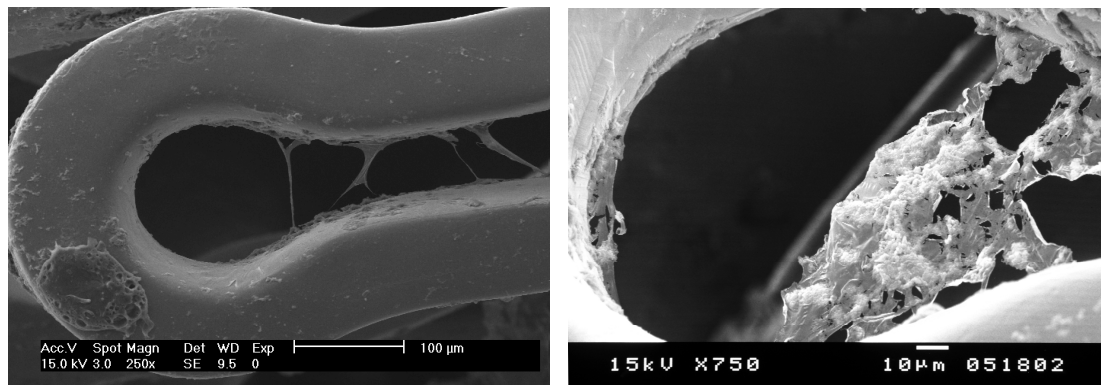


Figura 34 - Micrografias da superfície do stent de aço 316L não revestido onde é possível observar duas morfologias distintas de proteínas.

Conclusões

O trabalho desenvolvido na modificação da superfície de stents vasculares com o objectivo de diminuir a adsorção de proteínas sanguíneas na sua superfície deu origem a resultados bastante promissores. As principais conclusões a retirar do presente trabalho são:

- A deposição de filmes finos de PTFE e aço 316L, através da co-deposição por pulverização catódica, permite a incorporação de teores de flúor até 50% atómico.
- A incorporação de PTFE nos filmes finos revelou ser uma boa escolha pois diminui a adsorção de proteínas quando comparada com superfícies sem incorporação de material polimérico. A optimização do teor de flúor nos filmes finos permitiu distinguir, pelos testes efectuados, uma concentração de cerca de 5% atómica como sendo a ideal para o objectivo do trabalho.
- O trabalho utilizou uma técnica não poluente para a observação e distinção entre os dois tipos de proteínas utilizadas. A utilização do SEM mostrou que o estudo, de uma solução com as duas proteínas, em condições dinâmicas ou estáticas dá origem a resultados distintos: para baixos teores de flúor ($F \leq 5\%$ atómico) as condições dinâmicas e estáticas são muito semelhantes, enquanto que para teores superiores daquele elemento químico, a adsorção aumenta quando as amostras são testadas em condições dinâmicas e mais próximas das condições reais.
- A técnica permitiu modificar um stent real, mostrando a sua capacidade para revestir superfícies com geometria complexa. Os testes efectuados em stents validaram os efectuados em amostras de aço 316L sob a forma de chapa, indicando ser possível efectuar todos os estudos preliminares de optimização em substratos distintos (na geometria) dos implantes reais. Este facto é muito animador dado o elevado custo dos dispositivos reais.

Para trabalho futuro sugeria-se o teste em vários stents modificados com amostras de sangue para efectivamente aproximar estes testes às condições reais de utilização no corpo humano.

Referências Bibliográficas

1. <http://www.manualmerck.net/?url=/artigos/%3Fid%3D52>, acessado em 20/04/2009
2. <http://www.spc.pt/SPC/Microsites/Passaporte/pdfs/aterosclerose.pdf>, acessado em 25/05/2009
3. <http://www.drmcDougall.com/misc/2006nl/sept/angio.htm>, acessado em 25/05/2009
4. Kathuria YP. (2007) "Some aspects of drug eluting stents" – *Int J Cardiol* 119: 380-383
5. <http://www.heartsurgeons.com/ed2.html>, acessado em 25/05/2009
6. Brown DA, Lee EW, Loh CT, Kee ST. (2009) "A new wave in treatment of vascular occlusive disease: biodegradable stents – clinical experience and scientific principles" – *J Vasc Interv Radiol* 20:315-325
7. Guérios EE, Bueno RRL, Andrade PMP, Nercolini DC, Pacheco ALA. (1998) "Stents. Uma revisão da literatura" – *Arq Bras Cardiol* 71(1):77-87
8. França LHG, Pereira AH. (2008) "Atualização sobre endopróteses vasculares (stents): dos estudos experimentais à prática clínica" – *J Vasc Bras* 7(4):351-363
9. Kathuria YP. (2006) "The potential of biocompatible metallic stents and preventing restenosis" – *Materials Science and Engineering A* 417:40-48
10. O'Brien B, Carrol W. (2009) "The evolution of cardiovascular stent materials and surfaces in response to clinical drivers: a review" – *Acta Biomater* 5:945-958
11. Hara H, Nakamura M, Palmaz JC, Schwartz RS. (2006) "Role of stent design and coatings on restenosis and thrombosis" – *Adv Drug Deliver Rev* 58:377-386
12. Zartner P, Buettner M, Singer H, Sigler M. (2007) "First biodegradable metal stent in a child with congenital heart disease: evaluation of macro and histopathology" – *Catheter Cardio Inte* 69:443-446
13. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM. (2007) "Coronary stents: a materials perspective" – *Biomaterials* 28:1689-1710
14. Shibata M, *et al.* (2001) "The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation" – *Histochem Cell Biol* 116:471-481
15. Hawana T. (2009) "Materials for metallic stents" – *J Artif Organs* 12:73-79
16. Completo CDS. (2008) "Adsorção de albumina bovina e ácido hialurónico em cerâmicos de titânio", Instituto Superior Técnico, Lisboa

17. Gordon BM, Fishbein MC, Levi DS. (2008) "Polytetrafluoroethylene-covered stents in the venous and arterial system: angiographic and pathologic findings in a swine model" – *Cardiovasc Pathol* 17:206-211
18. Grüdtner MA, *et al.* (2004) "Efeitos a curto prazo de stents não recobertos e recobertos com politetrafluoroetileno em aorta de suínos: um modelo experimental" – *Acta Cirúrgica Brasileira* 19(2):126-130
19. Yaseen M, Salacinski HJ, Seifalian AM, Lu JR. (2008) "Dynamic protein adsorption at the polyurethane copolymer/water interface" – *Biomed Mater* 3: 34123-34135
20. Yuan Y, Liu C, Yin M. (2008) "Plasma polymerized n-butyl methacrylate coating with potential for re-endothelialization of intravascular stent devices" – *J Mater Sci: Mater Med* 19:2187-2196
21. Cunha ALCG. (2000) "Estudo dos mecanismos de degradação em revestimentos PVD baseados em nitretos metálicos no processamento de materiais plásticos", Universidade do Minho, Braga
22. Liu C, Fairhurst RG, Ren L, Green SM, Tong J, Arnell RD. (2002) "Co-deposition of titanium/polytetrafluoroethylene films by unbalanced magnetron sputtering" – *Surf Coat Technol* 149:143-150
23. Piedade AP, Nunes J, Vieira MT (2008) "Thin films with chemical functionality based on fluorine polymers and stainless steel" – *Acta Biomater* 4(4):1073-1080
24. Piedade AP, Nunes J, Vieira MT (2009) "Mechanical characterization of a functionally graded nanocomposite thin film" – *J Nanosci Nanotechnol* 9:3792-3797
25. Desroches MJ, Chaudhary N, Omanovic S. (2007) "PM-IRRAS investigation of the interaction of serum albumin and fibrinogen with a biomedical-grade stainless steel 316LVM surface" – *Biomacromolecules* 8(9):2836-2844
26. Gispert MP, Serro AP, Colaço R, Saramago B. (2008) "Bovine serum albumin adsorption onto 316L stainless steel and alumina: a comparative study using depletion, protein radiolabeling, quartz crystal microbalance and atomic force microscopy" – *Surf Interface Anal* 40:1529-1537
27. Latour RA. (2005) "Biomaterials: protein-surface interactions" *in* *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* – Taylor & Francis
28. Kang CK, Lee YS. (2007) "The surface modification of stainless steel and the correlation between the surface properties and protein adsorption" – *J Mater Sci: Mater Med* 18:1389-1398
29. Lousinian S, Logothetidis S. (2007) "Optical properties of proteins and protein adsorption study" – *Microelectron Eng* 84:479-485
30. Clarke B, *et al.* (2007) "Effect of nitinol wire surface properties on albumin adsorption" – *Acta Biomater* 3:103-111

31. Becker RC, Spencer FA. (1998) "Thrombin: structure, biochemistry, measurement and status in clinical medicine" – *J Thromb Thrombolys* 215-229
32. Turgeon VL, Houenou LJ. (1997) "The role of thrombin-like serine/proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system" – *Brain Res Rev* 25:85-95
33. <http://www.sigmaaldrich.com>, acessado em 20/04/2009
34. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/480073/prothrombin>, em 28/02/2009
35. Vieira MT, Cavaleiro A. (1995) "Textos de apoio à disciplina de Engenharia de Superfícies do Mestrado Integrado em Engenharia Mecânica" – Universidade de Coimbra, Coimbra
36. <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/818/3/Cap%C3%ADtulo%201.pdf>, acessado em 26/03/2009
37. Mitsakakis K, Lousinian S, Logothetidis S. (2007) "Early stages of human plasma proteins adsorption probed by atomic force microscopy" – *Biomol Eng* 24:119-124
38. Gupta V, Johnson AD, Martynov V, Menchaca L. "Nitinol thin film three-dimensional devices – fabrication and applications" – comunicado interno *in* TiNi Alloy Company, San Leandro
39. Karagkiozaki V, Logothetidis S, Giannoglou G. (2008) "Advances in stent coating technology via nanotechnology tools and process" – *Eur J Nanomed* 1:24-28
40. http://www.plasmachem.com/content/english/biodiamond_benefits.html, acessado em 14/06/2009
41. <http://www.entrepreneur.com/tradejournals/article/178746861.html>, acessado em 14/06/2009
42. <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3543/6/5-CAP1.pdf>, acessado em 26/03/2009
43. Piedade AP. (2001) "A pulverização catódica e os biomateriais" – Universidade de Coimbra, Coimbra
44. http://probelab.geo.umn.edu/electron_microprobe.html, acessado em 29/03/2009
45. <http://goldbook.iupac.org/A00155.html>, acessado em 03/09/2009
46. <http://goldbook.iupac.org/S05769.html>, acessado em 03/09/2009
47. Desroches MJ, Omanovic S. (2008) "Adsorption of fibrinogen on a biomedical-grade stainless steel 316LVM surface: a PM-IRRAS study of the adsorption thermodynamics, kinetics and secondary structures changes" – *Phys Chem Chem Phys* 10:2502-2512
48. Swain BP. (2006) "Human serum albumin (HSA) adsorption onto a-SiC:H thin films deposited by hot wire chemical vapor deposition" – *Appl Surf Sci* 253:2310-2314

49. <http://www.ufv.br/dpf/320/RaiosX.pdf>, acessido em 28/05/2009
50. <http://bioagency.com.br/novo/folders/500-0006N.pdf>, acessido em 15/07/2009
51. Kaplan SL, Lopata ES, Smith J. (1993) "Plasma processes and adhesive bonding of polytetrafluoroethylene" – *Surf Interface Anal* 20:331-336
52. <http://mdmetric.com/or/proprigb.htm>, acessido em 07/07/2009
53. Bren L, *et al.* (2004) "Hydrophilic/electron-acceptor surface properties of mettalic biomaterials and their effect on osteoblast cell activity" – *J Adhesion Sci Technol* 18:1711-1722