

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Engenharia Biomédica

Modificação superficial de uma poliuretana para preparação de válvulas cardíacas

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica, sob orientação da Professora Doutora Margarida Figueiredo e co-orientação da Doutora Paula Calvino e do Doutor Ilídio Correia.

Rute Monteiro Cardoso

Coimbra 2012

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Agradecimentos

A realização deste trabalho decorreu no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, numa parceria com a Universidade da Beira Interior.

Deste modo, começo por agradecer à Doutora Maria Helena Gil, pela disponibilidade dos laboratórios e equipamentos do grupo de polímeros, no qual o projecto se integrou.

Agradeço à Doutora Margarida Figueiredo e à Doutora Paula Calvino a oportunidade, orientação e disponibilidade, que permitiram a realização do projecto.

Ao Doutor Ilídio Correia, agradeço a disponibilidade para a realização dos testes de adesão celular e a sua co-orientação.

Agradeço também à Doutora Patrícia Alves pela sua disponibilidade, ajuda e acompanhamento ao longo do decorrer desta tese.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, irmã e à Inha, por estarem sempre presentes desde o início para me apoiar.

Finalmente, agradeço aos meus amigos pelo apoio e pelos bons momentos jamais esquecidos durante estes anos. Ao Álvaro, agradeço ainda a cooperação neste projecto.

Resumo

O objectivo principal deste trabalho consistiu na modificação da superfície de membranas de uma poliuretana termoplástica (*Elastollan 1180A50*[®]), de modo a que esta superfície se tornasse mais hidrofílica, hemocompatível e promovesse a adesão e proliferação celulares para poder ser aplicada como válvula cardíaca artificial. Para tal, foram usadas diferentes técnicas de modificação, nomeadamente, modificação por radiação ultravioleta (UV), química (ligação de grupos NH₂) e por Plasma. Pretende-se uma alteração das propriedades de superfície da membrana, sem alterar as suas propriedades de massa.

As membranas foram modificadas por radiação UV e de seguida foram enxertados dois monómeros distintos: ácido metacrílico (MAA) e o metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), devido às suas características hidrofílicas. Numa segunda técnica, as membranas foram modificadas quimicamente, através da incubação em hexametilendiamina, para ligar grupos amina (NH₂). Finalmente, as membranas foram modificadas por Plasma, com Árgon e Oxigénio, de forma a avaliar os parâmetros de modificação mais eficazes. Após isto, e apenas para os parâmetros ideais, foram enxertadas com os monómeros HEMA e MAA.

As alterações da superfície das membranas foram avaliadas pelas técnicas: Ângulos de Contacto e Energias de Superfície (através do método de Owens, Wendt, Rabel e Kaelble) e FTIR (espectroscopia de infravermelhos). Além disso, foram também efectuados testes de adesão e proliferação celulares, de actividade antibacteriana e de hemocompatibilidade.

Em todas estas técnicas verificou-se o aumento da hidrofilicidade das membranas, bem como a adesão e proliferação celulares. Apenas as membranas modificadas com hexametilendiamina não demonstraram qualquer efeito antibacteriano.

O comportamento das membranas quando em contacto com o sangue foi diferente entre elas. À excepção das membranas modificadas por Plasma seguido do enxerto de HEMA e das modificadas por ligação de grupos NH₂, o índice trombogénico é muito elevado. No que diz respeito ao índice hemolítico, as membranas modificadas por UV e

por Plasma seguidas do enxerto de HEMA demonstraram ser não-hemolíticas. Já as membranas modificadas com UV seguido de MAA, mostraram-se hemolíticas para o contacto indirecto e não-hemolíticas para o directo. Por outro lado, quando a modificação é por Plasma seguida do enxerto de MAA, as membranas são hemolíticas para o contacto directo e ligeiramente hemolíticas para o indirecto. Finalmente, para a hexametilendiamina, as membranas demonstraram ser hemolíticas em ambos os casos.

Quando expostas ao ar, as membranas recuperam a sua hidrofobicidade. Uma forma de impedir essa recuperação é a incubação das membranas em meio de cultura (DMEM-F12), que mantém o seu ângulo de contacto aproximadamente constante ao longo do tempo, em valores baixos.

Em relação à percentagem de inchaço, obtiveram-se valores insignificantes (<2%) para todas as técnicas de modificação.

Assim, considerando todas as características dos materiais modificados, os melhores resultados foram obtidos para a modificação por Plasma seguida do enxerto de HEMA.

Abstract

The objective of this work was the modification of the surface membrane of a thermoplastic polyurethane (*Elastollan 1180A50*[®]), in order to turn the surface more hydrophilic, to improve the hemocompatibility and promote cell adhesion and proliferation to be applied as artificial heart valves. For this purpose, different techniques were used for modification, namely, modification by UV, chemical (NH_2 bound) and Plasma. Surface modification aims to tailor the surface characteristics of a material without altering its bulk properties.

The membranes were modified by ultraviolet radiation (UV) and then two distinct monomers were grafted: methacrylic acid (MAA) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), due to its hydrophilic characteristics. In a second technique, membranes were chemically modified through incubation of 1,6-hexanediamine, to bound amino groups (NH_2). Finally, membranes were modified using Plasma, with Argon and Oxygen, in order to evaluate the most effective modification parameters. After this, and only for the optimal parameters, the membranes were grafted with HEMA and MAA.

The changes of polymer surface properties were evaluated by different techniques: Contact Angles and Surface Energies (through Owens, Wendt, Rabel and Kaelble method) and FTIR (Fourier transform infrared). Membranes were also tested for blood compatibility, cell adhesion and proliferation and antibacterial effect.

In all of these techniques there was an increase of membranes hydrophilicity and cell adhesion and proliferation were verified. Only the membranes grafted with amine groups didn't present antibacterial effect.

The behavior of the membranes in contact with the blood is different between them. Except the modification by Plasma followed by HEMA grafting and the bounding of NH_2 groups, the thrombogenicity is very high. For the hemolytic index, membranes modified by UV and Plasma followed by the graft of HEMA shown to be non-hemolytic. The membranes modified by UV followed by the graft of MAA, were hemolytic for the indirect contact and non-hemolytic to direct. In contrast, when the modification is by Plasma followed by the graft of MAA, membranes are hemolytic for direct contact and

slightly hemolytic for indirect. Finally, for 1,6-hexanediamine, the membranes showed hemolytic in both cases.

When exposed to air, the membranes recovered its hydrophobicity. One way to prevent this recovery is the incubation of the membranes in a culture medium (DMEM_F12), which maintains its contact angle approximately constant over time. Regarding the percentage of swelling were obtained insignificant amounts (<2%) for all modification techniques.

Thus, considering all the features of the modified materials, the best results were obtained for the modification by Plasma followed by HEMA grafting.

Índice

Resumo	IV
Abstract	VI
Índice	VIII
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas	XIII
Índice de Gráficos	XIV
Acrónimos.....	XVI
Motivação.....	XVII
Capítulo 1.....	1
Fundamentos teóricos	1
1.1. O coração	1
1.1.1. Válvulas Cardíacas	3
1.1.2. Doenças valvulares.....	5
1.2. Válvulas artificiais.....	6
1.2.1. Válvulas mecânicas.....	6
1.2.2. Válvulas biológicas	9
1.2.3. Válvulas Poliméricas.....	11
1.2.4. Características ideais.....	13
1.3. Poliuretanas.....	13
1.3.1. Reacção de polimerização.....	14
1.3.2. <i>Elastollan 1180A50</i> [®]	15
1.4. Modificação de superfícies.....	16
Capítulo 2.....	18
Materiais e Métodos.....	18
2.1. Estratégia experimental	18
2.2. Reagentes.....	19
2.3. Preparação das membranas.....	21
2.4. Técnicas de caracterização.....	22
2.4.1. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície.....	22

2.4.2.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR).....	24
2.4.3.	Capacidade de inchaço (<i>Swelling</i>).....	26
2.4.4.	Cultura de células.....	26
2.4.5.	Hemocompatibilidade.....	30
2.4.5.1.	Avaliação da trombogenicidade.....	30
2.4.5.2.	Avaliação do índice hemolítico.....	31
Capítulo 3.....		35
Modificação por Radiação Ultravioleta (UV).....		35
3.1.	Técnica de modificação.....	35
3.2.	Procedimento experimental.....	38
3.3.	Resultados e Discussão.....	38
3.3.1.	Ângulos de Contacto e Energias de Superfície.....	38
3.3.2.	Hidrofilicidade ao longo do tempo.....	40
3.3.3.	Avaliação da capacidade de inchaço (<i>Swelling</i>).....	45
3.3.4.	Cultura de células.....	47
3.3.5.	Hemocompatibilidade.....	50
3.3.5.1.	Avaliação da trombogenicidade.....	50
3.3.5.2.	Avaliação do índice hemolítico.....	51
3.4.	Conclusão.....	53
Capítulo 4.....		55
Modificação com hexametilendiamina.....		55
4.1.	Técnica de modificação.....	55
4.2.	Procedimento experimental.....	56
4.3.	Resultados e Discussão.....	57
4.3.1.	Ângulos de Contacto e Energias de Superfície.....	57
4.3.2.	Hidrofilicidade ao longo do tempo.....	58
4.3.3.	Avaliação por ATR-FTIR.....	59
4.3.4.	Avaliação da capacidade de inchaço (<i>Swelling</i>).....	60
4.3.5.	Cultura de células.....	61
4.3.6.	Hemocompatibilidade.....	63
4.3.6.1.	Avaliação da trombogenicidade.....	63

4.3.6.2.	Avaliação do índice hemolítico.....	64
4.4.	Conclusão	65
Capítulo 5.....		67
Modificação por Plasma		67
5.1.	Técnica de modificação	67
5.2.	Procedimento experimental	71
5.3.	Resultados e Discussão	71
5.4.	Conclusão	75
Capítulo 6.....		76
Modificação por Plasma com enxerto de HEMA e MAA.....		76
6.1.	Técnica de modificação	76
6.2.	Procedimento experimental	77
6.3.	Resultados e Discussão	77
6.3.1.	Ângulos de contacto e Energias de Superfície.....	77
6.3.2.	Hidrofilicidade ao longo do tempo.....	79
6.3.3.	Avaliação da capacidade de inchaço (<i>Swelling</i>).....	82
6.3.4.	Cultura de células.....	83
6.3.5.	Hemocompatibilidade.....	85
6.3.5.1.	Avaliação da trombogenicidade.....	85
6.3.5.2.	Avaliação do índice hemolítico.....	86
6.4.	Conclusão	87
Conclusão Geral e Trabalho Futuro		89
Bibliografia.....		92
Anexos		99
Anexo A		100
Anexo B		101

Índice de Figuras

Figura 1: Constituição da parede cardíaca. _____	2
Figura 2: Organização das diferentes cavidades do coração. Direcção do fluxo sanguíneo. ____	2
Figura 3: Vista de topo das válvulas cardíacas após remoção das aurículas e das artérias aorta e pulmonar (a vermelho, o esqueleto fibroso). _____	4
Figura 4: Fecho das válvulas cardíacas com sobreposição dos folhetos. Esquemática do gradiente de pressão a actuar contra a válvula fechada e da força de atrito lateral provocada pela sobreposição dos folhetos. _____	5
Figura 5: Estenose das válvulas aórtica e mitral, cujo estreitamento as impede de abrir totalmente. _____	6
Figura 6: Válvulas caged ball: (a) Hufnagel–Lucite valve, (b) Starr–Edwards, (c) Smeloff–Cutter, (d) McGovern– Cronie, (e) DeBakey–Surgitool and (f) Cross–Jones. _____	8
Figura 7: Válvulas biológicas comuns: (a) Hancock- válvula de tecido porcino (cortesia de Medtronic Heart Valves, Minneapolis, MN); (b) PhotoFix™ α pericárdio (cortesia de Sulzer-CarboMedics, Inc., Austin, TX.). _____	10
Figura 8: Estrutura do grupo uretana. _____	14
Figura 9: Reacção de síntese de uma uretana. _____	15
Figura 10: Esquema de métodos físico-químicos de modificação de superfícies. _____	17
Figura 11: Esquema da estratégia experimental adoptada para este trabalho. _____	19
Figura 12: Membranas de <i>Elastollan 1180A50</i> ®. _____	22
Figura 13: Representação do ângulo de contacto e das tensões interfaciais. _____	22
Figura 14: Funcionamento do ATR. _____	25
Figura 15: Estrutura do Irgacure ® 2959. _____	36
Figura 16: Estrutura do ácido metacrílico (MAA). _____	37
Figura 17: Estrutura do metacrilato de 2-hidroxi-etilo (HEMA). _____	37
Figura 18: Representação esquemática da modificação por radiação UV. _____	38
Figura 19: Técnica UV de modificação das membranas. _____	38
Figura 20: Fotografias microscópicas das células (fibroblastos humanos) na presença dos materiais modificados com UV, dos não modificados e dos controlos positivo (K^+) e negativo (K^-), para 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. _____	47
Figura 21: Actividade celular após 24, 48, 72 e 96 horas em contacto com os diferentes materiais e controlos positivo (K^+) e negativo (K^-). _____	48
Figura 22: Imagem da placa usada para a determinação do MIC dos materiais modificados e não-modificados. O peso do material diminui ao longo da linha. _____	49
Figura 23: Imagem da placa usada para a determinação do MIC dos materiais modificados e não-modificados, a partir do teste da resazurina. O peso do material diminui ao longo da linha. _____	49
Figura 24: Imagem da placa de ágar para determinação da MBC dos materiais. _____	50
Figura 25: Estrutura química da hexametilendiamina. _____	56
Figura 26: Incubação das membranas na solução de hexametilendiamina/propanol. _____	56

Figura 27: Fotografias microscópicas das células (fibroblastos humanos) na presença dos materiais modificados com hexametilendiamina, dos não modificados e dos controlos positivo (K+) e negativo (K-), para 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. _____	62
Figura 28: Esquema representativo dos estados da matéria. _____	67
Figura 29: Esquema representativo do processo de activação. _____	69
Figura 30: Esquema representativo do processo de <i>Etching</i> . _____	69
Figura 31: Esquema representativo do processo de deposição. _____	69
Figura 32: Imagem da técnica de modificação das membranas por Plasma. _____	71
Figura 33: Representação esquemática da modificação por Plasma. _____	77
Figura 34: Fotografias microscópicas das células (fibroblastos humanos) na presença dos materiais modificados por Plasma, dos não modificados e dos controlos positivo (K+) e negativo (K-), para 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. _____	84

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais materiais usados no fabrico de válvulas cardíacas. _____	12
Tabela 2: Reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental. _____	20
Tabela 3: Classificação dos materiais relativamente ao seu índice hemolítico. _____	34
Tabela 4: Valores obtidos para a percentagem de trombose dos materiais não modificados e dos modificados por UV, bem como do controlo positivo. _____	51
Tabela 5: Valores obtidos para a percentagem de trombose dos materiais não modificados e dos modificados com hexametilendiamina, bem como do controlo positivo. _____	63
Tabela 6: Classificação dos materiais relativamente ao seu índice hemolítico. _____	86
Tabela 7: Resultados médios obtidos para os ângulos de contacto das membranas modificadas por UV, durante diferentes tempos de irradiação, para os 2 monómeros enxertados (HEMA e MAA). _____	100
Tabela 8: Resultados médios obtidos para os ângulos de contacto das membranas modificadas por Plasma, com o gás Árgon, para diferentes tempos e pressões. _____	101
Tabela 9: Resultados médios obtidos para os ângulos de contacto das membranas modificadas por Plasma, com o gás Oxigénio, para diferentes tempos e pressões. _____	101

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Ângulo de contacto obtido para os diferentes tempos de irradiação com UV, para os dois monómeros (HEMA E MAA).	39
Gráfico 2: Energia de superfície representada pelas componentes polar e dispersiva, quer para as membranas não modificadas, quer para as modificadas por UV.....	40
Gráfico 3: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas com UV e não-modificadas, expostas ao ar.....	41
Gráfico 4: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas não modificadas, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).	42
Gráfico 5: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas por UV_HEMA, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).	44
Gráfico 6: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas por UV_MAA, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).	44
Gráfico 7: Capacidade de inchaço das membranas não-modificadas e modificadas por UV, incubadas em PBS ao longo do tempo.....	45
Gráfico 8: Capacidade de inchaço das membranas não-modificadas e modificadas por UV, incubadas em H2O ao longo do tempo.....	46
Gráfico 9: Capacidade de inchaço das membranas não-modificadas e modificadas por UV, incubadas em MC ao longo do tempo.	46
Gráfico 10: Representação gráfica dos valores médios dos coágulos formados após 30 minutos de contacto do sangue com as membranas não modificadas e modificadas por UV, bem como do controlo positivo.	51
Gráfico 11: Representação gráfica do índice hemolítico das membranas não modificadas e das modificadas por UV, para os controlos directo e indirecto.	52
Gráfico 12: Resultados obtidos para os ângulos de contacto das membranas modificadas com hexametilenodiamina após 24 e 48 horas.	57
Gráfico 13: Representação gráfica das Energias de Superfície (componentes polar e dispersiva) para as membranas não modificadas e modificadas com hexametilenodiamina.	58
Gráfico 14: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas com hexametilenodiamina, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).	59
Gráfico 15: Espectro de ATR-FTIR obtido para as membranas não-modificadas, para as modificadas com hexametilenodiamina e para a hexametilenodiamina.	60
Gráfico 16: Espectro de ATR-FTIR redimensionado obtido para as membranas não-modificadas, para as modificadas com hexametilenodiamina e para a hexametilenodiamina.	60
Gráfico 17: Capacidade de inchaço das membranas modificadas com hexametilenodiamina, incubadas nos três meios (H2O, PBS e MC).	61
Gráfico 18: Representação gráfica dos valores médios dos coágulos formados após 30 minutos de contacto do sangue com as membranas não modificadas e modificadas por UV, bem como do controlo positivo.	63
Gráfico 19: Representação gráfica do índice hemolítico das membranas não modificadas e das modificadas por UV, para os controlos directo e indirecto.	64

Gráfico 20: Valores dos ângulos de contacto obtidos para a modificação por Plasma com Oxigénio a pressão contante ao longo do tempo.	72
Gráfico 21: Valores dos ângulos de contacto obtidos para a modificação por Plasma com Árgon a pressão contante ao longo do tempo.	73
Gráfico 22: Valores dos ângulos de contacto obtidos para as modificações com os dois gases (Oxigénio e Árgon), para o tempo constante de 3 minutos e pressão variável.....	74
Gráfico 23: Valores dos ângulos de contacto obtidos para as modificações com os dois gases (Oxigénio e Árgon), para pressão constante de 0,6 mbar e tempo variável.	74
Gráfico 24: Ângulo de contacto obtido para os diferentes tempos de enxerto, para os dois monómeros (HEMA e MAA) após a activação por Plasma.	78
Gráfico 25: Energia de superfície representada pelas componentes polar e dispersiva, quer para as membranas não modificadas, quer para as modificadas por Plasma.....	78
Gráfico 26: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas por Plasma e não-modificadas, expostas ao ar.	79
Gráfico 27: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas com Plasma_HEMA, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).....	81
Gráfico 28: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas com Plasma_MAA, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).....	81
Gráfico 29: Capacidade de inchaço das membranas modificadas por Plasma_HEMA, incubadas nos três meios (H2O, PBS e MC).	83
Gráfico 30: Capacidade de inchaço das membranas modificadas por Plasma_MAA, incubadas nos três meios (H2O, PBS e MC).	83
Gráfico 31: Representação gráfica dos valores médios dos coágulos formados após 30 minutos de contacto do sangue com as membranas não modificadas e modificadas por Plasma, bem como do controlo positivo.	85
Gráfico 32: Representação gráfica do índice hemolítico das membranas não modificadas e das modificadas por Plasma, para os controlos directo e indirecto.....	87

Acrónimos

[Hb]	Concentração de hemoglobina
Ar	Árgon
ATR-FTIR	Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada
DMEM-F12	<i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>
DMF	<i>Dimetilformamida</i>
ECM	<i>Matriz extracelular</i>
Hb	Hemoglobina
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo
IV	Infravermelho
K ⁻	Controlo negativo
K ⁺	Controlo positivo
MAA	Ácido metacrílico
MC	Meio de cultura
MBC	<i>Minimal Bactericidal Concentration</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MTS	sal usado para o teste de viabilidade celular
Não_mod	Membranas não modificadas
O ₂	Oxigénio
OWRK	Método de Owens, Wendt, Rabel e Kaelble
PBS	Solução de tampão fosfato
Plasma_HEMA	Modificação por Plasma seguida do enxerto de HEMA
Plasma_MAA	Modificação por Plasma seguida do enxerto de MAA
PU	Poliuretana
PU_modif	Poliuretana modificada
SAM'S	<i>Self Assembled Monolayers</i>
TPU	Poliuretana termoplástica
UV	Radiação ultravioleta
UV_HEMA	Modificação por UV seguida do enxerto de HEMA
UV_MAA	Modificação por UV seguida do enxerto de MAA

Motivação

Uma vez que o coração é um órgão vital do corpo humano, é uma necessidade combater as suas possíveis falhas.

Ao nível das válvulas cardíacas, várias complicações podem surgir, condicionando assim o normal funcionamento do coração, tornando-se emergente substituí-las.

O estudo de válvulas cardíacas artificiais já conta com mais de 50 anos, incluindo válvulas artificiais mecânicas e biológicas. No entanto, a válvula ideal ainda não foi desenvolvida.

Este projecto consiste na preparação de membranas de poliuretano, *Elastollan 1180A50*[®], bem como na sua modificação química/física de forma a torná-las biocompatíveis. A biocompatibilidade é, por definição, a capacidade de um material induzir a resposta adequada, numa situação específica. [1]

Após a modificação das membranas, pretende-se estudar o comportamento destas na presença de culturas celulares, de forma a concluir se este material poderá ser aplicado na área da medicina regenerativa, mais concretamente, no fabrico de válvulas cardíacas artificiais.

Capítulo 1

Fundamentos teóricos

1.1. O coração

O coração é um órgão que integra o sistema cardiovascular e localiza-se na cavidade torácica, entre os pulmões. A principal função deste órgão é enviar sangue para todas as partes do corpo. De tamanho semelhante ao de um punho fechado, bombeia cerca de 5L de sangue por minuto para o caso de uma pessoa saudável, com aproximadamente 70Kg de peso. A quantidade de sangue bombeada pode aumentar em períodos de muito exercício físico. [2] [3]

Quanto à sua constituição, é essencialmente tecido muscular. A parede cardíaca é composta por três camadas de tecido: endocárdio, epicárdio e miocárdio (Figura 1). O endocárdio é a camada mais interna de revestimento do coração, de espessura muito fina, o que permite ao sangue mover-se com facilidade. O epicárdio é a camada mais externa, uma membrana fina, também designada por folheto visceral. Por fim, o miocárdio é a camada intermédia, mais espessa, composta por músculo cardíaco e responsável pelos movimentos contrácteis do coração. [3] [4]

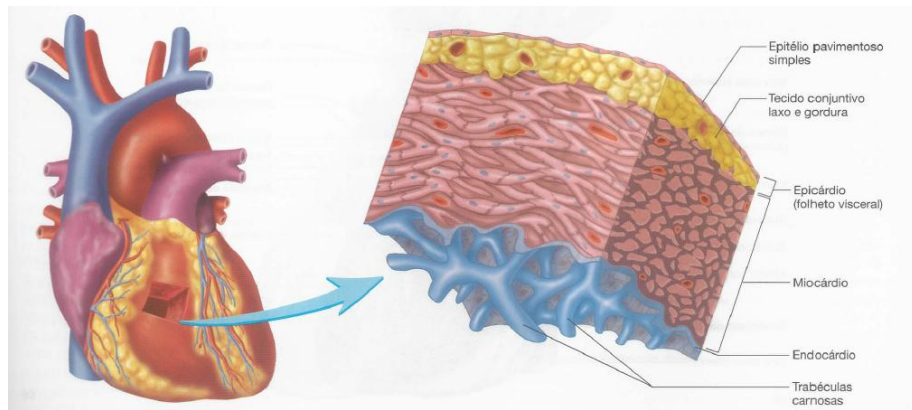


Figura 1: Constituição da parede cardíaca. [3]

O coração pode ser dividido em dois lados (direito e esquerdo) sendo cada um destes dividido em duas cavidades (aurícula e ventrículo) (Figura 2). O lado direito recebe o sangue que provém de todo o corpo, que é pouco oxigenado (“venoso”), por meio das veias cavas superior e inferior. Após a recepção, bombeia este mesmo sangue para os pulmões, para oxigenação. A este percurso dá-se o nome de circulação pulmonar. Por sua vez, o lado esquerdo recebe o sangue oxigenado (“arterial”) vindo dos pulmões pelas veias pulmonares, e bombeia-o para a aorta, de forma a poder ser distribuído por todo o corpo, sendo este percurso do sangue denominado circulação sistêmica. [4]

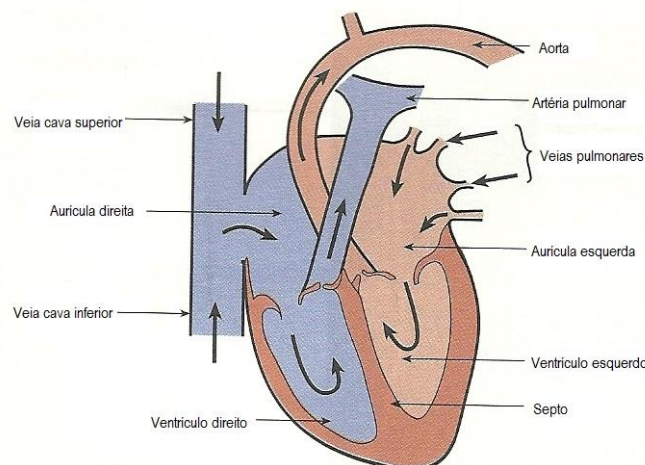


Figura 2: Organização das diferentes cavidades do coração. Direção do fluxo sanguíneo. (Adaptado de [2])

O sangue chegado às aurículas é depois enviado destas para os ventrículos. É importante referir que as paredes dos ventrículos são de espessura superior à das

aurículas, sendo a parede do ventrículo esquerdo ainda mais espessa. Esta diferença das espessuras é justificada pelo facto de os ventrículos terem que contrair com força suficiente para bombear o sangue quer para a circulação pulmonar quer para a circulação sistémica.

Estas cavidades, aurículas e ventrículos, estão separadas pelo septo aurículo-ventricular, constituinte do esqueleto fibroso, onde se localizam as válvulas cardíacas, que serão abordadas no tópico seguinte deste documento. [3]

1.1.1. Válvulas Cardíacas

As quatro válvulas cardíacas, como já foi referido anteriormente, localizam-se no esqueleto fibroso que separa as cavidades do coração (Figura 3). A sua função é garantir um fluxo sanguíneo unidireccional, quer das aurículas para os ventrículos, quer dos ventrículos para as artérias pulmonar e aorta.

As válvulas que separam as aurículas dos ventrículos denominam-se válvulas aurículo-ventriculares. Do lado direito do coração encontra-se a válvula tricúspide, constituída por três cúspides ou folhetos de forma triangular, de tecido conjuntivo fibroso. Por sua vez, do lado esquerdo está a válvula mitral ou bicúspide, constituída apenas por duas cúspides.

A válvula que separa o ventrículo direito da artéria pulmonar, isto é, que evita o refluxo sanguíneo desta artéria para o ventrículo, é a válvula pulmonar. Finalmente, a válvula que evita o refluxo sanguíneo da artéria aorta para o ventrículo esquerdo denomina-se válvula aórtica. A estas duas válvulas pode também chamar-se válvulas semilunares.

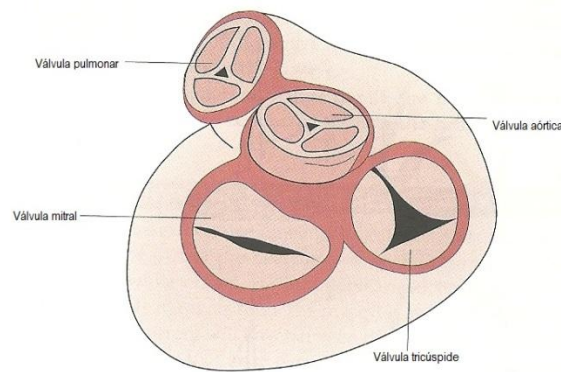


Figura 3: Vista de topo das válvulas cardíacas após remoção das aurículas e das artérias aorta e pulmonar (a vermelho, o esqueleto fibroso). (Adaptado de [2])

Os ventrículos são também constituídos por músculos papilares, que se ligam às cúspides por meio das cordas tendinosas (cordas finas e resistentes de tecido conjuntivo). [3]

A abertura e o fecho destas válvulas durante o ciclo cardíaco (período de contração e relaxamento do coração, que se repete infinitamente) devem-se às diferenças de pressão que existem entre as aurículas e os ventrículos. Inicialmente, uma vez que o sangue chega às aurículas vindo de ambas as circulações, a pressão nestas é superior à pressão nos ventrículos, que se encontram relaxados tal como os músculos papilares, exercendo baixa tensão sobre as cordas tendinosas. As válvulas encontram-se abertas, permitindo ao sangue fluir das aurículas para os ventrículos. Quando a válvula se encontra fechada, os músculos papilares estão contraídos, a tensão nas cordas tendinosas é superior, o ventrículo encontra-se cheio de sangue, e este por sua vez empurra as cúspides para dentro da aurícula ficando sobrepostas.

Em relação às válvulas semilunares, cujas cúspides em forma de bolsa se encontram no centro das artérias para evitar o refluxo sanguíneo, são empurradas pelo sangue presente nos ventrículos, forçando-as a abrir. O refluxo não acontece porque quando o sangue se encontra do lado das artérias aorta ou pulmonar, entra nas bolsas das cúspides, forçando-as a dirigir-se para o centro e assim bloquear a passagem do sangue. [2] [3]

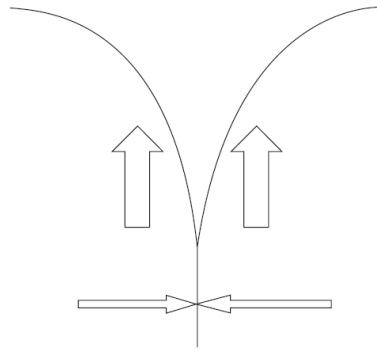


Figura 4: Fecho das válvulas cardíacas com sobreposição dos folhetos. Esquematização do gradiente de pressão a actuar contra a válvula fechada e da força de atrito lateral provocada pela sobreposição dos folhetos. [5]

1.1.2. Doenças valvulares

Por vezes, as pessoas podem apresentar doença valvular, que se manifesta de diversas formas, como por exemplo, falta de ar, tosse, inchaço dos tornozelos devido a insuficiência cardíaca, febre, perda de peso, entre outras. [6]

Devido à sua localização no lado esquerdo do coração, as válvulas mitral e aórtica são as mais afectadas, uma vez que neste lado o volume de sangue que passa pelas cavidades é muito superior. [7] [8]

O estreitamento de uma válvula, estenose, ocorre quando as cúspides ficam rígidas, engrossam, ou se fundem umas com as outras, reduzindo o volume de sangue que consegue passar pela válvula (Figura 5). À medida que o fluxo diminui, o sangue acumula na aurícula, provocando um aumento do esforço do coração para fazer passar pela válvula a mesma quantidade de sangue. [6] [7]

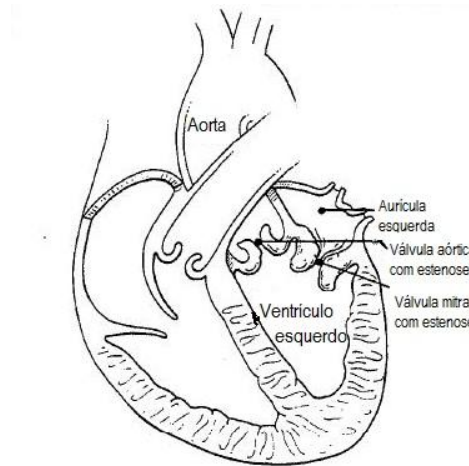


Figura 5: Estenose das válvulas aórtica e mitral, cujo estreitamento as impede de abrir totalmente. [7]

Quando as válvulas não fecham completamente, condição denominada de insuficiência, parte do fluxo sanguíneo reflui, isto é, circula no sentido oposto ao que deveria.

Em alguns casos, a estenose e a insuficiência podem ocorrer ao mesmo tempo. Isto acontece quando as cúspides encolhem e ficam rígidas, impedindo a válvula de fechar totalmente, ficando numa posição fixa. [6] [7]

Nos casos em que a doença é ligeira ou os riscos da cirurgia são muito elevados, os doentes podem ser tratados medicamente mas, na maioria dos casos, a cirurgia é necessária para reparar ou substituir a (s) válvula (s) danificada (s). [6] [5] [9]

1.2. Válvulas artificiais

As válvulas artificiais, usadas como substitutas das válvulas cardíacas, podem dividir-se em dois tipos:

- Mecânicas, feitas de material sintético;
- Biológicas, feitas de tecido humano ou animal.

1.2.1. Válvulas mecânicas

As válvulas mecânicas são feitas de materiais artificiais tais como o titânio, cobalto, carbono, Teflon, Dacron, etc.. [10]

A sua utilização enquanto válvulas cardíacas implica vantagens e desvantagens. A principal vantagem é a durabilidade, sendo por isso bastante implantadas em jovens, uma vez que duram o tempo médio de vida do doente. [11]

A desvantagem do uso destas válvulas é a formação de coágulos devido ao material ser artificial. A forma de evitar a formação destes, é a toma de medicamentos anticoagulantes por parte dos doentes, o que se torna um obstáculo para doentes hemofílicos e mulheres em idade fértil (os anticoagulantes causam defeitos de nascimento no primeiro trimestre do desenvolvimento fetal). [11]

Estas válvulas têm sido desenvolvidas ao longo dos últimos 50 anos, entre as quais: *ball and cage* ou *caged-ball*, *disc and cage* ou *caged-disc*, *tilting disc*, *monoleaflet* e *bileaflet*. [10]

A primeira válvula cardíaca foi substituída em 1952 pelo Dr. Charles Hufnagel, por uma válvula totalmente mecânica de nome *Hufnagel caged-ball*, desencadeando-se assim a era das válvulas cardíacas artificiais. [12] Já a primeira substituição de uma válvula mitral aconteceu em 1960, quando se começou a usar clinicamente a válvula *Starr-Edwards*. [10] O número de designs *caged ball* aumentou subsequentemente, como por exemplo as próteses *Magovern Cromie*, *DeBakey–Surgitool*, *Smeloff–Cutter*, como se pode ver na Figura 6. [12] Estas válvulas *caged-ball* consistem numa pequena bola de silicone (Silastic®) colocada no interior de uma jaula metálica constituída por uma liga de Co-Cr (Stellite®). Os anéis são constituídos por uma borracha de silicone envolvida por uma “malha” de politetrafluoretileno (PTFE-Teflon®) e polipropileno. [13]

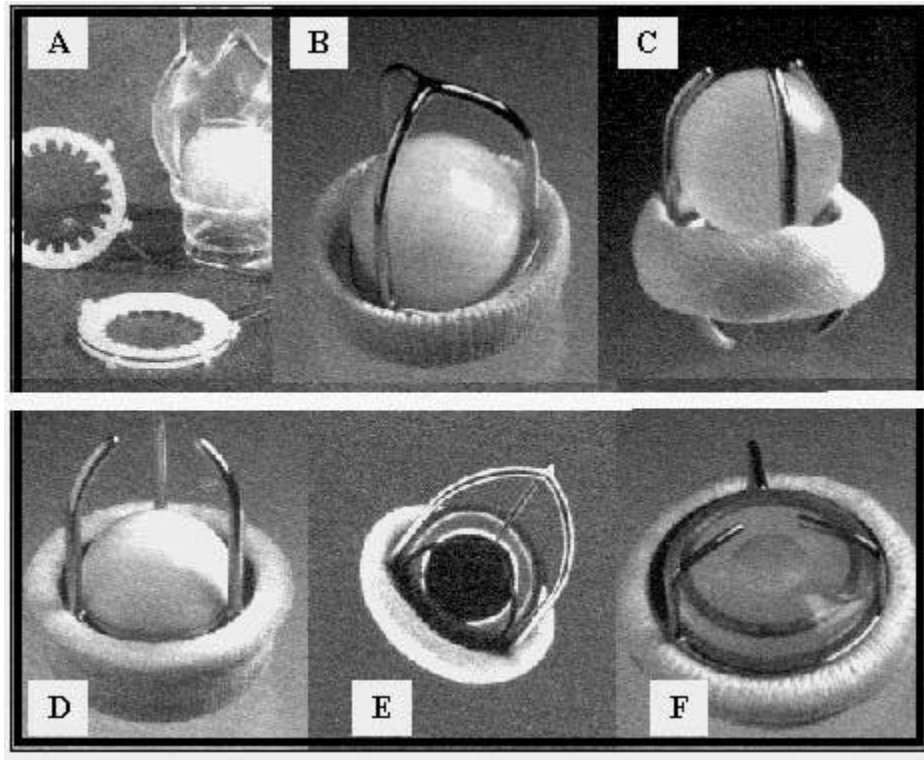


Figura 6: Válvulas caged ball: (a) Hufnagel–Lucite valve, (b) Starr–Edwards, (c) Smeloff–Cutter, (d) McGovern–Cronie, (e) DeBaakey–Surgitool and (f) Cross–Jones. (Adaptado de [12])

Apesar da durabilidade das válvulas *caged-ball* ser reconhecida, o seu design de fecho central provocava uma obstrução que resultava num aumento da pressão ao longo da válvula provocando um maior stress mecânico nesta. A existência da possibilidade de interferência com as estruturas anatómicas após a implantação da válvula levou ao desenvolvimento de válvulas *low-profile caged-disc*, em meados da década de 60, cuja única diferença para as *caged-ball* foi a substituição da bola central por um disco achatado. No entanto, também estas válvulas estão associadas aos problemas hemodinâmicos, uma vez que provocam obstrução central, à semelhança das *caged-ball*. [10] [12]

Assim surgiu a necessidade de desenvolver uma válvula cujo disco central causasse uma menor obstrução ao fluxo sanguíneo, sendo por isso um disco inclinado. Estas válvulas denominam-se *tilting disc*, sendo a primeira da autoria de Bjork-Shiley em 1967. [10] O design destas válvulas é composto por um disco e uma estrutura mecânica retentora (anel). O disco encerra totalmente o orifício da válvula na posição fechada e inclina-se para um determinado ângulo na posição aberta. Este pode rodar

durante a função normal, para prevenir o desgaste provocado pelas componentes da estrutura retentora numa particular região do disco. [14]

Inicialmente, este modelo consistia num disco de Delrin® e um anel de Teflon®. Apesar das boas propriedades mecânicas exibidas pelas resinas de Delrin®, verificou-se que estas incham quando expostas a ambientes mais húmidos, tal como quando em contacto com o sangue. Assim, este disco foi substituído por outro de carbono pirolítico, que exibe melhor compatibilidade sanguínea. [13]

Por último, foi desenvolvida a válvula *bileaflet*, constituída por dois folhetos semicirculares, presos ao interior do anel por dobradiças. Apesar destas válvulas diminuírem a obstrução sanguínea, permitindo um melhor fluxo do sangue comparativamente às válvulas anteriores, também elas não estão livres de causar problemas à saúde do doente, tais como o tromboembolismo. [10]

A primeira válvula *bileaflet* introduzida no mercado surgiu por meio de St. Jude Medical Inc., em 1978. No caso desta, os folhetos semicirculares são constituídos por carbono pirolítico. [10] [12]

Durante os últimos cinquenta anos, vários designs de válvulas foram desenvolvidos em laboratório. Poucos conseguiram ir além das extensivas fases de avaliação e atingiram o uso clínico. Desses escassos sucessos apenas três variantes são usadas clinicamente: *caged-ball*, *tilting disc* e *bileaflet*. [12]

1.2.2. Válvulas biológicas

As válvulas biológicas, ou bioprostéticas, são, como foi já referido, constituídas por tecido biológico (humano ou animal). [13]

Quando se refere a tecido humano, podem ser designadas por aloenxertos, no caso de serem transplantadas de outro ser humano. Designam-se por autoenxertos, quando o transplante ocorre de uma posição para outra, na mesma pessoa. [10]

As válvulas de tecido animal, são normalmente de origem porcina ou bovina e denominam-se xenoenxertos. [15]

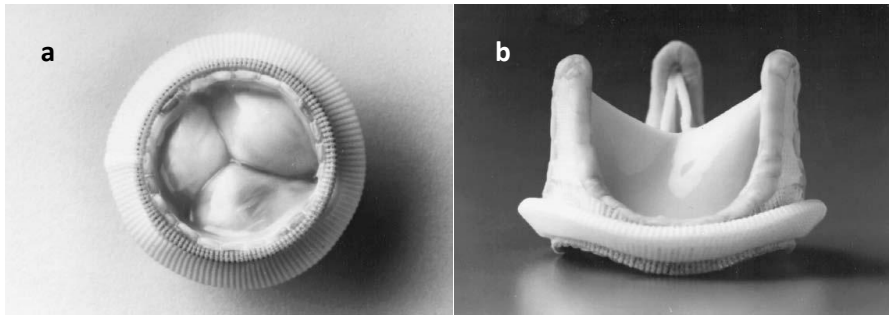


Figura 7: Válvulas biológicas comuns: (a) Hancock- válvula de tecido porcino (cortesia de Medtronic Heart Valves, Minneapolis,MN); (b) PhotoFix™ α pericárdio (cortesia de Sulzer-CarboMedics, Inc., Austin, TX.). (Adaptado de [13])

Este cruzamento de espécies pode levar à rejeição da válvula por parte do sistema imunitário do doente. Por este motivo, estas membranas são tratadas com glutaraldeído, de forma a matar os restos de células residentes e assim esterilizar o tecido para implantação. [10] [15]

À semelhança das válvulas mecânicas, também estas têm as suas vantagens e desvantagens. A principal vantagem é que os doentes não necessitam de tomar anti-coagulantes, uma vez que não ocorre formação de trombos. Quanto a desvantagens, as principais são a duração da válvula, limitada a aproximadamente 10-15 anos, e a calcificação. [10] [13]

As primeiras substituições por válvulas biológicas foram aloenxertos, com as válvulas provenientes de cadáveres. Devido à baixa durabilidade destas válvulas, os estudos progrediram e por volta de 1960 começaram a ser transplantados os primeiros xenoenxertos. Este procedimento foi levado a cabo por Carpentier que descobriu a diminuição da biodegradação das válvulas usando glutaraldeído.

Em 1969, Kaiser et al. descreveram uma válvula substituta que consiste numa válvula aórtica porcina tratada com glutaraldeído, sobre uma estrutura de suporte metálica. A rígida estrutura foi depois substituída por uma mais flexível e a resultante válvula tornou-se comercialmente disponível como válvula de porco xenográfica de Hancock, em 1970. [8] [14]

Uma outra válvula que surgiu é a Carpentier-Edwards Bioprosthesis, introduzida comercialmente por Edwards Laboratories em 1976, que usa válvulas de tecido de porco, montadas numa estrutura de suporte totalmente flexível.

Como alternativa a estas válvulas, todas porcinas, surgiram válvulas baseadas no pericárdio de um bezerro, desenvolvidas por Ionescu et al.,. A válvula original, xenoenxerto do pericárdio, de Ionescu-Shiley, começou a ser comercializada em 1976, mas a comercialização foi interrompida em meados de 1980 devido as falhas relacionadas com a durabilidade e a calcificação.

A válvula Carpentier – Edwards pericardial foi introduzida a uso clínico em 1981 e aprovada para uso comercial nos Estados Unidos em 1991. Esta fornece uma performance hemodinâmica superior com uma maior durabilidade do que as anteriores válvulas pericárdicas.

Mais tarde surgiram as válvulas *stentless*, isto é, sem estruturas de suporte, com o intuito de diminuir a obstrução do fluxo sanguíneo que ocorria nas junções *stent-folheto*. Alguns exemplos destas válvulas, ainda existentes no mercado, são: St. Jude Medical Toronto SPV, Medtronic Freestyle e Edwards Prima. [8] [13]

Resumidamente na Tabela 1, encontram-se os principais materiais usados no fabrico das válvulas cardíacas artificiais.

1.2.3. Válvulas Poliméricas

Em relação às válvulas cardíacas totalmente sintéticas, poliméricas, vários materiais foram estudados, entre os quais silicone e borrachas de poliolefinina, que foram eliminados dada a durabilidade inadequada. Além destes, também foram estudados o PTFE e o Teflon®, que revelaram alto risco de calcificação e trombose. [16]

As poliuretanas têm vindo a ser estudadas desde 1950, tornando-se um dos materiais sintéticos mais populares devido às suas propriedades, entre as quais a sua hemocompatibilidade e as suas propriedades mecânicas. Apresentam uma estrutura constituída por duas fases em que uma é fortemente cristalina e a outra contém segmentos de elastómero. [17]

Mais recentemente, outros materiais foram estudados, tais como o poli(álcool vinílico), “Quatromer™” que é uma poliolefina e por último, um nanocompósito baseado em nanopartículas de silsesquioxano oligomérico poliédrico e poli(carbonato ureia)uretana. [16] [17]

Tabela 1: Principais materiais usados no fabrico de válvulas cardíacas. (Adaptado de [13])

Tipo	Componente	Biomaterial
<i>Caged ball</i>	Bola	Silastic.
	Jaula metálica	Stellite 21 [®] /Titanium.
	Anel	Borracha de silicone envolvida numa “malha” de Teflon [®] .
<i>Tilting disc</i>	Folheto	Delrin [®] ; carbono pirolítico; UHMPE (<i>ultra high molecular polyethylene</i>).
	Estrutura	Haynes 25 [®] /Titanium.
	Anel	Teflon [®] /Dacron [®] .
<i>Bileaflet</i>	Folheto	Carbono pirolítico.
	Estrutura	Carbono pirolítico.
	Anel	Tecido formado por Dacron [®] e poliéster.
Porcinas	Folhetos	Válvula aórtica de porco estabilizada com glutaraldeído.
	Estrutura	Estrutura de polietileno revestida com Dacron [®] ; fio Elgiloy revestido por uma camada porosa de Teflon [®] .
	Anel	Dacron [®] ; borracha de silicone suave revestida com Teflon [®] .
Pericárdio	Folheto	Tecido pericardial de porco estabilizado com glutaraldeído.
	Estrutura	Estrutura de polietileno revestida com Dacron [®] ; fio Elgiloy e suporte de Nylon revestido por poliéster e Teflon [®] .
	Anel	Borracha de silicone coberta com PTFE.

1.2.4. Características ideais

Para que uma válvula artificial possa corresponder às necessidades, existem algumas características às quais deve obedecer. São estas propriedades que se procuram desenvolver com o estudo de novos materiais. É importante que a válvula imite as características funcionais do coração humano.

Idealmente, uma válvula polimérica deve combinar a durabilidade de uma válvula mecânica com a hemocompatibilidade de uma válvula biológica, isto é, deve permitir baixos níveis de hemólise (destruição dos glóbulos vermelhos), baixos níveis de trombose, e tempo de vida de longa duração (entre 20-30 anos). [5] [17]

Em relação ao seu funcionamento, a válvula deve abrir com a mínima pressão transvalvular e o sangue deve fluir sem distúrbios. Quanto ao fecho, deve ser eficiente para que não ocorra regurgitação. [8] [18]

Finalmente, deve evitar a calcificação, que consiste na acumulação de minerais de fosfato de cálcio ou outros cristais de cálcio à superfície. [19]

No que diz respeito à escolha do material, este deve ser biocompatível, de longa-duração, não-tóxico, não trombogénico, resistente à degradação e deve ter afinidade com as células endoteliais. A integridade estrutural da válvula deverá manter-se durante todo o tempo de vida do implante. Para evitar a formação de trombos, a superfície do material não deverá ser rugosa. [8] [17]

1.3. Poliuretanas

As poliuretanas, tal como as poliureias, derivam dos ácidos carbónicos. Podem ser definidas por um termo antigo, *polycarbomate*, proveniente do ácido carbónico (RNHCO_2H).

As poliuretanas podem ser usadas numa grande variedade de produtos, incluindo fibras, elastómeros, espumas, revestimentos e adesivos. [20]

Devido às suas propriedades físicas, químicas e de degradação, as poliuretanas são um material com potencial para aplicar em biomateriais, uma vez que não induzem inflamação nos tecidos e, nalguns casos, não se degradam com os fluidos corporais. É

um material com elevada compatibilidade sanguínea, não-trombogénico e resistente à degradação. [21] [22]

Quimicamente são caracterizadas pela presença de um grupo uretana (Figura 8), que se repete várias vezes, mas não necessariamente de forma regular. Para além deste grupo, existem outros que podem fazer parte da molécula de poliuretana, tais como: éster, éter, alofanato, ureia, amida, etc.. A capacidade das poliuretanas incorporarem diferentes grupos funcionais, além das uretanas, é que contribui para a variedade de características que o material apresenta. [23] [24]

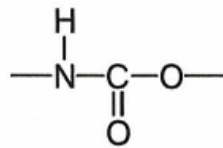


Figura 8: Estrutura do grupo uretana. [24]

Como já foi referido anteriormente, a sua estrutura pode variar entre segmentos fortemente cristalinos ou segmentos de elastómero. Os primeiros originam polímeros termofixos (não podem ser moldados por aquecimento, sem sofrerem degradação), enquanto os segundos originam polímeros termoplásticos, com a capacidade de se moldarem com a temperatura. [17] [24]

1.3.1. Reacção de polimerização

Existem dois métodos principais de formação das poliuretanas: a reacção do biscloroformato (derivado de compostos di-hidróxidos com excesso de fosgénio) com diamina, e a reacção dos di-isocianatos com os compostos di-hidróxidos, como por exemplo os polióis poliéteres ou os polióis poliésteres, com a vantagem de não produzirem produtos derivados, sendo assim mais importante para a vertente industrial. [20] [23] [24]

Apesar dos principais componentes serem di-isocianatos e polióis, são também necessários outros componentes, tais como os extensores de cadeia (dióis ou diaminas), para que se forme uma cadeia de poliuretana. [25]

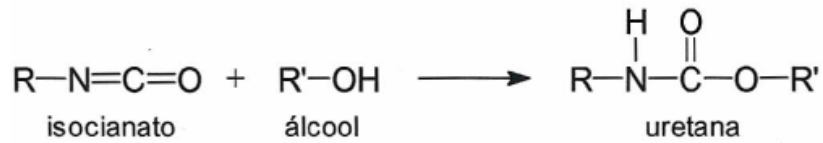


Figura 9: Reacção de síntese de uma uretana. [24]

1.3.2. *Elastollan 1180A50*[®]

Este trabalho foi realizado com *Elastollan 1180A50*[®], uma poliuretana termoplástica comercial pré-processada e de base poliéter (TPU). [26]

Os elastómeros são classificados de termoplásticos, quando são compostos por cadeias moleculares lineares e independentes, e são geralmente processados por aquecimento. As poliuretanas termoplásticas são resistentes e apresentam boa compatibilidade com o sangue. Além disso, combinam propriedades como força, dureza e módulo elevados com elevado alongamento até à ruptura. São estas as propriedades que justificam o uso destas poliuretanas na área das tecnologias médicas. As poliuretanas de base poliéter são mais estáveis, sendo por isso mais usadas como biomateriais. [25]

A flexibilidade mecânica, a resistência à abrasão, transparência, estabilidade hidrolítica e a actividade antifúngica motivaram a escolha do *Elastollan 1180A50*[®], da BASF. [26]

Este material é essencialmente formado pela interacção de três componentes: polióis (dióis de cadeia longa), di-isocianatos e dióis de cadeia curta. As poliuretanas lineares são formadas pela reacção dos polióis e dos dióis de cadeia curta com os di-isocianatos. A combinação entre os di-isocianatos e os dióis de cadeia curta dá origem aos segmentos rígidos da cadeia, enquanto a sua combinação com os polióis dá origem aos segmentos flexíveis. Por se tratar de um poliól poliéter, apresenta melhor resistência à hidrólise, melhor flexibilidade a baixas temperaturas e resistência à degradação microbológica. [25]

1.4. Modificação de superfícies

As propriedades de massa, bem como as propriedades de superfície de um biomaterial controlam a dinâmica interfacial entre o tecido e o material implantado.

Os materiais sintéticos têm propriedades de massa e superfície características, que devem ser reconhecidas antes da sua aplicação médica. Apesar da escolha do material geralmente ter em conta as propriedades de massa, as características da superfície têm sido cada vez mais tidas em consideração ultimamente, uma vez que determinam o sucesso ou o fracasso do implante. [27] [28]

Considerando a interacção entre os biomateriais e as outras substâncias, existe, hoje em dia, uma crescente necessidade de métodos eficientes de modificação de superfícies para aplicações biomédicas. Uma modificação de superfície caracteriza-se pela alteração das características da superfície de um material para uma aplicação específica sem afectar prejudicialmente as propriedades de massa.

Estas modificações podem ser usadas afectando uma vasta gama de propriedades: hidrofiliabilidade, permeabilidade, bioestabilidade, inércia química, adesão, biocompatibilidade, topografia, características eléctricas, ópticas e de fricção. [27]

A biocompatibilidade (termo usado para descrever as interacções entre um material sintético e um organismo vivo) destes materiais pode ser melhorada através de alterações da molhabilidade, incorporação de grupos funcionais ou revestimento dos materiais com substâncias biocompatíveis, como por exemplo proteínas. [29]

As superfícies podem ser modificadas por métodos biológicos ou físico-químicos. Os métodos biológicos são, por exemplo, a ligação à superfície de biomoléculas tais como proteínas. No entanto, dada a natureza deste trabalho experimental, apenas serão aprofundados os métodos físico-químicos, representados na Figura 10.

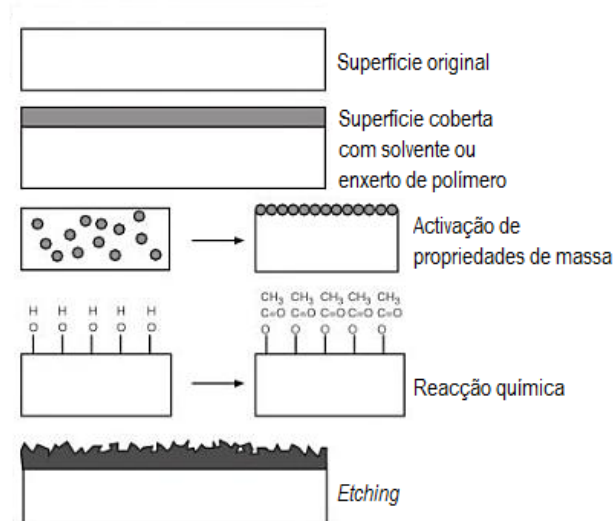


Figura 10: Esquema de métodos físico-químicos de modificação de superfícies. (Adaptado de [27])

Geralmente, a modificação de superfícies insere-se em uma das seguintes categorias:

- 1) Modificação da superfície por *etching* ou modificação química;
- 2) Revestir a superfície com um material de composição diferente, como, por exemplo, modificação por Plasma ou enxerto de polímeros.

Neste trabalho experimental foram usadas técnicas de modificação por radiação UV, por Plasma e por ligação de grupos amina (NH_2), o que se traduz em dois métodos de modificação físicos e um químico, respectivamente. As explicações teóricas sobre cada uma destas técnicas serão apresentadas nos capítulos 3, 4 e 5.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

Neste capítulo será apresentada a estratégia experimental do trabalho de uma forma resumida, uma vez que cada um dos métodos usados será explicado detalhadamente nos capítulos subsequentes.

Seguidamente apresentam-se os reagentes usados no decorrer do trabalho experimental, bem como o método de preparação das membranas de *Elastollan 1180A50*[®].

Finalmente, serão também abordadas neste capítulo as técnicas de caracterização das amostras modificadas.

2.1. Estratégia experimental

Como já foi referido, o objectivo deste trabalho é a aplicação da referida poliuretana termoplástica como válvulas cardíacas. Para tal, este material tem que ser biocompatível, isto é, não-hemolítico, não-trombogénico, antibacteriano e não pode

induzir morte celular. Portanto, diferentes estratégias foram adoptadas para atingir estes objectivos. Na figura 11, encontra-se um resumo das estratégias usadas.

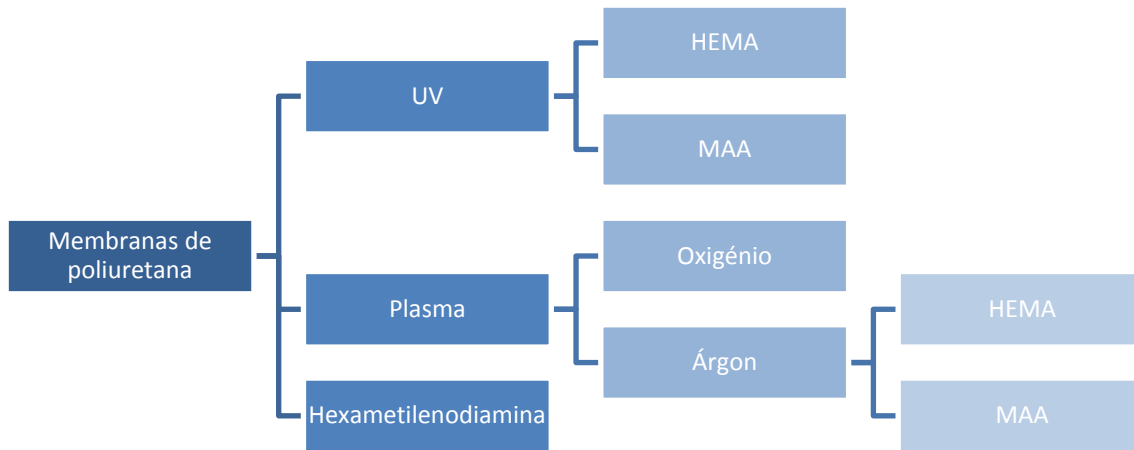


Figura 11: Esquema da estratégia experimental adoptada para este trabalho.

A primeira estratégia abordada foi a modificação superficial da membrana usando radiação ultravioleta (UV), para enxertar os monómeros metacrilato de 2-hidroxiétilo (HEMA) e ácido metacrílico (MAA) com grupos funcionais específicos por forma a alterar as propriedades do material.

De modo a abordar outras técnicas de modificação superficial, as membranas foram modificadas por Plasma, usando diferentes gases (Oxigénio e Árgon). Esta técnica permitiu a activação do material, criação de radicais ou grupos reactivos, que facilitam o enxerto de monómeros (HEMA e MAA).

Foram ainda ligados grupos amina na superfície do material, através da reacção com hexametilendiamina.

2.2. Reagentes

No decorrer deste trabalho foram utilizados diferentes reagentes, provenientes de diversos fornecedores. Na tabela abaixo (Tabela 2) são apresentados os reagentes utilizados na síntese e caracterização das membranas ao longo do trabalho experimental.

Tabela 2: Reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental.

Reagente	Pureza/ Massa Molecular/ Densidade	Fabricante
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 5-(3carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulphofenyl)-2H- tetrazolium Ácido	-	Sigma-Aldrich
etilenodiaminotetracético (EDTA)	-	Sigma-Aldrich
Ácido metacrílico (MAA)	99,5%, extra puro	Acros Organics
Água Milli-Q	-	-
Anfotericina B	-	Sigma-Aldrich
Bactérias <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5α	-	ATCC
Cianeto de potássio (KCN)	-	Panreac
Cloreto de cálcio (CaCl₂)	M= 147,02g/mol	Riedel-de Haën
Cloreto de potássio (KCl)	99%	Merck
Cloreto de sódio (NaCl)	99%	Sigma-Aldrich
Di-hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄)	99,5%	M&B Laboratory Chemicals
Diiodometano (CH₂I₂)	99%	Aldrich
Dimetilformamida (DMF)	-	Fisher Chemical
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM-F12)	-	Sigma-Aldrich
<i>Elastollan 1180A50</i> ®	-	BASF
Estreptomina	-	Sigma-Aldrich
Etilenoglicol	99,8%	Aldrich
Ferrocianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆)	-	Riedel-de Haën
Fibroblastos humanos	-	PromoCell
Formaldeído	36,5%	Sigma-Aldrich
Formamida	99+%	Sigma-Aldrich
Hexametilenodiamina	98%	Aldrich

Hidrogenofosfato de sódio di-hidratado	99,5%	Riedel-de Haën
Irgacure® 2959	-	Ciba Specialty Chemicals Inc.
Isopropanol	-	José Vaz Pereira, S.A.
LB agar	-	Pronadise
LB Broth	-	Sigma-Aldrich
L-glutamina	-	Sigma-Aldrich
Metacrilato de 2-hidoxietilo (HEMA)	96%	Acros Organics
MTS (sal)	-	Sigma-Aldrich
Penicilina G	-	Sigma-Aldrich
Propanol	-	Eastman Chemicals
Resazurina (sal)	-	Sigma-Aldrich
Sangue	-	Probiológica
Solução de tampão fosfato (PBS)	-	Sigma-Aldrich
Soro bovino fetal (FBS)	-	Biochrom
Tripsina	-	Sigma-Aldrich
Triton X-100	-	Sigma-Aldrich

2.3. Preparação das membranas

As membranas foram preparadas por evaporação de solvente. Os *pellets* de *Elastollan 1180A50*® foram dissolvidos numa solução de DMF a 10% (m/v). De seguida, a solução foi colocada em caixas de Petri, numa estufa a 60°C durante 24h. Finalmente, as membranas obtidas foram retiradas das caixas de Petri e lavadas com isopropanol, durante aproximadamente 10 minutos.

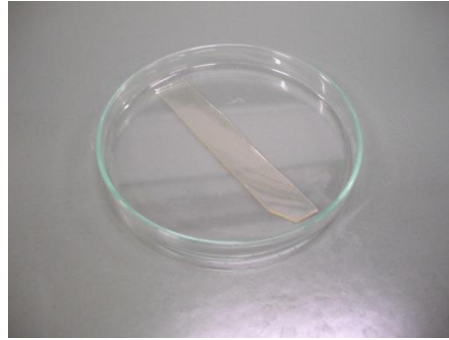


Figura 12: Membranas de *Elastollan 1180A50*®.

2.4. Técnicas de caracterização

2.4.1. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície

As superfícies que têm afinidade com a água são consideradas hidrofílicas enquanto as que a repelem são denominadas de hidrofóbicas. O grau de hidrofilicidade ou hidrofobicidade pode ser determinado pela medida dos ângulos de contacto. [30]

O ângulo de contacto é uma medida da capacidade que um líquido tem de se espalhar numa superfície. Para determinar o valor do ângulo de contacto, uma gota de um líquido é colocada sobre a superfície de uma amostra horizontal, formando-se um ângulo, θ , na interacção entre o líquido e o sólido (Figura 13). A interacção entre ambos pode ser caracterizada pelo ângulo de contacto estático se a gota não penetrar no substrato, ou seja, se a superfície for suave e homogénea. Este ângulo corresponde ao ângulo formado entre a linha de base e a linha tangente ao contorno da gota no ponto de ligação das três fases. [31] [32]

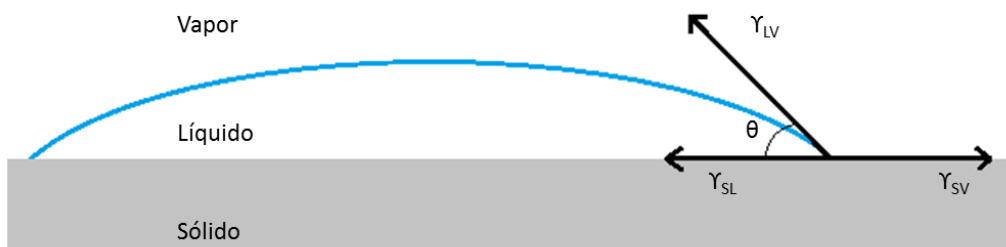


Figura 13: Representação do ângulo de contacto e das tensões interfaciais. (Adaptado de [31])

Dependendo do valor de θ , o material pode ser classificado de diferentes formas, isto é:

- Se $\Theta=0$, o líquido molha totalmente o sólido, espalhando-se sobre a superfície;
- Se $\Theta<90^\circ$, o líquido espalha-se sobre o sólido numa área limitada;
- Se $\Theta>90^\circ$, o líquido não molha a superfície.

Segundo Young, o ângulo de contacto de um líquido resulta de um equilíbrio de forças entre uma gota em repouso num sólido sob a acção de diferentes forças, representadas também na Figura 13. [31]

Do equilíbrio dessas forças surge a Equação 1:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (1)$$

onde γ_{SV} representa a tensão superficial entre o sólido e o vapor, γ_{SL} representa a tensão interfacial entre a gota e o sólido e γ_{LV} a tensão superficial entre a gota e o vapor. [31] [33]

As energias de superfície dos sólidos podem ser determinadas por medição de ângulos de contacto entre a superfície e líquidos, com tensões superficiais conhecidas. Neste trabalho experimental os líquidos usados foram a água, a formamida, o etilenoglicol e o diiodometano.

Existem diferentes métodos para determinar a energia de superfície do material, dependendo das suas características. Neste trabalho foi usado o método de Owens, Wendt, Rabel e Kaelble (OWRK).

Owens, Wendt, Rabel e Kaelble fizeram a distinção entre interacções dispersivas e interacções polares. A componente polar engloba interacções de Coulomb entre dipolos permanentes e entre dipolos permanentes e induzidos. A interacção devida ao tempo das flutuações da distribuição de carga dentro das moléculas é chamada interacção dispersiva. [34]

A energia de superfície (γ_{SV}) é estabelecida pela soma das contribuições de ambas as componentes, representadas nas equações abaixo (Equação 2).

$$\gamma_{SV} = \gamma_S^D + \gamma_S^P \quad \gamma_{LV} = \gamma_L^D + \gamma_L^P \quad (2)$$

Nestas equações, γ_S^D e γ_L^D representam as componentes dispersivas do sólido e do líquido, respectivamente. Por outro lado, γ_S^P e γ_L^P representam as componentes polares do sólido e do líquido, respectivamente.

A energia interfacial pode ser calculada de acordo com Owens, Wendt, Rabel e Kaelble através das contribuições do líquido e do sólido fazendo a média geométrica. Obtém-se então a Equação 3:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - 2 \left(\sqrt{\gamma_S^D \gamma_L^D} + \sqrt{\gamma_S^P \gamma_L^P} \right) \quad (3)$$

Substituindo γ_{SL} na Equação 1, obtém-se então a Equação 4.

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - 2 \left(\sqrt{\gamma_S^D \gamma_L^D} + \sqrt{\gamma_S^P \gamma_L^P} \right) + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (4)$$

Esta equação pode ser escrita na forma da equação de uma linha recta:

$$y = ax + b \quad (5)$$

onde
$$y = \frac{(1 + \cos \theta)}{2} \frac{\gamma_{LV}}{\sqrt{\gamma_{LV}^D}}; a = \sqrt{\gamma_{SV}^P}; x = \sqrt{\frac{\gamma_{LV}^P}{\gamma_{LV}^D}} \text{ e } b = \sqrt{\gamma_{SV}^D}.$$

Portanto, fazendo um gráfico de y em função de x , calcula-se γ_{SV}^P a partir do declive da recta obtida e γ_{SV}^D a partir da intersecção da recta com o eixo dos yy . Para obter estes resultados, têm que ser calculados os ângulos de contacto com pelo menos dois líquidos distintos. [35]

2.4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica que permite identificar a estrutura dos polímeros. Os grupos funcionais apresentam frequências de vibração específicas, portanto apresentam espectros característicos, o que permite caracterizar

moléculas a partir desta técnica. As moléculas expostas à radiação IV apenas absorvem a energia nas suas frequências características. [36] [37]

O espectrómetro FTIR é constituído por uma fonte de radiação, um interferómetro, um compartimento de amostra e um detector de IV. [28]

O espectro de infravermelho (interferograma) é obtido depois de um feixe passar num interferómetro incorporado, e depois pela amostra até chegar ao detector. O sinal obtido (no domínio do tempo) é depois tratado pela Transformada de Fourier, que é uma operação matemática, de forma a obter um espectro no domínio da frequência. Este espectro é uma representação da intensidade em função do comprimento de onda (cm^{-1}). [36] [38]

A técnica de FTIR pode ser complementada com o ATR (*Attenuated Total Reflectance*), usado para obter espectros IV de boa qualidade de polímeros em forma de filme, folha plana, líquido ou em solução. Este acessório permite medir as mudanças que ocorrem no total da energia interna que é reflectida, quando o feixe IV entra em contacto com a amostra.

O modo de funcionamento consiste num feixe de IV incidente num cristal com um determinado ângulo de incidência. O facto de o cristal ter, obrigatoriamente, alto índice de refração, permite que o feixe se propague ao longo do cristal, até à extremidade oposta. O feixe IV a certa altura atinge a superfície da amostra, penetrando a uma pequena profundidade. A amostra pode absorver alguma da energia do feixe e portanto, o feixe IV que a atingiu sofre atenuação, formando uma onda evanescente, que se propaga então até à extremidade oposta. (Figura 14). [28] [39]

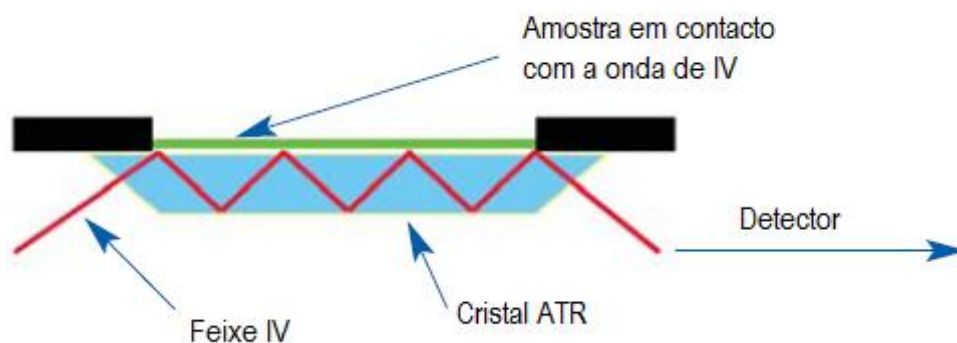


Figura 14: Funcionamento do ATR. (Adaptado de [39])

2.4.3. Capacidade de inchaço (*Swelling*)

O *swelling* é, por definição, o aumento do volume de um material, causado pela absorção de água/humidade.

Os materiais, quando em contacto com sistemas biológicos, ficam sujeitos a aumento de volume dada a interface que criam com o meio. [40]

Assim, é possível avaliar a capacidade de inchaço do material através da Equação 6:

$$\text{Capacidade de inchaço} = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100 (\%) \quad (6)$$

na qual W_h corresponde ao peso da membrana depois de imersa na solução e W_s corresponde ao seu peso seco.

Para avaliar a capacidade de inchaço das membranas, foram colocados pedaços destas correspondentes aos vários ensaios na estufa de vácuo a 37°C até atingirem peso constante. Após a medição do peso seco, esses pedaços de membranas foram incubados em PBS, água destilada (H₂O) e meio de cultura (MC). O meio de cultura usado foi o DMEM-F12, constituído por uma mistura de nutrientes, incluindo sais e proteínas. Os tempos de incubação avaliados foram 1, 4, 6, 24, 48 e 168 horas, ao fim dos quais as membranas foram pesadas.

2.4.4. Cultura de células

Nos tecidos vivos, a adesão de células à matriz extracelular (ECM) é feita por meio dos receptores existentes na superfície das células que se ligam às proteínas de adesão da ECM tais como fibronectina, vitronectina, laminina e colagénio. Além da sua função de suporte, a ECM ajusta os comportamentos celulares, uma vez que fornece diferentes tipos de factores de crescimento. [41]

Nos ensaios *in vitro* com biomateriais, o mecanismo de funcionamento é o mesmo. Quando um material é posto em contacto com fluidos corporais ou meios de cultura de células, o que acontece primeiramente é a adsorção de proteínas, seguida da interacção com as células através da camada proteica formada. A composição e

estrutura desta camada proteica são fundamentais para o comportamento celular, determinando o sucesso ou a falha de um implante. [41]

As propriedades da superfície tais como a energia de superfície, química da superfície, hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade e a sua topografia podem comprometer a biocompatibilidade de um material, uma vez que têm influência no comportamento das células, tendo por isso que ser consideradas aquando da escolha deste para uma aplicação biomédica. [42] [43]

Vários estudos já foram efectuados de forma a investigar a relação entre a hidrofiliabilidade do material e a adesão e proliferação celulares. [42]

É sabido que a adesão celular aumenta quando se diminui o ângulo de contacto para valores perto de 70°. Assim, é nas superfícies com ângulo de contacto moderado que ocorre a maior adesão celular. [44]

Muitos dos materiais poliméricos têm baixas energias de superfície e são hidrofóbicos em vez de hidrofílicos, sendo portanto mais difícil a sua interacção com grupos polares. Quando usados como biomateriais, os polímeros hidrofóbicos, além da adsorção de proteínas, permitem a deposição e proliferação de microorganismos (ex: bactérias) na superfície. A deposição de todas estas partículas na superfície é geralmente designada por *biofouling*. O *biofouling* pode ser minimizado através de lavagens periódicas das membranas com químicos como a solução de hipoclorito de sódio, o que no entanto pode provocar a degradação da membrana. [44] [45]

As bactérias movem-se até à superfície do material por efeito de forças físicas (atração, gravitacionais, entre outras) bem como por efeitos das cargas electrostáticas da superfície e interacções hidrofóbicas. [46]

À semelhança da adsorção de proteínas, a adesão bacteriana é mais rápida e favorável em superfícies não-polares e hidrofóbicas. Assim, verifica-se uma relação entre o aumento da hidrofiliabilidade e o aumento da resistência ao *biofouling*, uma vez que muitos dos contaminantes são hidrofóbicos na natureza. [45]

Em relação à topografia da superfície, já foram efectuados estudos que revelam uma maior adesão bacteriana no caso das superfícies mais rugosas devido à existência de uma maior área de colonização. [46]

Neste trabalho experimental foram realizados testes de adesão e proliferação celulares bem como de actividade antibacteriana das diversas amostras.

2.4.4.1. Proliferação de fibroblastos humanos na presença dos materiais

As células (fibroblastos), foram cultivadas em T-flasks de 25cm² com 6mL de DMEM-F12, suplementado com soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor (10% v/v) e 1% de uma solução de antibiótico/antimicótico.

Depois das células estarem confluentes foram subcultivadas através de uma incubação durante 3-5 minutos num meio de 0,18% tripsina (1:250) e 5mM EDTA. Subsequentemente as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura e depois cultivadas em T-flasks de 75 cm².

De seguida, as células foram mantidas em cultura a 37°C numa atmosfera húmida com 5% CO₂, dentro de uma incubadora.

De forma a avaliar o comportamento das células na presença das amostras, os fibroblastos foram cultivados em placas de 96 poços, com uma densidade de 10x10³ células por poço, durante 96 horas.

As amostras foram esterilizadas por radiação UV durante 30 minutos, antes de serem colocadas em contacto com as células. [47] [48]

2.4.4.2. Caracterização do perfil citotóxico das amostras

As células foram cultivadas na presença das amostras, numa placa de 96 poços, com 100 µL de DMEM-F12 seguidas de uma incubação a 37°C numa atmosfera húmida com 5% CO₂. Depois do período de incubação (24, 48, 72 e 96 horas) a viabilidade celular foi avaliada através da redução do MTS a formazano solúvel em água. Resumidamente, o meio de cada poço foi removido e substituído por uma mistura de 100 µL de meio de cultura novo e 20 µL de solução MTS/PMS. De seguida as células foram incubadas durante 4 horas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% CO₂. A absorvância foi medida a 492 nm com um leitor de micro-placas. Como controlo negativo (K-) foram usados poços com células mas sem amostras e como controlo positivo (K+) foram usados poços com células aos quais foi adicionado EtOH (96%). [49] [50] [51]

2.4.4.3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

A actividade antimicrobiana dos materiais foi examinada usando a *E. coli* como modelo de bactérias Gram-negativas, numa placa de 96 poços. Inicialmente foram colocadas concentrações conhecidas das amostras na placa de cultura. Depois, foram inoculados com a bactéria teste, numa concentração de 5×10^5 unidade formadora de colónias (CFU)/mL, 100 μ L de LB Broth e 100 μ L de meio de cultura. Como controlo negativo (K-) foi usada apenas a bactéria e como controlo positivo (K+) foi usado apenas o meio. A placa foi incubada durante 24 horas a 37°C. [52]

2.4.4.4. Teste da resazurina

A resazurina é um indicador de oxidação/redução, usado na avaliação do crescimento celular, particularmente em ensaios citotóxicos. É um corante azul, não-tóxico e não-fluorescente que se torna cor-de-rosa quando é reduzido a resorufina pelas oxidoreductases das células viáveis. [53]

Após a incubação de 24 horas da placa preparada anteriormente, foram transferidos 100 μ L de cada poço para uma nova placa de 96 poços, aos quais foram adicionados 20 μ L de uma solução 0,1% resazurina. Para terminar, a placa foi incubada a 37°C durante diferentes tempos (1-4 horas).

2.4.4.5. Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

Neste ensaio, foi colocado um peso conhecido de cada amostra na superfície de uma caixa de Petri contendo LB agar de forma a avaliar a actividade antimicrobiana. De seguida a caixa de Petri foi incubada durante 24 horas a 37°C. A avaliação do efeito bactericida do material foi determinada com base na observação da presença/ausência de colónias de bactérias junto da amostra. [54]

2.4.5. Hemocompatibilidade

A hemocompatibilidade pode definir-se como a capacidade de um biomaterial funcionar em contacto com o sangue sem ocorrerem reacções adversas em ambos, bem como em qualquer órgão ou tecido. A hemólise, corresponde à lise dos glóbulos vermelhos, o que provoca a libertação da hemoglobina para o plasma. [55]

Este estudo tem como aplicação final as válvulas cardíacas e para tal, a avaliação da hemocompatibilidade do material usado é crucial. Para isso, foram realizados testes de hemólise e trombose, de acordo com a norma Internacional (ISO) 10993-4 (1999). [56] Estes testes foram realizados com sangue de coelho, fornecido pela Probiológica.

2.4.5.1. Avaliação da trombogenicidade

A trombose é um fenómeno natural, ou artificial, que resulta da oclusão total ou parcial de um vaso sanguíneo, por um trombo ou coágulo sanguíneo. A trombogenicidade é a capacidade do material induzir ou promover a formação de trombos. Ao avaliar a trombogenicidade da poliuretana, pretende-se também avaliar a sua capacidade de calcificação, uma vez que, segundo Bernacca *et al* existe uma relação entre a trombogenicidade e a calcificação. [55] [57]

A avaliação da formação de trombos na superfície do material, *Elastollan 1180A50®*, foi elaborada de acordo com o método de Imai e Nose (1972), que avalia o carácter trombogénico da amostra com base na massa de coágulo formada à superfície desta após contacto com o sangue.

As membranas foram colocadas (em duplicado) em caixas de Petri, às quais foram adicionados 250 µL de sangue (de coelho), evitando qualquer contacto entre o sangue e a caixa de Petri. De forma a iniciar o processo de coagulação do sangue, foram adicionados 25µL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,10 M ao sangue presente na amostra.

De seguida, as caixas de Petri foram colocadas durante 30 minutos numa estufa a 37°C. No final deste tempo foram retiradas da estufa e o processo de coagulação foi parado pela adição de 5 mL de água Milli-Q aos coágulos formados. Estas soluções foram então filtradas e os coágulos fixados no papel de filtro com 1 mL de uma solução 36%

de formaldeído. O controlo positivo corresponde às mesmas quantidades de sangue e CaCl_2 sem amostra, e o negativo corresponde apenas à solução de CaCl_2 .

Finalmente, os coágulos em papel de filtro (previamente pesado) foram colocados na estufa a 37°C até peso constante, para serem pesados novamente. [24] [58]

A percentagem de trombogenicidade é determinada de acordo com a Equação 7:

$$\% \text{ trombogenicidade} = \frac{m_{\text{amostra}} - m_{\text{controlo neg}}}{m_{\text{controlo pos}} - m_{\text{controlo neg}}} \times 100 \quad (7)$$

na qual m_{amostra} representa o peso do coágulo, $m_{\text{controlo neg}}$ o controlo negativo e m_{pos} o controlo positivo.

2.4.5.2. Avaliação do índice hemolítico

A avaliação da percentagem de hemólise que os materiais provocam no sangue (lise dos glóbulos vermelhos), foi elaborada de acordo com o método da cianometahemoglobina modificado, referenciado na norma americana ASTM F 756-00. A percentagem de hemólise é calculada com base na quantidade de hemoglobina (Hb) que é libertada para o plasma quando o material é posto em contacto, directo ou indirecto, com uma solução de sangue diluído, cuja concentração é determinada inicialmente. De acordo com a referida norma, o sangue, diluído numa solução salina tamponizada (PBS), deverá apresentar um valor de concentração de Hb de $10\text{mg/mL} \pm 1\text{mg/mL}$. Além disso, a concentração de Hb no plasma do sangue usado deverá ser inferior a $2,0\text{mg/mL}$. [59]

Determinação da curva de calibração

Inicialmente, e de forma a poder determinar a concentração de Hb no sangue e no plasma, delineou-se uma curva padrão, que relaciona a quantidade de hemoglobina livre com os valores obtidos de absorvância.

Esta curva foi elaborada com base em diferentes concentrações de uma solução de Hb, preparada a partir da dispersão de $0,25\text{g}$ de eritrócitos liofilizados em 75mL de solução de PBS. Depois desta solução ser filtrada foi-lhe retirado 1mL que se adicionou a 5mL

de solução de Drabkin. Foi feita a leitura das absorvâncias desta solução a 504nm e 540nm de forma a verificar a relação $1,59 < A_{540}/A_{504} < 1,63$, para que esta possa ser aceite. Finalmente, a concentração de Hb foi determinada por espectrofotometria de UV-Vis no comprimento de onda de 540 nm, segundo a Equação 8:

$$[Hb] = 1,465 \times A_{540} \times f_d \text{ (g/L)} \quad (8)$$

onde A_{540nm} é a absorvância a 540 nm e f_d é o factor de diluição.

A solução de PBS foi preparada a partir da dissolução de 0,1g de cloreto de potássio (KCl), 4g de cloreto de sódio (NaCl), 0,1g de di-hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) e 0,715g de hidrogenofosfato de sódio di-hidratado (Na₂HPO₄.2H₂O) em 0,5L de água destilada.

Por sua vez, a solução de Drabkin foi preparada a partir da dissolução de 50mg de cianeto de potássio (KCN), 200mg de di-hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), 140g de ferrocianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) e 1mL de Triton X-100 num litro de água destilada. [24]

Determinação da [Hb] no plasma e no sangue

De forma a determinação a [Hb] no plasma, foram centrifugados 5 mL de sangue a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos. Após a centrifugação, foi diluído 1mL da parte sobrenadante (plasma) em 1 mL de solução de Drabkin e realizada a leitura da A_{540} . Assim, determinou-se a [Hb] partindo da curva padrão. Como o valor obtido, 0,395g/L obedece aos parâmetros estabelecidos, esta amostra de sangue permitiu prosseguir com os estudos.

Quanto à [Hb] no sangue, diluíram-se 20µL de sangue em 5mL de solução de Drabkin, seguido da leitura da A_{540} para, através da curva padrão, se determinar [Hb]. O valor obtido foi 83,43mg/mL, que não corresponde aos parâmetros necessários. Portanto, a solução de sangue foi diluída em PBS numa tentativa de acertar o valor. A verificação da [Hb] do sangue diluído foi feita adicionando 400µL desta solução em 5mL de solução de Drabkin, seguida da leitura da A_{540} e respectivo cálculo da [Hb]. Obteve-se finalmente o valor de 9,77mg/mL, permitindo o progresso dos estudos. [24]

Contacto material/sangue

O grau de hemólise do material foi avaliado a partir de dois tipos de ensaios: contacto directo e indirecto. No primeiro, verificam-se as interacções entre o material e o sangue, enquanto no segundo verifica-se se a hemólise é provocada apenas por substâncias libertadas pelo próprio material.

Inicialmente, amostras com uma área superficial de 21cm² foram incubadas em PBS durante cerca de 12h, a 37°C. No final desse tempo, as amostras foram retiradas da solução de PBS e adicionadas a 7mL da solução de sangue diluído, sendo incubadas durante 3h, a 37°C (contacto directo).

No contacto indirecto, foi a solução de PBS, na qual estiveram incubadas as membranas, que foi posta em contacto com o sangue.

O controlo positivo corresponde ao mesmo volume da solução de sangue diluída em água destilada (100% de hemólise), enquanto o controlo negativo corresponde apenas à solução de sangue diluída em PBS.

Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 2300 rpm durante 15 minutos. Do sobrenadante de cada tubo de centrifugação foi retirado 1mL (três réplicas), que se adicionou a 5mL de solução de Drabkin e foi calculada [Hb], pelo mesmo método referido anteriormente.

Finalmente, a percentagem de hemólise foi calculada a partir da Equação 9:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{[Hb]_{amostra} - [Hb]_{controlo\ negativo}}{[Hb]_{controlo\ positivo} - [Hb]_{controlo\ negativo}} \times 100 \quad (9)$$

onde $[Hb]_{amostra}$ representa a concentração de hemoglobina presente no sobrenadante, $[Hb]_{controlo\ negativo}$ e $[Hb]_{controlo\ positivo}$ são as concentrações de hemoglobina nos controlos negativos e positivos, respectivamente.

Para classificar os materiais que contactam com o sangue de acordo com a sua percentagem de hemólise, existe uma escala hemolítica, como se pode visualizar na Tabela 3. [24] [56]

Tabela 3: Classificação dos materiais relativamente ao seu índice hemolítico.

Índice hemolítico	Classificação
0-2	Não hemolítico
2-5	Ligeiramente hemolítico
>5	Hemolítico

Capítulo 3

Modificação por Radiação Ultravioleta (UV)

3.1. Técnica de modificação

As técnicas de polimerização de enxertos por radiação são muito usadas, há mais de 50 anos na área da química de polímeros. Na maior parte dos estudos efectuados até ao momento, as técnicas de modificação por radiação foram usadas com o intuito de melhorar a biocompatibilidade do material, que é o principal objectivo deste trabalho. [60] [61]

Como já foi referido anteriormente (secção 1.4.), o importante é que a modificação efectuada altere a superfície sem alterar as propriedades de massa, e esta técnica de modificação de superfície dos materiais tem precisamente essa capacidade.

O processo de modificação de superfícies por radiação ultravioleta (UV) insere-se precisamente nessas técnicas de modificação por radiação. A exposição controlada de uma superfície a lâmpadas UV pode provocar várias modificações químicas na superfície, como por exemplo *etching*, deposição e polimerização. [62]

A modificação por UV, comparada a outros métodos, tem algumas vantagens tais como a rapidez da reacção, o baixo custo do processo, o equipamento simples, a fácil industrialização, e a mais importante de todas é que os enxertos estão limitados a uma

região muito superficial apenas. Esta técnica é particularmente utilizada quando as superfícies a modificar não contêm grupos químicos reactivos. [44] [61]

Geralmente, e apesar de poder ser usada toda a largura do espectro UV, são usados comprimentos de onda inferiores a 300 nm uma vez que a iniciação ocorre de forma mais favorável. [61]

O que acontece normalmente é a formação de radicais na superfície, seguida da polimerização de um monómero, frequentemente na presença de um fotoiniciador ou um fotosensibilizador.

A densidade do enxerto pode ser controlada através do tempo de irradiação e da profundidade de penetração do monómero enxertado. [60]

Os fotoiniciadores absorvem a luz UV e convertem-na em energia química. É este o processo que permite a formação dos radicais livres que inicializam o processo de polimerização dos monómeros. [63]

A escolha do fotoiniciador certo é importante uma vez que são os passos iniciais que controlam o tempo da reacção. Existem muitos fotoiniciadores e alguns estudos já foram efectuados para avaliar a sua biocompatibilidade. Em 2005, Williams et al, estudaram a biocompatibilidade de três fotoiniciadores diferentes, entre os quais o Irgacure[®]2959, em seis linhas de cultura celular diferentes. Deste estudo concluíram que o Irgacure[®] 2959 é o menos citotóxico. [64]

Além disso, o Irgacure[®] 2959 é muito solúvel em água. Estas características motivaram a sua escolha como fotoiniciador para este procedimento experimental.

O Irgacure[®] 2959 (Figura 16) absorve então a luz UV e dissocia-se em dois radicais primários, que reagem com os grupos C=C dos monómeros que serão enxertados. [65] [66]

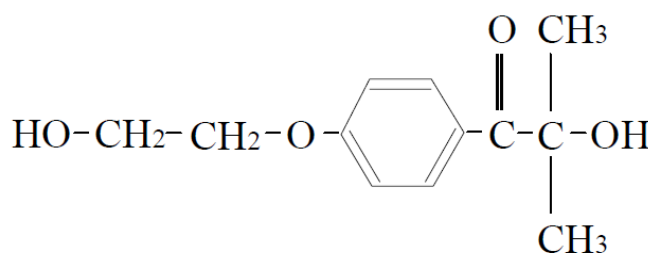


Figura 15: Estrutura do Irgacure[®] 2959. [67]

Os monómeros mais importantes usados na fotopolimerização com radicais livres são os acrilatos, os metacrilatos e os poliésteres insaturados, devido às suas propriedades antibacterianas e biocompatibilidade. [63]

Os monómeros escolhidos para este trabalho experimental foram o ácido metacrílico (MAA) e o metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), devido às suas características biocompatíveis.

O MAA (Figura 16) é um ácido líquido transparente, com um odor desagradável. É solúvel em água e reage com agentes oxidantes. [68]

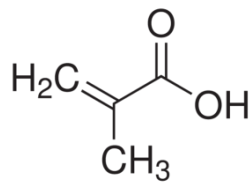


Figura 16: Estrutura do ácido metacrílico (MAA). [69]

O HEMA (Figura 17) é um líquido transparente muito usado na preparação de polímeros hidrofílicos para aplicações biomédicas como por exemplo lentes de contacto. É um monómero solúvel que, quando usado como co-monómero pode controlar a hidrofilicidade do polímero final ou introduzir grupos reactivos. [70] [71]

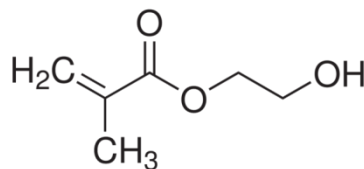


Figura 17: Estrutura do metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). [72]

Muitos materiais poliméricos têm baixas energias de superfície e são geralmente mais hidrofóbicos que hidrofílicos. Uma vez que os grupos hidrofóbicos não reagem tão facilmente com superfícies polares, é necessário alterar as propriedades de superfície das membranas. [44]

A ideia é a introdução de grupos carboxilo e hidroxilo na superfície de forma a melhorar a sua hidrofilicidade, bem como a biocompatibilidade. [73]

A reacção ocorre como está representado no esquema seguinte (Figura 18):

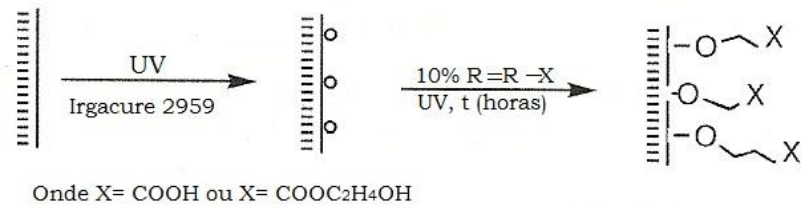


Figura 18: Representação esquemática da modificação por radiação UV (adaptado de [25]).

3.2. Procedimento experimental

Nesta técnica de modificação superficial, as membranas foram irradiadas inicialmente com luz UV, lâmpada Mineralight® UVGL-48 a 254nm, na presença de uma solução aquosa 0,5% de Irgacure® 2952 durante 30 minutos. De seguida, as membranas foram retiradas desta solução e imersas em soluções aquosas 10% (m/v) HEMA e de 10% (m/v) MAA, voltando a ser irradiadas com luz UV do mesmo comprimento de onda para os tempos 0,25;0,5; 1; 2; 3 e 4 horas. Depois disto, as membranas foram lavadas com água destilada durante cerca de 10 minutos e secas à temperatura ambiente.

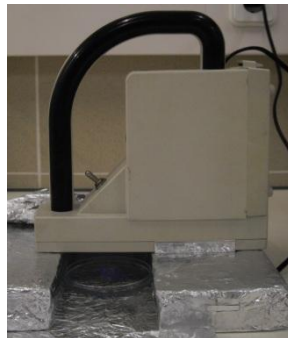


Figura 19: Técnica UV de modificação das membranas.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície

Inicialmente, este procedimento foi realizado com vários tempos de irradiação com o objectivo de determinar o tempo mais favorável. A avaliação foi feita com base na

medição dos ângulos de contacto para cada um dos tempos e para ambos os monómeros.

Assim, no gráfico seguinte (Gráfico 1) estão representados os resultados obtidos.

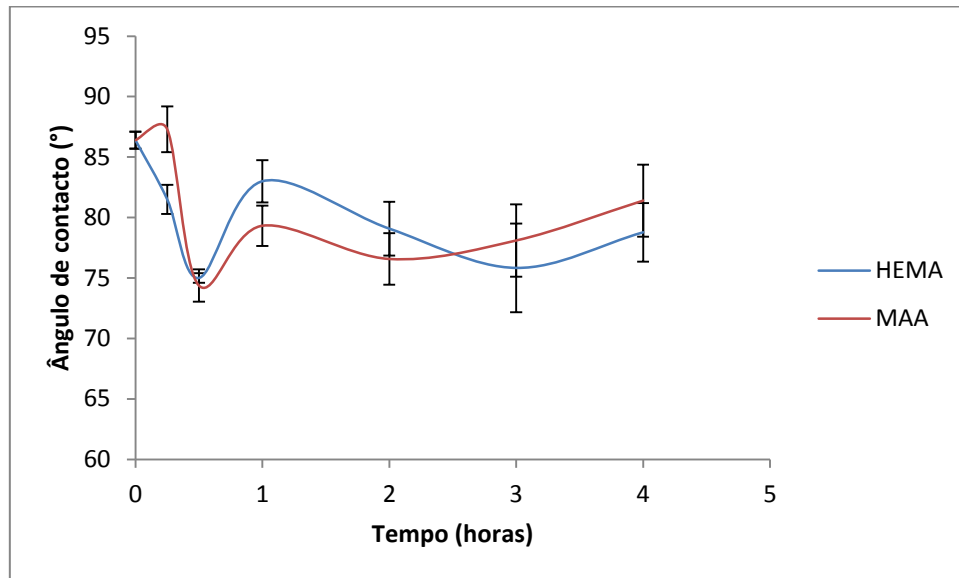


Gráfico 1: Ângulo de contacto obtido para os diferentes tempos de irradiação com UV, para os dois monómeros (HEMA E MAA).

Pela análise do Gráfico 1 é possível verificar que, quer para o HEMA quer para o MAA, o valor do ângulo de contacto mais baixo obtido ocorre com uma irradiação de 30 minutos. Quanto mais pequeno o ângulo de contacto, mais hidrofílica é a membrana. É de referir que ao tempo 0 horas corresponde o valor do ângulo de contacto das membranas sem qualquer modificação, com o valor de $86,4 \pm 0,7$.

Uma vez que usando o HEMA o ângulo baixou para $75,0 \pm 0,4$ e no caso do MAA baixou para $74,4 \pm 1,3$, permite inferir que os 30 minutos de irradiação são o melhor tempo conseguido.

Foram realizadas várias medições para cada tempo de irradiação, sendo que em anexo se encontram as tabelas (Anexo A) com a média das medições.

Assumindo os 30 minutos como o tempo ideal de irradiação, os estudos prosseguiram com as membranas modificadas apenas durante este tempo.

Para avaliar as energias de superfície das membranas, antes e após a modificação, foram medidos os ângulos de contacto com quatro líquidos distintos: água,

formamida, diiodometano e etilenoglicol. Então, de acordo com o método de Owens-Wendt-Rabel-Kaelble foram determinadas a energia de superfície bem como as componentes polar e dispersiva. Os resultados obtidos são apresentados no Gráfico 2.

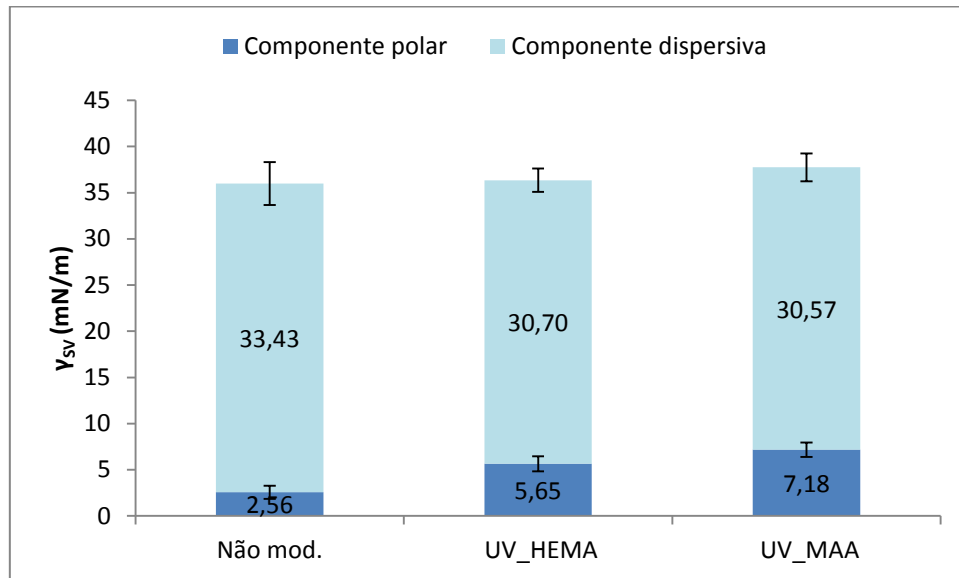


Gráfico 2: Energia de superfície representada pelas componentes polar e dispersiva, quer para as membranas não modificadas, quer para as modificadas por UV.

Podemos então observar, a partir do Gráfico 2, que a energia de superfície aumenta para ambas as modificações em relação às membranas não modificadas, embora este aumento seja pequeno. Da mesma forma há um aumento da componente polar. Estes resultados correspondem ao expectável uma vez que foram introduzidos grupos funcionais (OH e COOH) na superfície a partir do enxerto do monómero, o que sugere também o sucesso da reacção de enxerto.

3.3.2. Hidrofilicidade ao longo do tempo

A hidrofilicidade ao longo do tempo foi avaliada pelas medições dos ângulos de contacto durante os tempos 1, 2,7 e 15 dias, com as membranas expostas ao ar.

No Gráfico 3, estão representadas as evoluções dos ângulos de contacto para a membrana não modificada, para a enxertada com HEMA e para a enxertada com MAA, activadas por UV. Em relação à membrana não modificada, o ângulo mantém-se

aproximadamente constante, sendo que no tempo 0 tem um valor de $86,5 \pm 0,4$ e ao final de duas semanas (15 dias) tem um valor de $91,6 \pm 1,7$.

Para as duas modificações (UV_HEMA e UV_MAA) verifica-se um aumento do ângulo de contacto ao longo do tempo até estabilizar. No caso do UV_HEMA, o ângulo inicial tem o valor de $73,9 \pm 0,9$, que ao final de 7 dias aumenta para $92,6 \pm 1,6$, estabilizando. Quanto ao UV_MAA, o ângulo no início é de $71,2 \pm 0,5$ e cresce até aos 7 dias para $90,3 \pm 3,1$ estabilizando também. Isto indica que as membranas estão a recuperar a sua hidrofobicidade. Isto pode ser explicado pela contaminação das membranas por estarem em contacto com o ar ou por rearranjos que possam ocorrer na superfície, que podem reduzir os sítios activos da superfície provocados pela modificação, resultando num aumento do ângulo. [25]

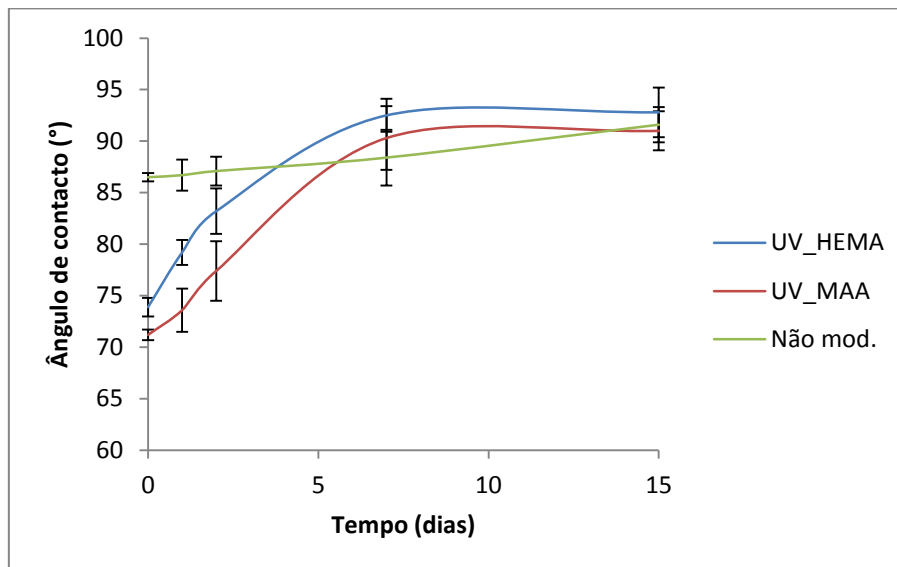


Gráfico 3: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas com UV e não-modificadas, expostas ao ar.

Como não se pretende que as membranas recuperem a hidrofobicidade, a hidrofobicidade ao longo do tempo foi também testada incubando as membranas em diferentes meios, com o objectivo de avaliar a influência destes na recuperação da hidrofobicidade. Foram usados PBS, água destilada (H_2O) e meio de cultura (MC), para os tempos de incubação 4, 6, 24 horas, e 7, 15 dias. O meio de cultura usado foi o DMEM-F12.

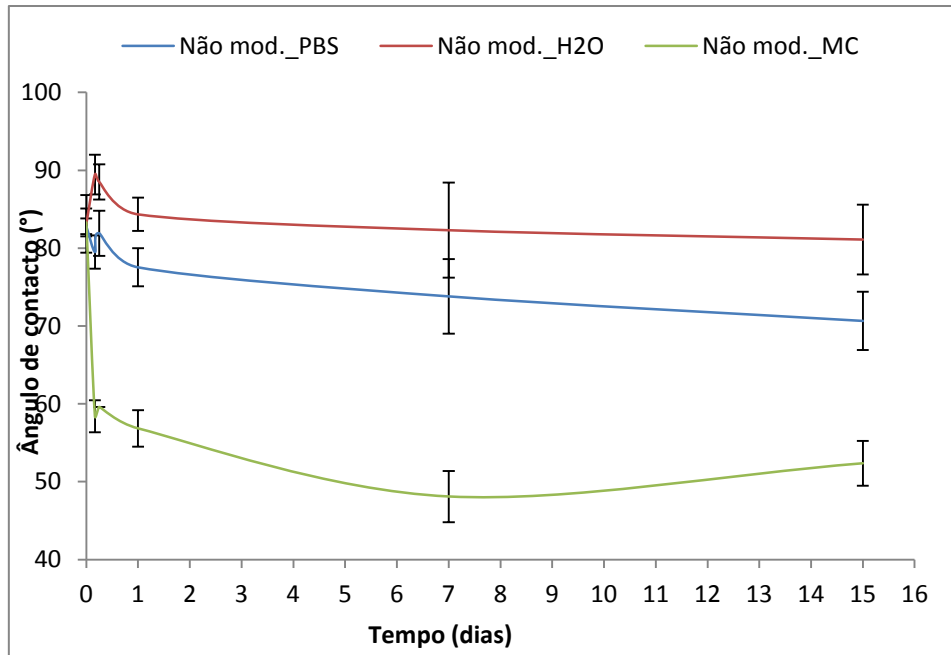


Gráfico 4: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas não modificadas, incubadas em PBS, H₂O e meio de cultura (MC).

O Gráfico 4 refere-se às membranas não modificadas incubadas nos diversos meios. Pode observar-se que os ângulos são superiores para a incubação em água (H₂O), seguida da incubação em PBS e finalmente a incubação em meio de cultura (MC).

Para a incubação em H₂O, o ângulo mantém-se aproximadamente constante. Ao final de 4 horas há um pequeno aumento, mas o ângulo volta a diminuir nas 24 horas. O ângulo inicial tem o valor de $83,1 \pm 3,7$ e o ângulo final de $81,1 \pm 4,5$.

O comportamento dos ângulos de contacto em PBS é ligeiramente diferente. Ocorre uma diminuição ao longo do tempo, embora não muito significativa, apesar de um ligeiro aumento ao final de 6 horas. O ângulo inicial é de $82,2 \pm 1,0$ e o final $70,7 \pm 3,7$.

No que se relaciona com o meio de cultura, verifica-se uma diminuição significativa do ângulo ao final de 4 horas. O ângulo passa de $83,3 \pm 1,8$ para $58,4 \pm 2,0$ e ao final dos 15 dias tem o valor de $52,4 \pm 2,9$. A constituição do meio de cultura, sais e proteínas pode ser a causa dos ângulos das membranas incubadas neste meio serem inferiores. Os grupos amina e carboxílicos associados às proteínas podem ligar-se às membranas, tornando os ângulos de contacto mais baixos.

Os Gráficos 5 e 6 apresentam os resultados relativos às membranas modificadas com UV_HEMA e UV_MAA, respectivamente, nos diferentes meios de incubação. Para

ambas as modificações, verifica-se que os ângulos das membranas incubadas em PBS e H₂O são próximos, e que os ângulos da incubação no MC são inferiores.

No caso do UV_HEMA em PBS, após um pequeno aumento do ângulo nas 4 horas, o ângulo diminui nos tempos seguintes, atingindo valores próximos do inicial. O valor inicial é $84 \pm 2,9$ e o final $89,2 \pm 2,5$. Para a incubação em H₂O os ângulos de contacto mantêm-se aproximadamente constantes ao longo do tempo, não se verificando recuperação da hidrofobicidade. Finalmente, para a incubação em MC, há uma diminuição do ângulo de $85,2 \pm 0,2$ para $51,8 \pm 5,8$ ao final de 4 horas. Deste tempo até aos 15 dias, o ângulo mantém-se em valores aproximadamente constantes.

Os comportamentos dos ângulos de contacto das membranas UV_MAA incubadas em PBS e H₂O são semelhantes. Existe um ligeiro aumento ao final de 4 horas, no entanto o ângulo retorna para valores próximos do inicial. Já as membranas incubadas em MC atingem um valor mínimo ao final de 4 horas ($30,5 \pm 3,6$). No entanto o ângulo começa a aumentar sendo ao final de 15 dias $47,6 \pm 1,7$.

Tal como foi referido anteriormente, a diminuição dos ângulos de contacto das membranas incubadas em meio de cultura pode dever-se ao facto deste ser constituído por proteínas com grupos carboxílicos e amina que levam à diminuição do ângulo de contacto.

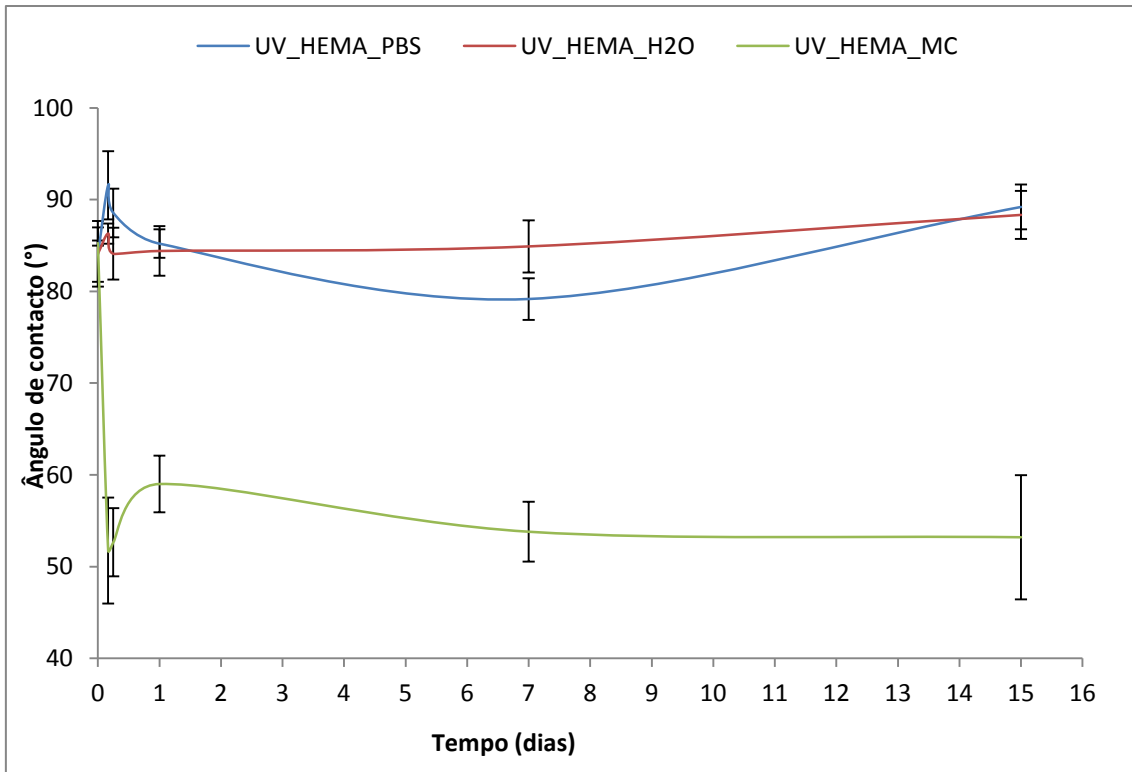


Gráfico 5: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas por UV_HEMA, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).

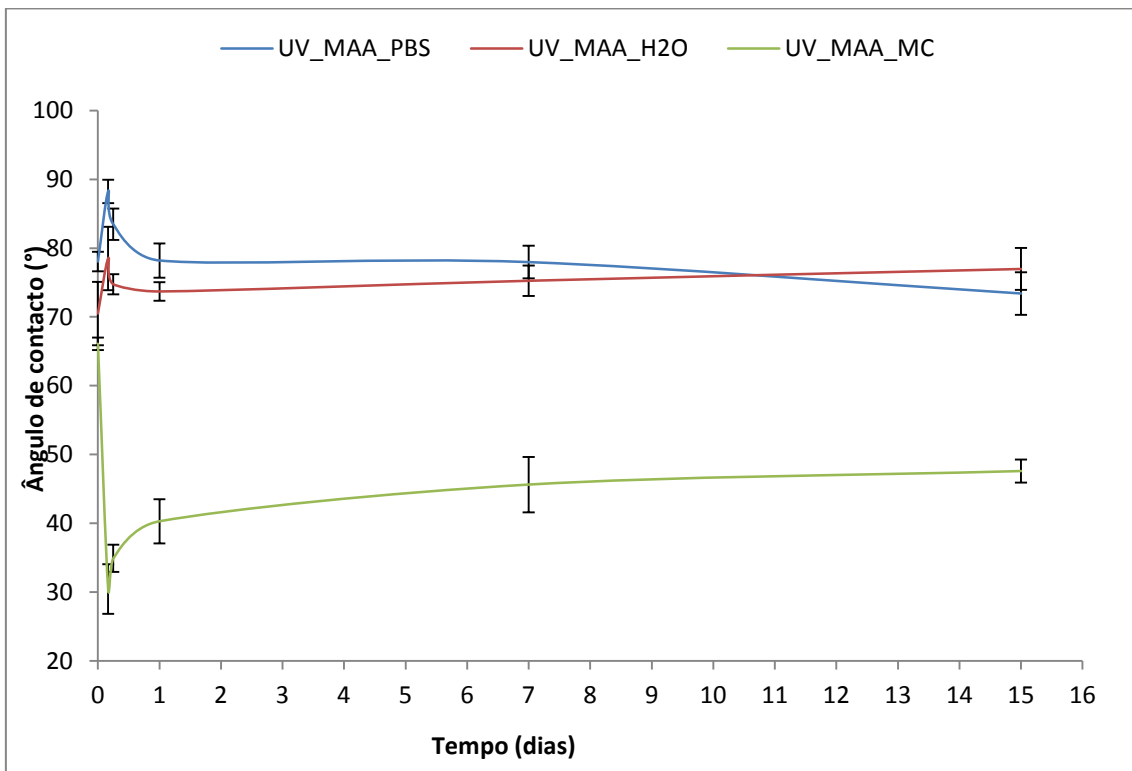


Gráfico 6: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas por UV_MAA, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).

Após 15 dias de incubação, pode então verificar-se que os ângulos mais baixos são os das membranas incubadas em meio de cultura, sendo muito próximos entre todas elas (não modificadas, UV_HEMA e UV_MAA).

3.3.3. Avaliação da capacidade de inchaço (*Swelling*)

A capacidade de inchaço das membranas foi avaliada em três soluções distintas: PBS, água destilada (H₂O) e meio de cultura (MC). Portanto, as membranas foram incubadas nestas soluções, durante os tempos 1, 4, 6, 24, 48 e 168 horas e o seu peso foi medido para cada tempo.

Os resultados para a capacidade de inchaço em cada um dos meios, calculada a partir da Equação 6, secção 2.4.3., são apresentados nos Gráficos 7, 8 e 9.

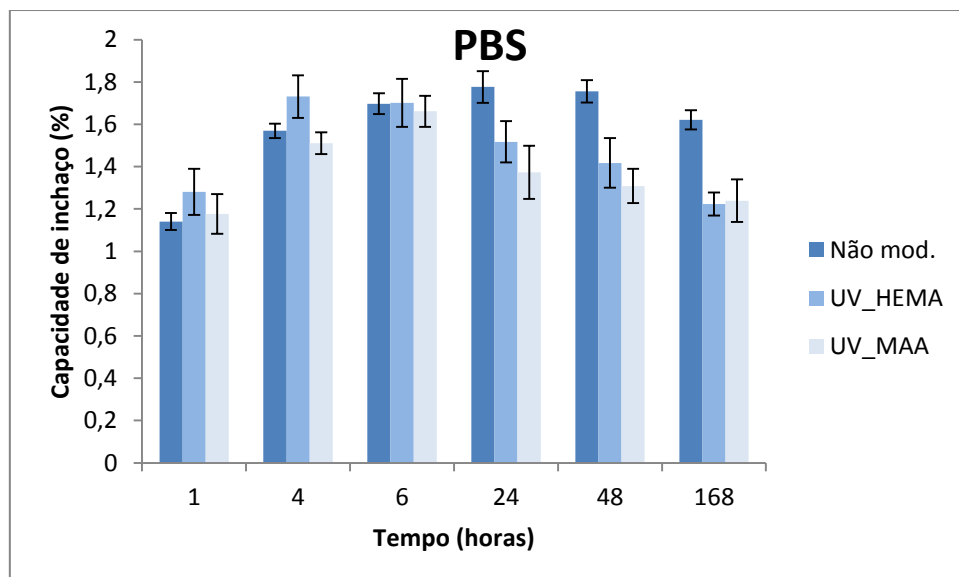


Gráfico 7: Capacidade de inchaço das membranas não-modificadas e modificadas por UV, incubadas em PBS ao longo do tempo.

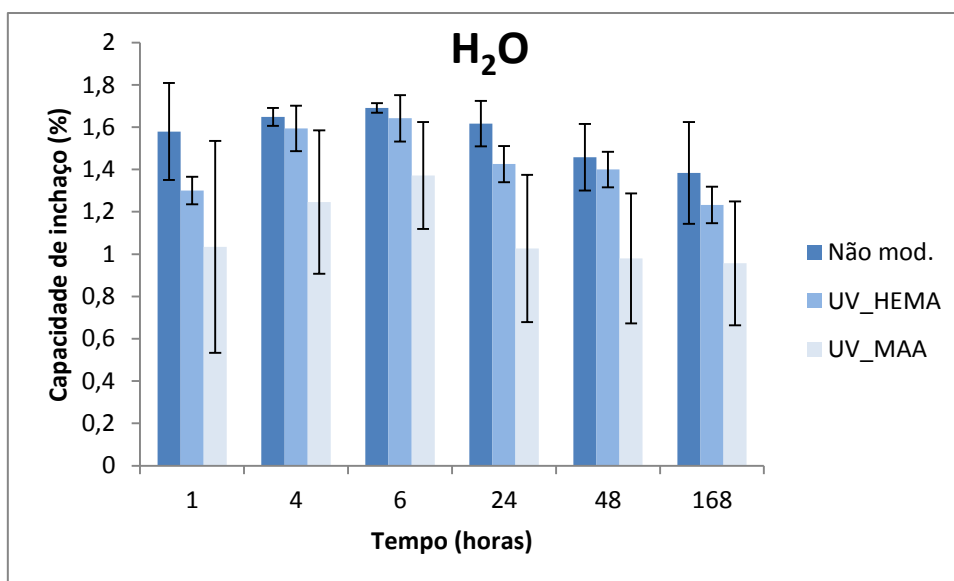


Gráfico 8: Capacidade de inchaço das membranas não-modificadas e modificadas por UV, incubadas em H₂O ao longo do tempo.

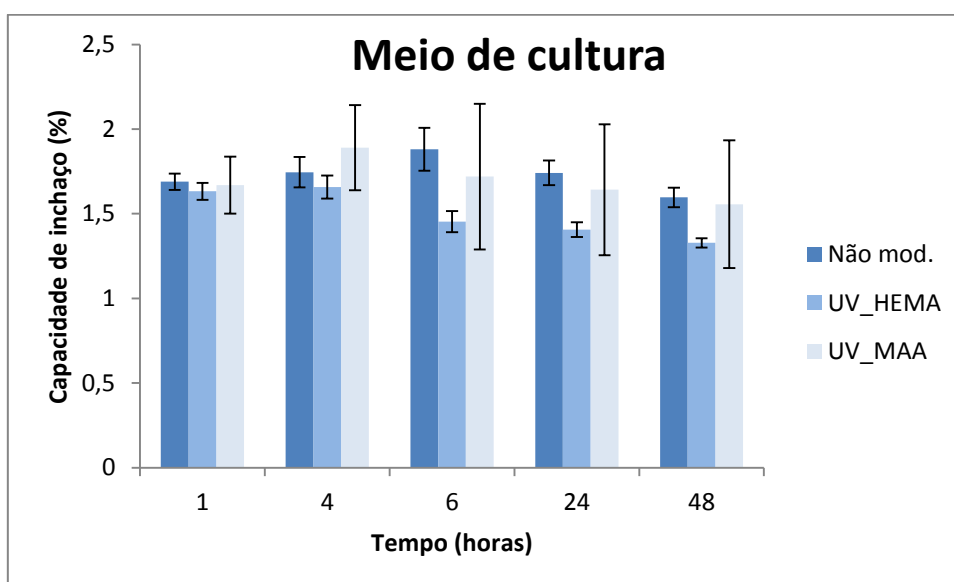


Gráfico 9: Capacidade de inchaço das membranas não-modificadas e modificadas por UV, incubadas em MC ao longo do tempo.

As membranas, depois de enxertadas com os monómeros reduzem a sua capacidade de inchaço em relação às membranas não modificadas, em geral. À excepção da incubação no meio de cultura, as membranas UV_MAA incham menos que as UV_HEMA, que por sua vez incham menos que as membranas não modificadas. No entanto, é importante referir que para todas as membranas, a percentagem de inchaço é inferior a 2%, o que reflecte uma capacidade de inchaço muito reduzida por parte das membranas. Uma vez que as modificações são apenas superficiais, o expectável era que realmente não existissem grandes aumentos de massa.

3.3.4. Cultura de células

Os estudos da adesão celular foram elaborados com fibroblastos humanos. A adesão e proliferação celulares foram avaliadas através de um microscópio óptico invertido. Como se pode verificar pela Figura 20, as células aderiram e proliferaram na presença dos materiais, bem como no controlo negativo. Ao final de 24 horas observou-se *filopodium* das células (finos alongamentos citoplasmáticos, relacionados quer com a mobilidade celular quer com a adesão das células a um substrato), o que indica que as células estão aderidas ao material, estão expandidas e se difundiram ao longo das amostras, permitindo concluir que estas têm as características morfológicas e químicas desejáveis. [74] [75]

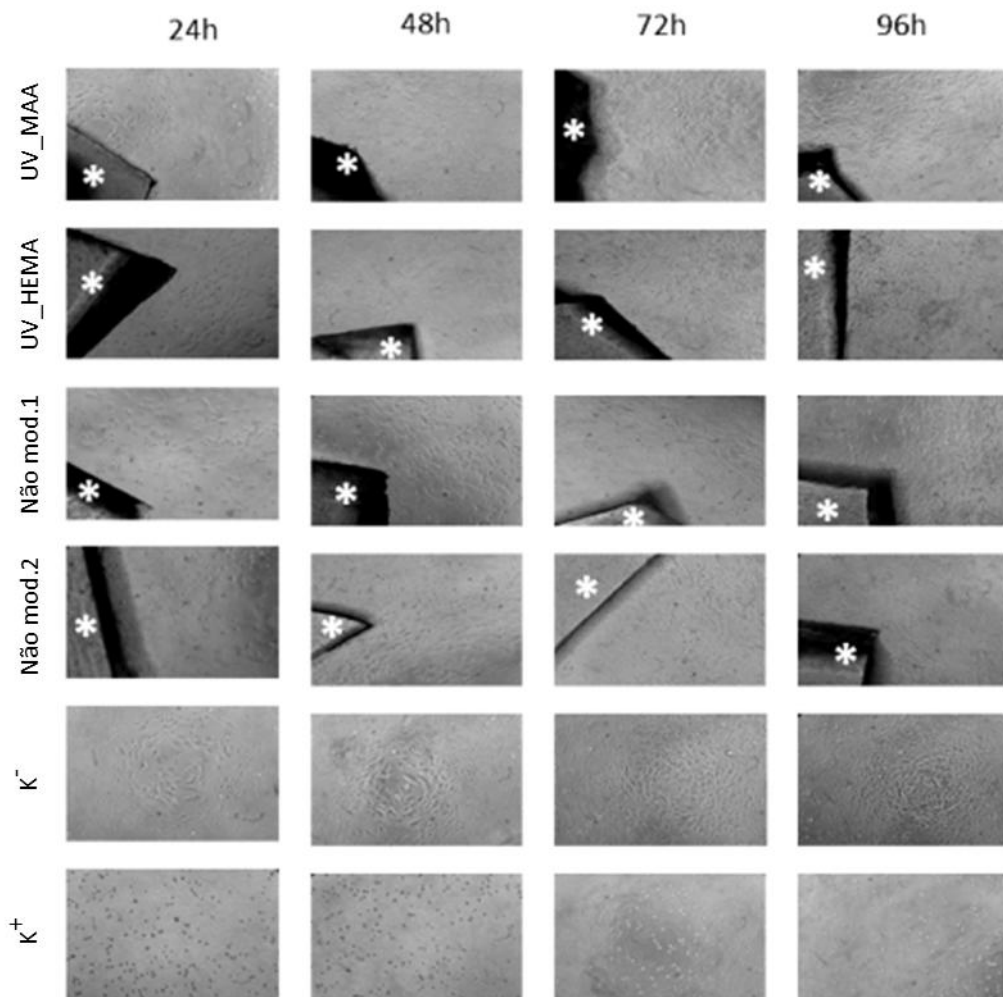


Figura 20: Fotografias microscópicas das células (fibroblastos humanos) na presença dos materiais modificados com UV, dos não modificados e dos controlos positivo (K⁺) e negativo (K⁻), para 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

O teste MTS foi então realizado com o objectivo de caracterizar a resposta fisiológica dos fibroblastos na presença das amostras. Na Figura 21, pode observar-se que quer para a modificação UV_HEMA quer para a UV_MAA, as células apresentam maior viabilidade que no controlo positivo. Além disso, apresentam uma viabilidade semelhante ao controlo negativo. Portanto, nenhuma destas amostras afecta a integridade nem a viabilidade das células.

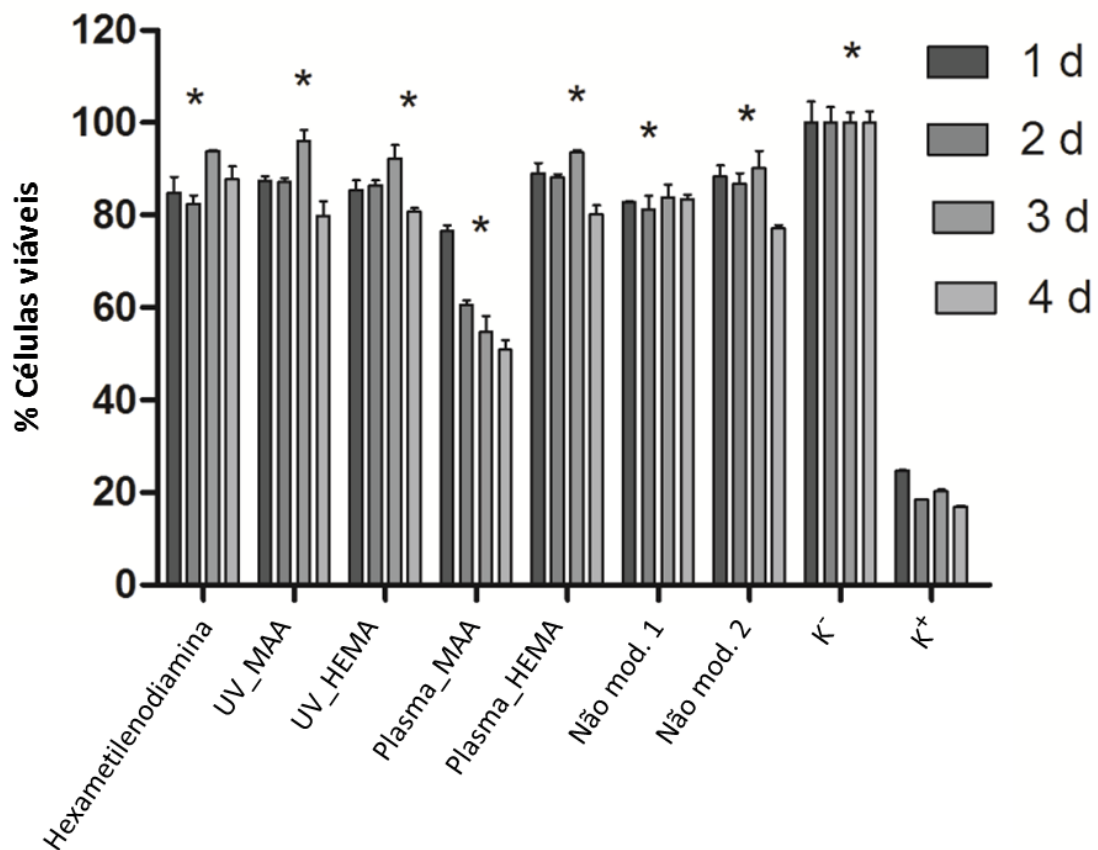


Figura 21: Actividade celular após 24, 48, 72 e 96 horas em contacto com os diferentes materiais e controlos positivo (K*) e negativo (K).

A actividade antibacteriana das amostras foi avaliada a partir do MIC, que é definido como a concentração mínima do material que inibe o crescimento de um organismo. Foi avaliada a turbidez após 24 horas de incubação a 37°C.

Através da Figura 22, pode verificar-se que as amostras modificadas com UV_MAA e UV_HEMA apresentam um efeito antibacteriano ao contrário das membranas não modificadas. Os poços estão realçados com um círculo e apresentam ausência de turbidez, o que permite retirar esta conclusão.

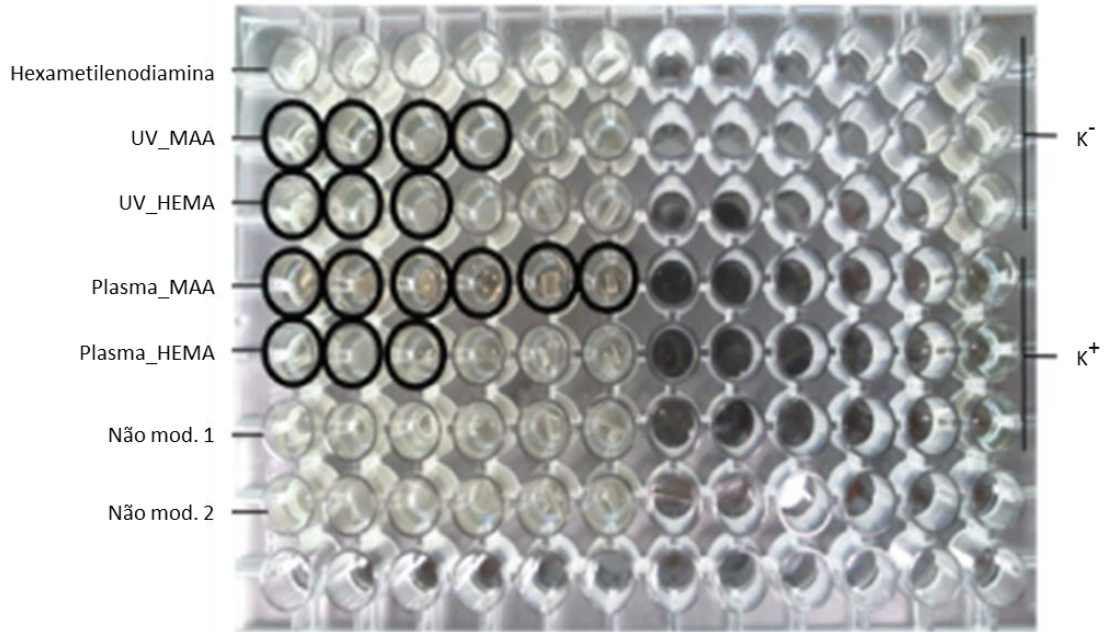


Figura 22: Imagem da placa usada para a determinação do MIC dos materiais modificados e não-modificados. O peso do material diminui ao longo da linha.

De forma a confirmar estes resultados, foi realizado o teste da resazurina, apresentado na Figura 23.

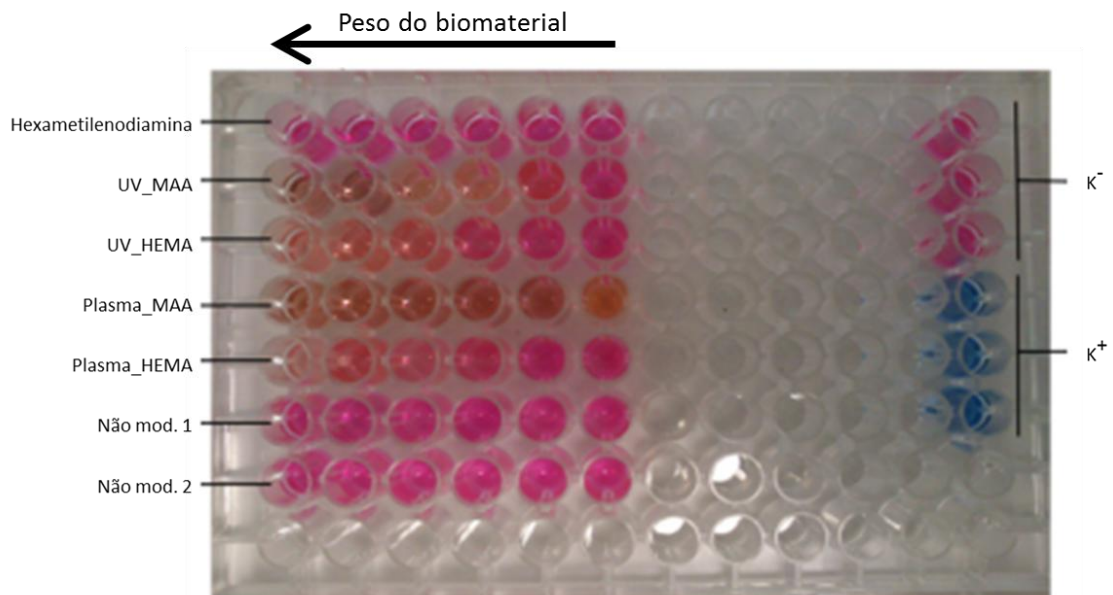


Figura 23: Imagem da placa usada para a determinação do MIC dos materiais modificados e não-modificados, a partir do teste da resazurina. O peso do material diminui ao longo da linha.

Através da mudança de cor dos poços, confirma-se o efeito antibacteriano para as membranas modificadas com UV_MAA e UV_HEMA. Pode também verificar-se que o

crescimento das bactérias diminui com o aumento do peso do material, uma vez que aumentando o peso do polímero, os poços ficam mais cor-de-rosa.

Finalmente, foi realizado o teste MBC, caracterizado pela concentração mínima de amostra necessária para provocar a morte das bactérias após 24 horas de incubação.

Observando a Figura 24, verifica-se uma área de inibição do crescimento das bactérias para ambas as modificações (UV_HEMA e UV_MAA), o que está de acordo com os testes anteriores.

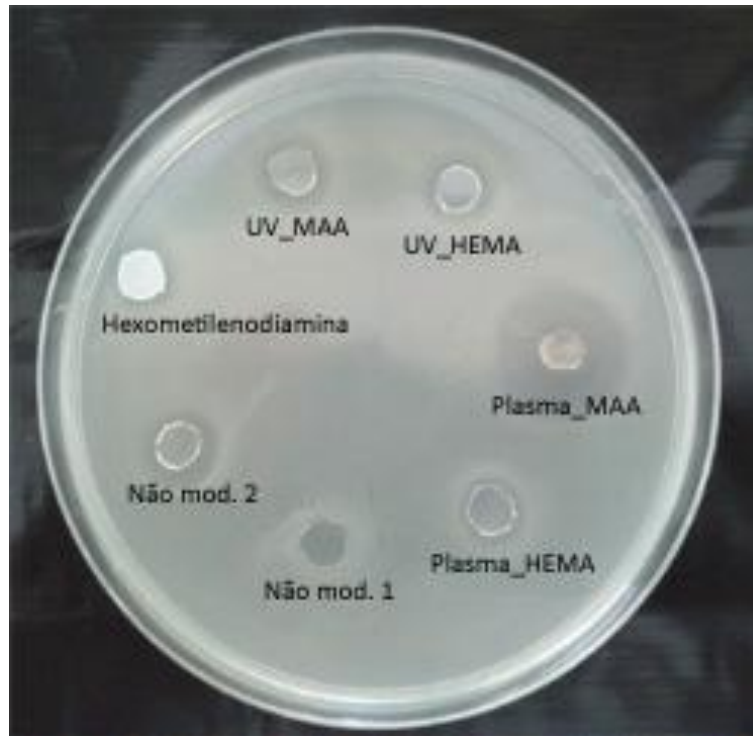


Figura 24: Imagem da placa de ágar para determinação da MBC dos materiais.

3.3.5. Hemocompatibilidade

3.3.5.1. Avaliação da trombogenicidade

A avaliação da trombogenicidade foi efectuada através do peso dos coágulos formados na superfície das membranas quando em contacto com o sangue, durante 30 minutos. O vidro foi usado como controlo positivo, uma vez que é um material muito trombogénico e o índice de trombogenicidade foi determinado de acordo com a Equação 7, secção 2.4.5.1.

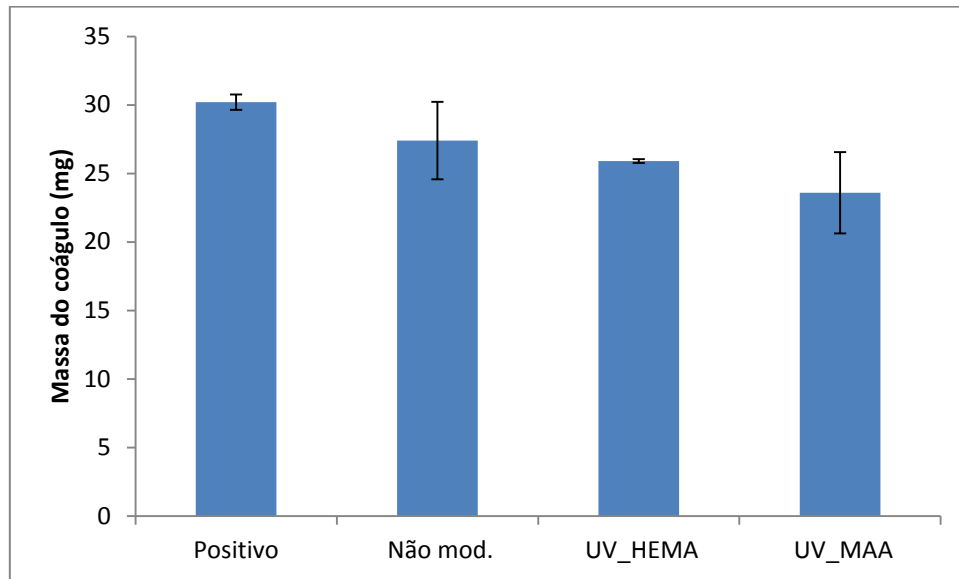


Gráfico 10: Representação gráfica dos valores médios dos coágulos formados após 30 minutos de contacto do sangue com as membranas não modificadas e modificadas por UV, bem como do controlo positivo.

Tabela 4: Valores obtidos para a percentagem de trombose dos materiais não modificados e dos modificados por UV, bem como do controlo positivo.

Membrana	% Trombogenicidade
Positivo	100
Não modificada	89,59
UV_HEMA	84,01
UV_MAA	75,46

Ao final de 30 minutos, as próprias membranas não modificadas são trombogénicas. Após o enxerto dos monómeros (UV_HEMA E UV_MAA) o índice de trombogenicidade diminui apesar das membranas serem igualmente consideradas trombogénicas (Tabela 4). Da análise do Gráfico 10, verifica-se que o coágulo como menor massa formado corresponde às membranas enxertadas com MAA, conseqüentemente com menor percentagem de trombogenicidade.

3.3.5.2. Avaliação do índice hemolítico

A avaliação do índice hemolítico foi elaborada com base no método da cianometahemoglobina modificado. Este teste mede a capacidade de um material

provocar a ruptura dos eritrócitos quando em contacto com o sangue. Foram elaborados os testes por contacto directo e indirecto e o índice foi calculado com base na Equação 9, e classificados com base na Tabela 3, secção 2.4.5.2.

O controlo positivo corresponde ao sangue diluído em água, mas com a mesma concentração de hemoglobina (Hb), enquanto o controlo negativo corresponde ao sangue diluído em PBS sem amostra. (ver secção 2.4.5.2).

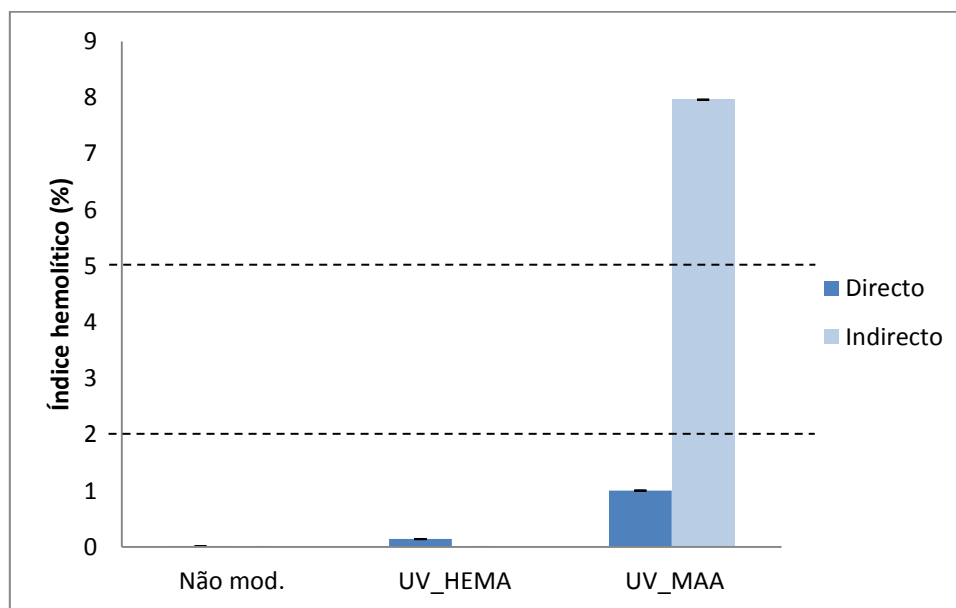


Gráfico 11: Representação gráfica do índice hemolítico das membranas não modificadas e das modificadas por UV, para os controlos directo e indirecto.

Da análise do Gráfico 11, facilmente se conclui que o material no seu estado não-modificado não é hemolítico para qualquer dos contactos, sendo o seu índice aproximadamente 0.

Pode também verificar-se que as membranas enxertadas com MAA são mais hemolíticas do que as enxertadas com HEMA.

Para o caso do HEMA, a solução de incubação prévia (PBS) não apresenta qualquer capacidade de hemólise. Apesar do ligeiro aumento para o controlo directo, o valor do índice hemolítico encontra-se abaixo de 2, e portanto as membranas são não hemolíticas.

Em relação ao MAA, verifica-se uma grande diferença entre os contactos directo e indirecto, de forma a que o contacto directo é considerado não hemolítico e o indirecto hemolítico. Isto pode dever-se a dois factos: ou as membranas não se

encontravam bem lavadas e continham excesso de monómero à superfície, ou o monómero não foi bem enxertado, o que levou à sua libertação para o meio de PBS quando a amostra foi incubada.

3.4. Conclusão

As membranas de *Elastollan 1180A50*[®] foram modificadas com radiação UV, seguida do enxerto de dois monómeros distintos: HEMA e MAA.

A determinação dos ângulos de contacto permitiu concluir que de facto a membrana se torna mais hidrofílica quando modificada, com ambos os monómeros, uma vez que há uma diminuição do ângulo de contacto. O ângulo é inferior quando as membranas são enxertadas com MAA. Além disso, o aumento da componente polar da membrana é também superior para esta modificação. No entanto, as membranas apresentam uma recuperação da hidrofobicidade ao longo do tempo. Do controlo da hidrofiliabilidade das membranas incubadas nos diferentes meios, pode concluir-se que o melhor meio para as incubar é o meio de cultura (DMEM-F12), uma vez que permite manter os ângulos de contacto da membrana mais baixos, mantendo-a mais hidrofílica, o que se relaciona com uma melhor biocompatibilidade.

De acrescentar também que a capacidade de inchaço das membranas é muito reduzida (< 2%). Portanto, esta TPU não tem tendência a inchar na presença de fluidos. Quando os fibroblastos foram colocados em contacto com as membranas, aderiram e proliferaram.

Os testes microbiológicos demonstraram que tanto as membranas enxertadas com HEMA como as enxertadas com MAA possuem actividade antibacteriana, não permitindo o crescimento das bactérias. Todas estas são características desejáveis para a aplicação da poliuretana enquanto válvula cardíaca.

Finalmente, a partir da avaliação da hemocompatibilidade, concluiu-se que as membranas enxertadas com HEMA são trombogénicas, mas não-hemolíticas, quer para o controlo directo quer para o indirecto. As membranas enxertadas com MAA, apresentam elevado índice de trombogénica. São consideradas não-hemolíticas, quando avaliadas por contacto directo, no entanto são hemolíticas para o contacto indirecto. A causa desta disparidade tanto pode ser por excesso de monómero à

superfície como monómero mal enxertado. A aplicação destas membranas enquanto válvulas cardíacas está excluída devido ao seu índice de trombogenicidade. O mesmo acontece para as membranas modificadas com UV e enxertadas com HEMA.

Capítulo 4

Modificação com hexametilendiamina

4.1. Técnica de modificação

Os métodos químicos de modificação de superfícies podem dividir-se em modificação por enxerto de polímeros, nas *Self Assembled Monolayers (SAM's)* e enxerto de biomoléculas. Nestas técnicas, a amostra é exposta à acção de reagentes líquidos, formando grupos reaccionais à superfície. [62] [76]

No caso do enxerto de polímeros, os grupos reaccionais podem ser formados por junção directa de moléculas poliméricas que contêm grupos funcionais ou por polimerização de enxerto de monómeros.

Existem diversos factores que influenciam as propriedades da camada enxertada, tais como o peso molecular do polímero, a extensão da cadeia ramificada, a densidade dos grupos funcionais e a solubilidade do polímero. [62]

As SAM's são fáceis de fabricar, podem conter diferentes grupos funcionais e são uma forma simples de tornar uma superfície funcional. Têm sido bastante estudadas como modelo para estudos sobre adesão celular e adsorção de proteínas. [62]

O revestimento de superfícies com moléculas biologicamente activas de forma a gerar uma resposta específica no ambiente biológico é uma área de grande interesse. Uma

vasta gama de biomoléculas incluindo proteínas, peptídeos, polissacarídeos, lípidos e oligonucleótidos foram imobilizadas em superfícies com o propósito de extrair respostas biológicas, previsíveis e controladas. Na área dos biomateriais foi de particular interesse a incorporação de sequências peptídicas (por exemplo RGD) para promover a adesão celular. [62]

Nesta parte do trabalho experimental foi reproduzida uma técnica que permite a introdução de grupos amina (NH_2) livres na superfície da membrana. Para isso, a membrana foi aminolizada com hexametilendiamina, que é um material orgânico com grupos amina nas extremidades, de carácter hidrofílico (Figura 25). [77]



Figura 25: Estrutura química da hexametilendiamina.

O objectivo desta modificação superficial é, tal como das outras realizadas, o aumento da biocompatibilidade das membranas de poliuretano.

4.2. Procedimento experimental

As membranas de *Elastollan 1180A50*® foram lavadas com água desionizada e secas a baixa pressão durante 24 horas, até atingirem peso constante. Depois, foram imersas numa solução de hexametilendiamina/propanol 0,1g/mL durante 24 e 48 horas a 37°C (Figura 26). Após este tempo de incubação, as membranas foram novamente lavadas com água desionizada e secas como anteriormente.

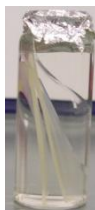


Figura 26: Incubação das membranas na solução de hametilendiamina/propanol.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície

Após a realização do procedimento experimental, a hidrofiliabilidade da membrana foi avaliada com base na determinação dos ângulos de contacto. Como se pode observar no Gráfico 12, o ângulo de contacto diminuiu ao final de 24 horas para um valor de $36,7 \pm 3,6$. Ao final das 48 horas o ângulo já é superior, com um valor de $66,4 \pm 3,2$. De referir que ao tempo 0 corresponde o valor do ângulo de contacto da membrana sem qualquer modificação, com o valor de $86,4 \pm 0,7$.

Com esta técnica pretendia-se a ligação de grupos NH_2 , que conferem um carácter mais hidrofílico à membrana. Este aumento do valor do ângulo de contacto ao final de 48 horas pode dever-se à ligação dos grupos amina entre eles, deixando uma maior quantidade de superfície livre.

Como o valor mais baixo do ângulo de contacto se obteve para as 24 horas, o resto dos estudos prosseguiu com as membranas modificadas durante este tempo.

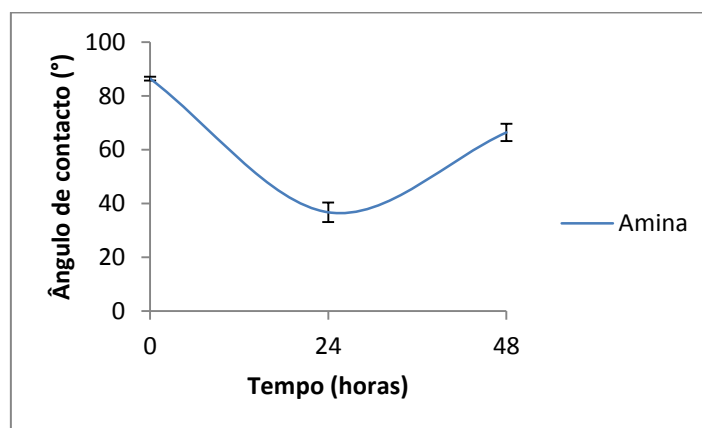


Gráfico 12: Resultados obtidos para os ângulos de contacto das membranas modificadas com hexametilendiamina após 24 e 48 horas.

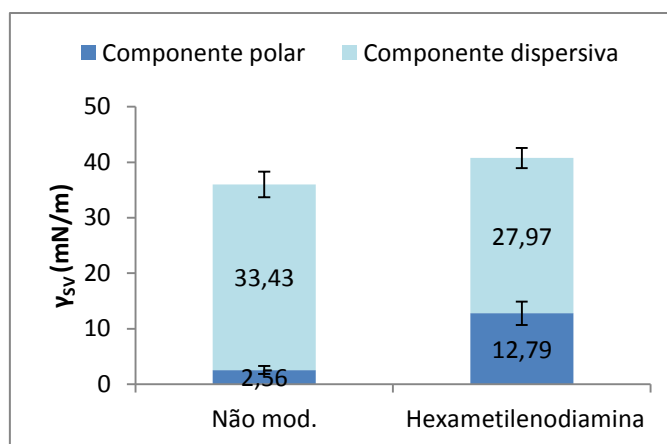


Gráfico 13: Representação gráfica das Energias de Superfície (componentes polar e dispersiva) para as membranas não modificadas e modificadas com hexametilenodiamina.

Pela análise do Gráfico 13, verifica-se um aumento da energia de superfície bem como da componente polar, quando a membrana é modificada com hexametilenodiamina. Este aumento sugere que os grupos amina (NH_2) se ligaram efectivamente à superfície. O seu carácter hidrofílico justifica este aumento da componente polar.

4.3.2. Hidrofilicidade ao longo do tempo

A hidrofilicidade destas membranas ao longo do tempo foi também avaliada através da determinação dos ângulos de contacto. Para isso, as membranas foram incubadas em água (H_2O), PBS e meio de cultura (MC). Inicialmente, as membranas apresentavam ângulos aproximados de 0. No entanto, logo após 4 horas de incubação o ângulo de contacto aumenta consideravelmente. Por questões relacionadas com a escala, o gráfico 14 começa apenas nas 4 horas. Assim, o ângulo aumenta de aproximadamente 0 para $71,5 \pm 1,6$ no caso do PBS, $71,8 \pm 1,1$ para a H_2O e $44,9 \pm 1,7$ para o MC. Os grupos NH_2 não se deveriam encontrar bem ligados, libertando-se para o meio quando as membranas foram incubadas, o que justifica o aumento do ângulo. A partir das 4 horas de incubação os ângulos mantiveram-se aproximadamente constantes, sendo que os das membranas imersas em meio de cultura são os mais baixos. Tal como já foi referido no capítulo anterior, é a composição do meio de cultura (proteínas com grupos amina e carboxílicos) que pode justificar o facto de neste meio os ângulos serem mais baixos.

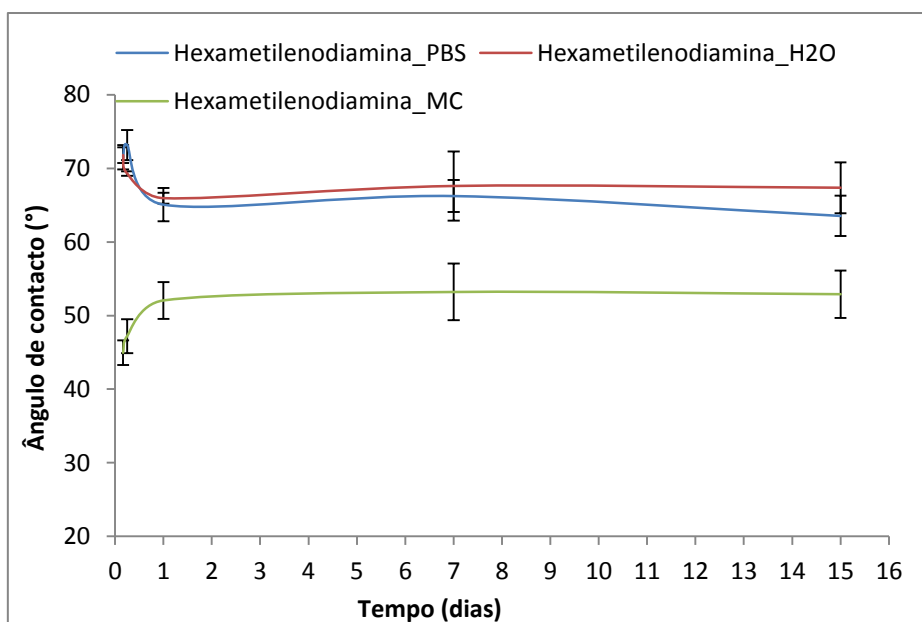


Gráfico 14: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas com hexametilenodiamina, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).

4.3.3. Avaliação por ATR-FTIR

A modificação química da poliuretana através da incubação em hexametilenodiamina teve como objectivo a introdução de grupos NH_2 na superfície, tal como já foi referido. Assim, foi feita uma avaliação através do ATR-FTIR de forma a verificar se os grupos NH_2 teriam sido ligados às membranas com sucesso.

Esta técnica de espectroscopia de infravermelhos permite a identificação de grupos químicos num determinado composto, uma vez que as ligações químicas vibram em valores de frequência característicos.

No Gráfico 15, é apresentado o espectro ATR-FTIR da poliuretana não modificada, da hexametilenodiamina e da poliuretana modificada com hexametilenodiamina.

Uma vez que a banda de absorvância dos grupos N-H se situa entre os 3500 e os 3300 cm^{-1} , a escala foi redimensionada, resultando no Gráfico 16. De facto, pela observação do Gráfico 16, verifica-se que na zona dos 3300 cm^{-1} , existe um pico para a hexametilenodiamina. Consequentemente, a membrana de poliuretana modificada, apresenta uma alteração nesta zona em relação à superfície não modificada, o que é um indicativo da ligação dos grupos NH_2 à superfície.

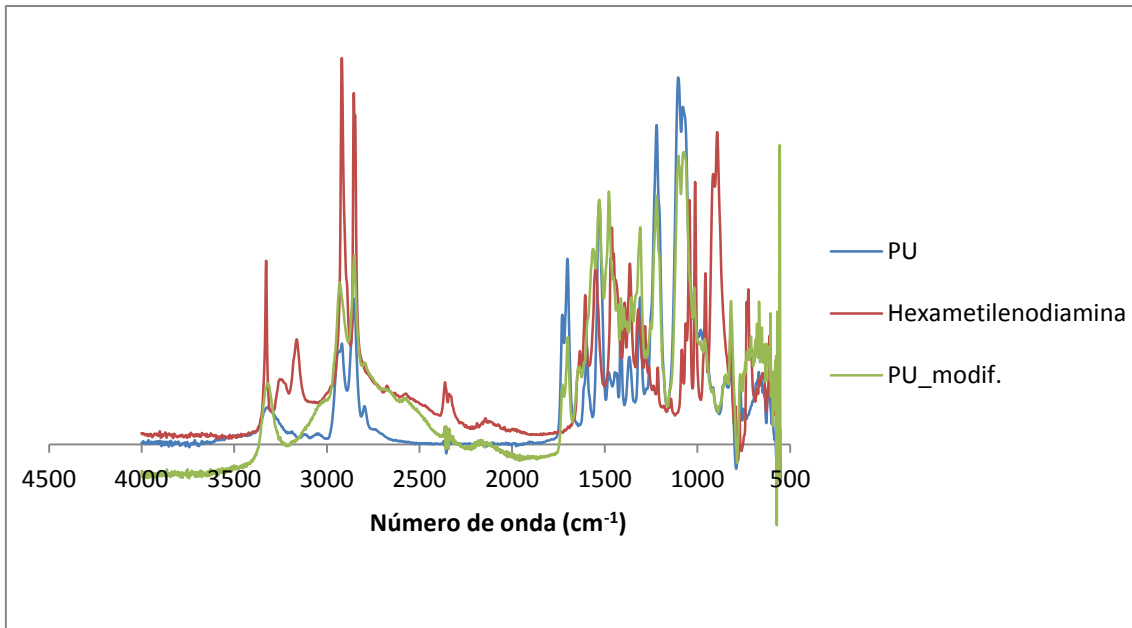


Gráfico 15: Espectro de ATR-FTIR obtido para as membranas não-modificadas, para as modificadas com hexametilenodiamina e para a hexametilenodiamina.

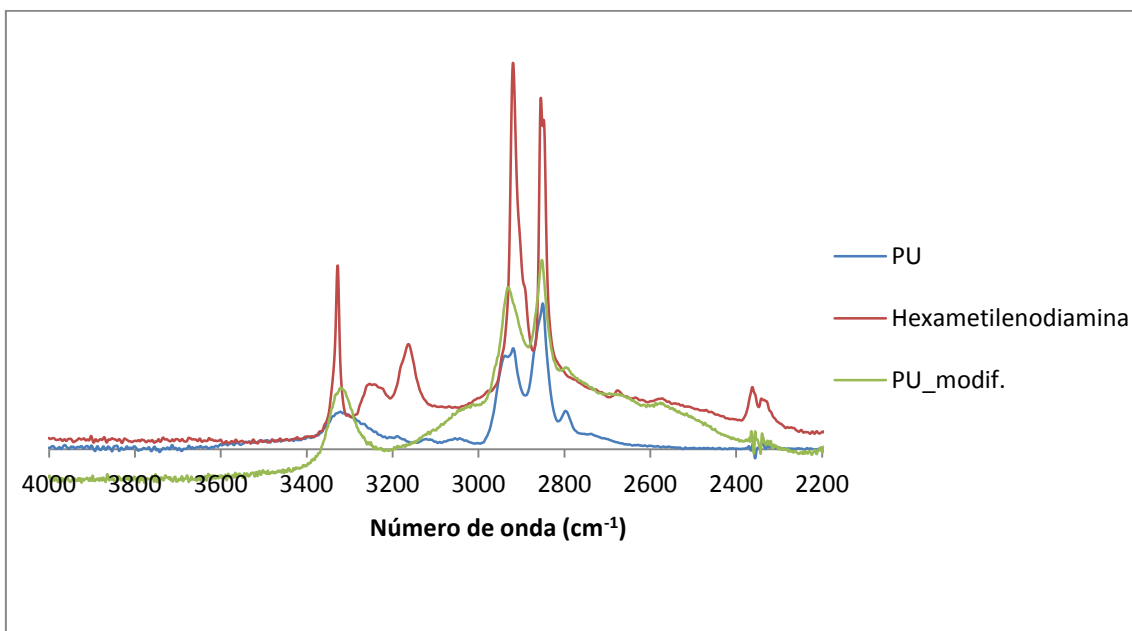


Gráfico 16: Espectro de ATR-FTIR redimensionado obtido para as membranas não-modificadas, para as modificadas com hexametilenodiamina e para a hexametilenodiamina.

4.3.4. Avaliação da capacidade de inchaço (*Swelling*)

A capacidade de inchaço das membranas foi avaliada em três soluções distintas: PBS, água destilada (H₂O) e meio de cultura (MC). Portanto, as membranas foram incubadas

nestas soluções, durante os tempos 1, 4, 6, 24, 48 e 168 horas e o seu peso foi medido para cada tempo.

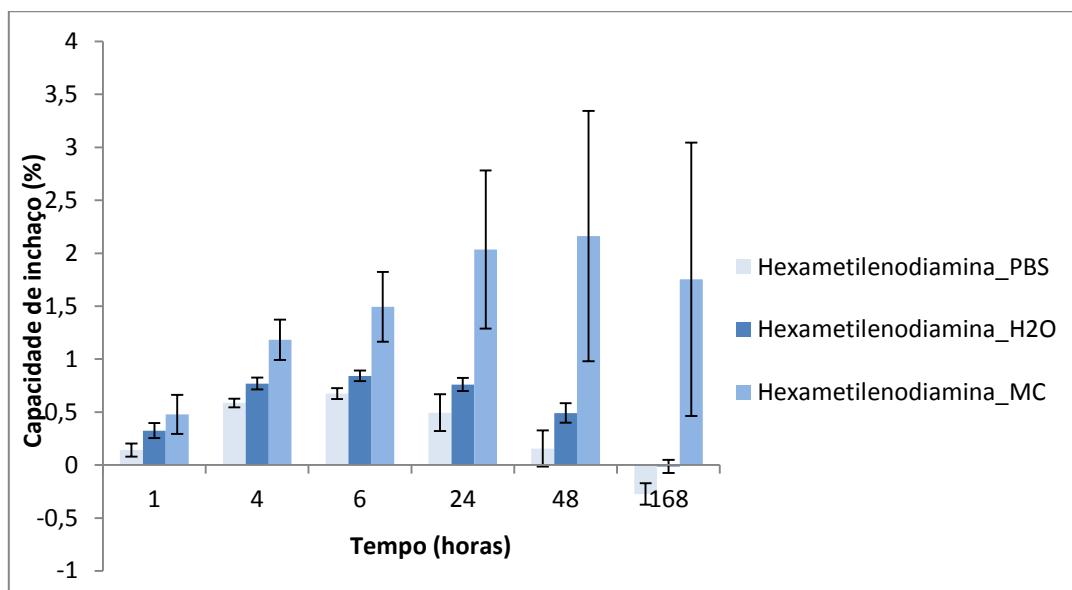


Gráfico 17: Capacidade de inchaço das membranas modificadas com hexametilendiamina, incubadas nos três meios (H₂O, PBS e MC).

No Gráfico 17 são apresentados os resultados da capacidade de inchaço das membranas modificadas com hexametilendiamina, quando incubadas nas diferentes soluções. A capacidade de inchaço é mais baixa no PBS, seguida da H₂O e finalmente do MC. Ao final de uma semana (168 horas), a capacidade de inchaço das membranas incubadas em PBS e H₂O é negativa, o que sugere a libertação total do monómero para o meio de incubação.

Excluindo a incubação em meio de cultura, a capacidade de inchaço destas membranas é sempre inferior a 1%, o que não é considerável.

Comparando com as membranas não modificadas (Gráficos 7, 8, 9, secção 3.2.3.) verifica-se que estas membranas modificadas com hexametilendiamina têm uma capacidade de inchaço inferior. Considerando que a modificação é apenas superficial, os resultados obtidos estão de acordo com o expectável.

4.3.5. Cultura de células

Através da Figura 27, verifica-se a adesão e proliferação celulares na presença do material modificado a partir do enxerto com hexametilendiamina, bem como no controlo negativo e nas membranas não modificadas.

A partir da Figura 22 (secção 3.2.4., capítulo 3), que apresenta os resultados para o teste MTS, verifica-se também que estas membranas apresentam viabilidade celular semelhante ao controlo negativo (K^-) e superiores ao controlo positivo (K^+), não afectando a integridade das células.

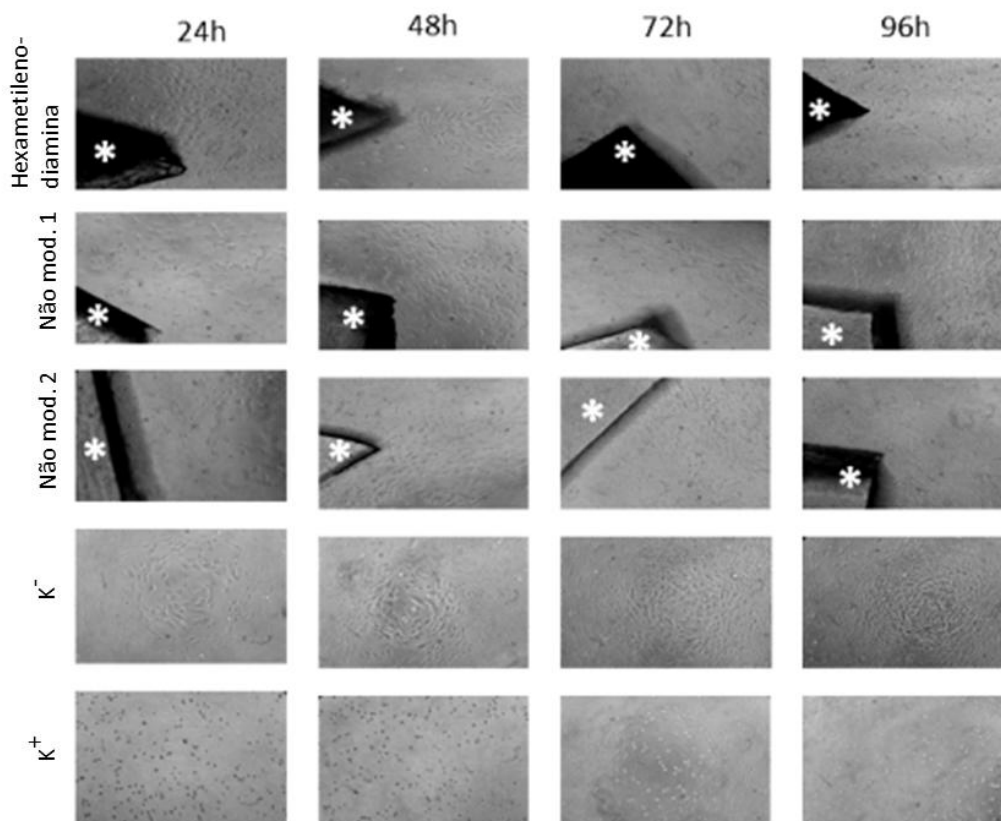


Figura 27: Fotografias microscópicas das células (fibroblastos humanos) na presença dos materiais modificados com hexametilendiamina, dos não modificados e dos controlos positivo (K^+) e negativo (K^-), para 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Os testes de actividade antibacteriana realizados (MIC, o teste da resazurina e o MBC) são apresentados nas Figuras 21, 22 e 23, na secção 3.2.3. do capítulo 3.

O teste MIC (Figura 21), revelou que estas membranas não apresentam actividade antibacteriana, uma vez que os poços que lhes correspondem apresentam turbidez. Estes resultados são comprovados pelo teste da resazurina (Figura 22), uma vez que não se verifica qualquer alteração de cor, tal como nas membranas não modificadas. No teste MBC (Figura 23), não se consegue observar a área de inibição do crescimento antibacteriano, o que está concordante com os testes anteriores.

4.3.6. Hemocompatibilidade

4.3.6.1. Avaliação da trombogénicidade

A avaliação da trombogénicidade foi efectuada através do peso dos coágulos formados na superfície das membranas quando em contacto com o sangue, durante 30 minutos. O vidro foi usado como controlo positivo, uma vez que é um material muito trombogénico e o índice de trombogénicidade foi determinado de acordo com a Equação 7, secção 2.4.5.1.

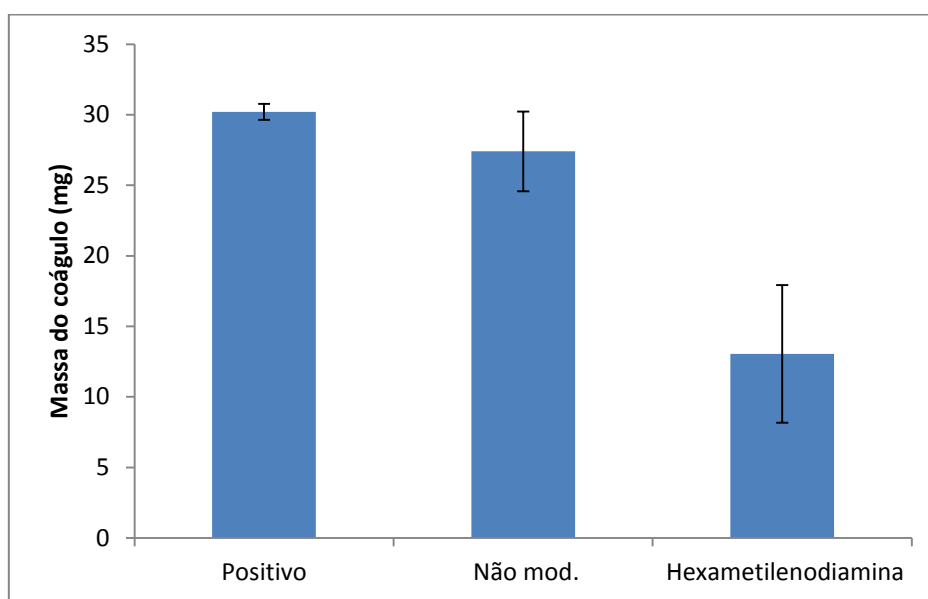


Gráfico 18: Representação gráfica dos valores médios dos coágulos formados após 30 minutos de contacto do sangue com as membranas não modificadas e modificadas por UV, bem como do controlo positivo.

Tabela 5: Valores obtidos para a percentagem de trombose dos materiais não modificados e dos modificados com hexametilendiamina, bem como do controlo positivo.

Membrana	% Trombogénicidade
Positivo	100
Não modificada	89,59
Hexametilendiamina	36,25

Após a ligação dos grupos amina, o índice de trombogénicidade da amostra diminuiu consideravelmente, como se pode verificar na Tabela 5. A massa do coágulo formada é

de apenas 13,05 mg enquanto a massa do coágulo da membrana não modificada é de 27,4 mg (Gráfico 18).

4.3.6.2. Avaliação do índice hemolítico

A avaliação do índice hemolítico foi elaborada com base no método da cianometahemoglobina modificado. Este teste mede a capacidade de um material provocar a ruptura dos eritrócitos quando em contacto com o sangue. Foram elaborados os testes por contacto directo e indirecto e o índice foi calculado com base na Equação 9, e classificados com base na Tabela 3, secção 2.4.5.2.

O controlo positivo corresponde ao sangue diluído em água, mas com a mesma concentração de hemoglobina (Hb), enquanto o controlo negativo corresponde ao sangue diluído em PBS sem amostra. (ver secção 2.4.5.2).

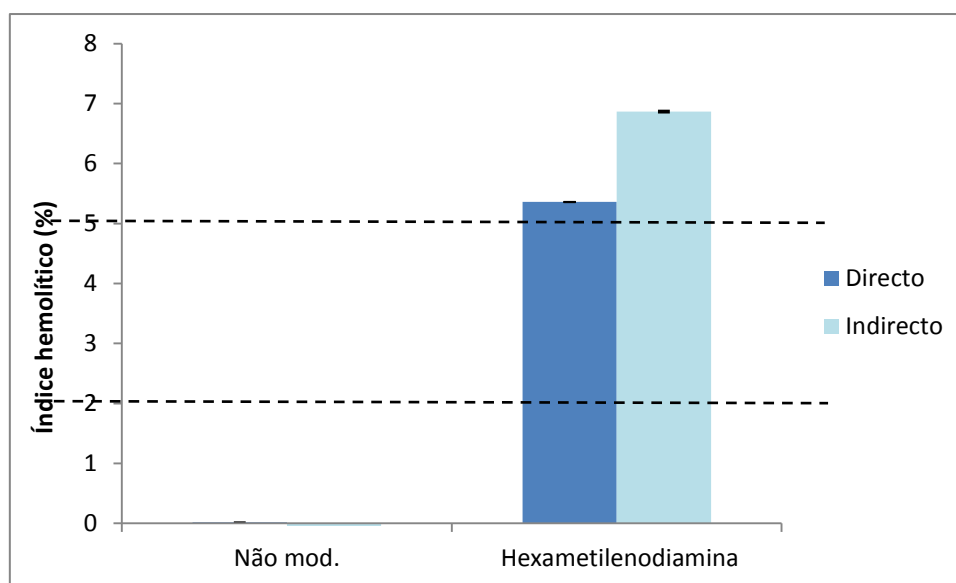


Gráfico 19: Representação gráfica do índice hemolítico das membranas não modificadas e das modificadas por UV, para os controlos directo e indirecto.

No Gráfico 19 observa-se que as membranas não modificadas apresentam um índice hemolítico de 0,02% no caso do contacto directo e 0% no caso do contacto indirecto. Quando se ligam os grupos amina verifica-se um grande aumento deste índice para ambos os contactos. No caso do contacto directo as amostras apresentam um índice

de 5,36 % e no caso do contacto indirecto apresentam um índice de 6,87%. Assim, as membranas são consideradas hemolíticas, contrariando o desejável. Como o contacto indirecto apresenta um valor superior, pode significar que os excessos de monómero foram libertados na solução de incubação (PBS).

4.4. Conclusão

As membranas de poliuretana foram modificadas quimicamente com hexametilendiamina de forma a ligar grupos amina (NH_2) na superfície.

A análise efectuada pelos ângulos de contacto e energias de superfície demonstra uma diminuição significativa do ângulo de contacto, bem como um aumento da energia de superfície e da componente polar. A análise ATR-FTIR permite confirmar a presença dos grupos na superfície do material.

No entanto, quando as membranas foram incubadas em diferentes soluções (água destilada, PBS e meio de cultura) para avaliar quer a hidrofiliabilidade ao longo do tempo quer a capacidade de inchaço, verificou-se um aumento significativo dos ângulos de contacto. Isto permite concluir que os grupos não estariam bem ligados à superfície, ou então ligados por ligações muito fracas e fáceis de quebrar. Além disso, os grupos amina também poderiam estar em excesso na superfície. Isto porque, o aumento acentuado do ângulo de contacto ao final de 4 horas para as membranas incubadas, permite concluir que os grupos amina se libertaram para os respectivos meios.

Quando avaliado o contacto destas membranas com fibroblastos humanos, verificou-se que estas membranas permitem a adesão e a proliferação celulares. Além disso, também foi possível concluir que estas membranas não têm um efeito antibacteriano, sendo esta uma característica indesejável.

Para finalizar, da avaliação da hemocompatibilidade, concluiu-se que estas membranas são muito menos trombogénicas que as membranas não modificadas, o que é um resultado positivo. Por outro lado, as membranas demonstraram ser hemolíticas, quer por contacto directo quer por indirecto. Como o índice de hemólise é superior no contacto indirecto, pode concluir-se que foram libertados grupos amina para o PBS, ou

por estarem em excesso ou por estarem mal ligados, o que está de acordo com os resultados anteriores.

Deste modo, talvez alterando o processo de lavagem das membranas após a incubação em hexametilendiamina, se consigam melhores resultados para esta modificação.

Capítulo 5

Modificação por Plasma

5.1. Técnica de modificação

O Plasma é uma mistura de electrões, partículas carregadas positiva e negativamente, átomos neutros e moléculas, portanto, um gás ionizado. É considerado um estado da matéria, e como é necessária mais energia para o activar, comparativamente aos estados sólido, líquido e gasoso, é frequentemente denominado de quarto estado da matéria. [78]

À medida que a temperatura aumenta, as moléculas vão-se tornando mais energéticas e vão mudando de estado, como está representado na Figura 28.

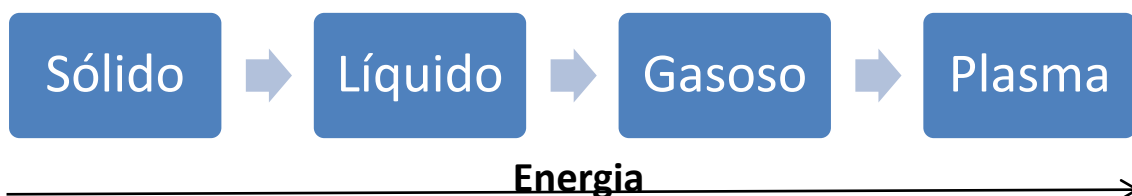


Figura 28: Esquema representativo dos estados da matéria.

O Plasma existe quer na natureza quer no laboratório. O sol, os ventos solares e os relâmpagos são exemplos de plasmas naturais. É uma técnica amiga do ambiente e fácil de implementar. Além disso, permite à partida uma esterilização do material, importante para aplicações biomédicas. [79] [80] [46]

A escolha de um polímero para diferentes aplicações biomédicas depende das suas propriedades de superfície. Esta tecnologia é muito utilizada para alterar essas propriedades dos polímeros sem alterar as suas propriedades de massa. Por exemplo, com o Plasma podem alterar-se propriedades como a estrutura química, a rugosidade, a condutividade e a hidrofobicidade de acordo com a aplicação pretendida.

A molhabilidade, a oxidação da superfície bem como o crescimento e adesão celulares podem ser melhorados com este tratamento. Assim pode ser melhorada a biocompatibilidade do material bem como as suas propriedades de adesão. O Plasma é também utilizado para limpar as superfícies de contaminação orgânica, modificação química da superfície, *cross-linking* e *micro-etching*. [43] [80]

Inicialmente, para atingir o estado de Plasma, a energia para a ionização dos átomos e moléculas é obtida a partir de uma fonte externa. A energia pode ser gerada por campos eléctricos, magnéticos, combustão ou reacções nucleares.

Uma vez que este estado não se mantém à pressão atmosférica, além da fonte de energia são necessários um sistema de vácuo para manter o estado de Plasma e uma câmara onde ocorre a reacção. Assim, o Plasma tem energia suficiente para quebrar as ligações covalentes do polímero exposto. [43] [78]

As diferentes espécies do Plasma podem interagir com as superfícies de variadas formas, resumindo-se a:

- **Activação:** gera radicais livres à superfície. A energia do Plasma quebra ligações dos átomos da superfície, tornando possível a ligação destes a outras moléculas.

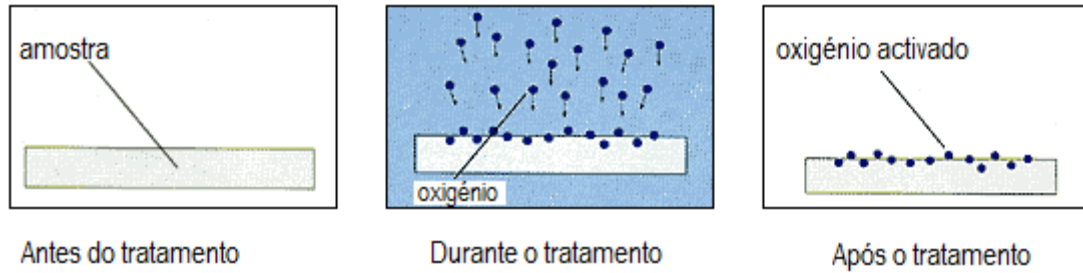


Figura 29: Esquema representativo do processo de activação. [81]

- **Etching:** remoção química ou física de partes da superfície. Os átomos, moléculas e iões que entram em contacto com a superfície podem remover parte desta, aumentando a área da superfície.

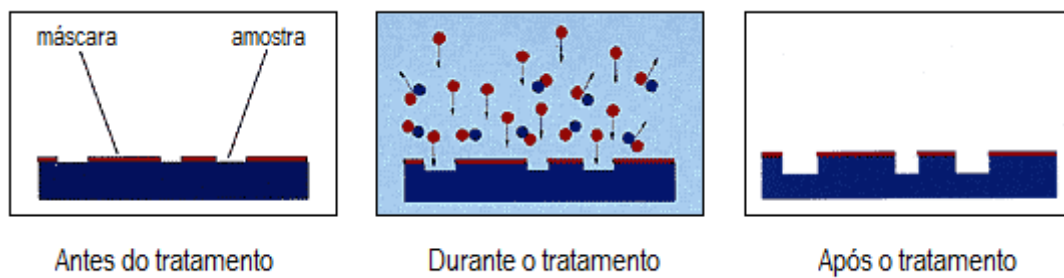


Figura 30: Esquema representativo do processo de Etching. [81]

- **Deposição:** consiste na deposição de uma camada fina na superfície. Esta camada surge após a reacção de moléculas livres com a fase Plasma.

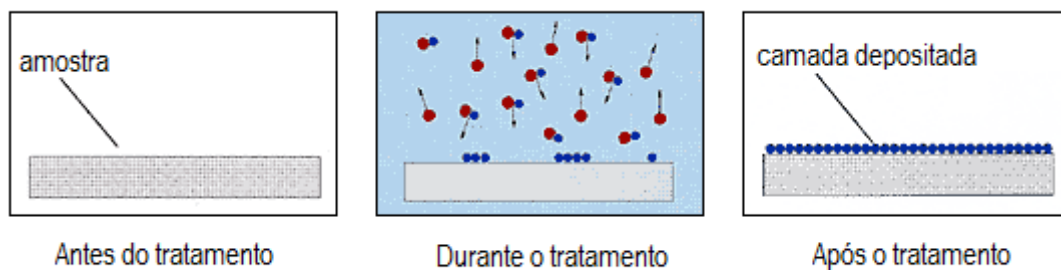


Figura 31: Esquema representativo do processo de deposição. [81]

- **Enxerto:** ocorre a inserção de grupos químicos na superfície. Quando se enxertam grupos polares, o processo aumenta a adesão da superfície. [76]

Os dois primeiros podem agrupar-se na categoria da modificação superficial por Plasma e assim consideram-se três categorias: modificação superficial por Plasma, deposição ou polimerização por Plasma e enxerto por Plasma. [43]

5.1.1. Modificação da superfície por Plasma

Quando o Plasma entra em contacto com a superfície, produz modificações químicas ou físicas, produzindo sítios activos ou mudanças nas ligações e pesos moleculares. Esta activação da superfície ocorre na presença de gases como o Oxigénio (O_2), Azoto (N_2), Amónia (NH_3) (reactivos) e gases inertes tais como o Árgon (Ar) e o Hélio (He).

Os gases inertes modificam a superfície através da rugosidade, *cross-linking*, ou da cisão e ramificação das cadeias. Os gases reactivos, além das modificações semelhantes às dos gases inertes, introduzem grupos funcionais na superfície. [29] [82] Gases como o O_2 e o N_2 permitem a formação de grupos hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amino e amido na superfície do polímero. [78]

5.1.2. Modificação por deposição/polimerização

Através deste processo é produzida uma camada fina à superfície com características químicas e físicas próprias.

Este processo ocorre na presença de gases orgânicos. Os radicais formados iniciam o processo de polimerização e o monómero está normalmente misturado com o gás. À medida que o peso molecular do polímero aumenta, este deposita-se na amostra. [25]

5.1.3. Modificação por enxerto

Este método de modificação por plasma pode dividir-se em dois pontos diferentes que são a incorporação de grupos funcionais e a formação de grupos reactivos. Os radicais

livres são formados usando um gás inerte seguindo-se a introdução de um monómero na câmara de reacção, permitindo a reacção deste com os radicais livres. [43]

Nesta parte do trabalho experimental, o objectivo foi avaliar a influência dos gases Ar e O₂ na hidrofiliabilidade das membranas de *Elastollan 1180A50*[®].

O resultado final da modificação depende de parâmetros tais como a potência da fonte, o tempo do tratamento, a pressão do gás bem como do próprio gás, que foram apropriadamente testados. [83]

5.2. Procedimento experimental

Após as membranas estarem preparadas (secção 2.3.), foram modificadas por Plasma, usando um aparelho FEMTO da Diener Electronics.

Foram testados dois gases diferentes (Árgon e Oxigénio), a pressão na câmara (de 0,4 até 2mbar) e o tempo de irradiação (de 0,5 a 4 minutos) para uma potência de 100W.



Figura 32: Imagem da técnica de modificação das membranas por Plasma.

5.3. Resultados e Discussão

O processo de obtenção dos melhores parâmetros foi um processo moroso, uma vez que foram muitas as combinações de parâmetros a ser testadas. Além disso, diferentes membranas foram testadas para cada parâmetro. Esta avaliação recorreu apenas à caracterização pela técnica dos ângulos de contacto de forma a encontrar os valores mais baixos.

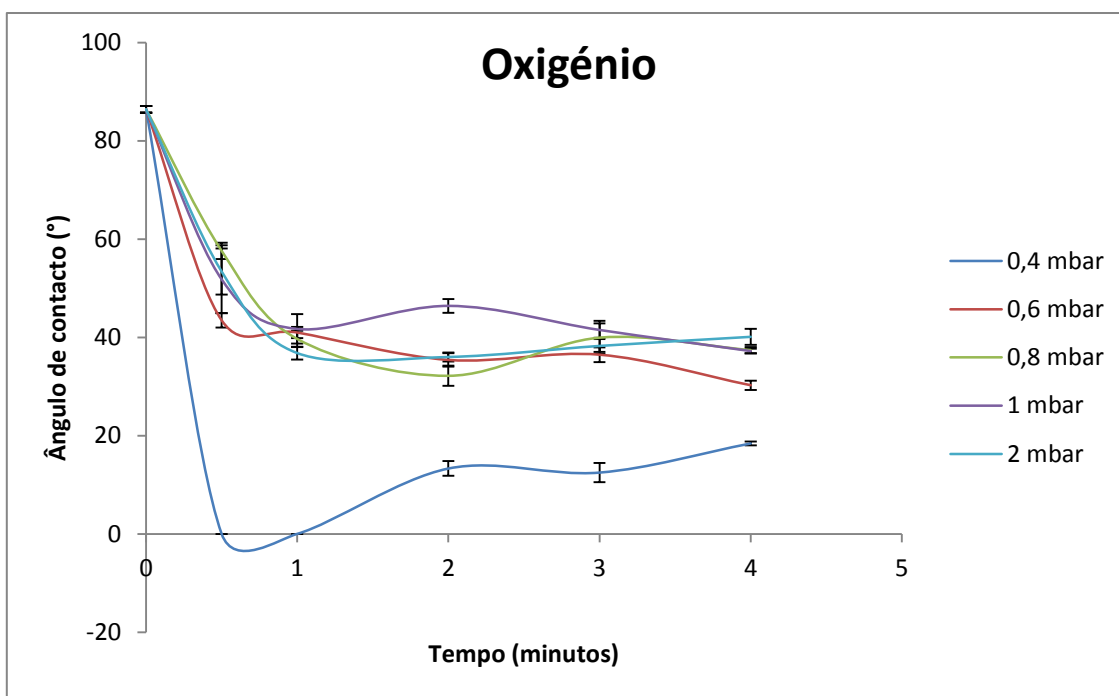


Gráfico 20: Valores dos ângulos de contacto obtidos para a modificação por Plasma com Oxigénio a pressão contante ao longo do tempo.

O Gráfico 20 apresenta os ângulos de contacto determinados para cada pressão, variando apenas o tempo de modificação, uma vez que a potência da câmara se manteve sempre nos 100 W, para o Oxigénio. Ao tempo 0 corresponde o valor do ângulo de contacto da membrana não modificada com um valor de $86,4 \pm 0,7$. Verifica-se que existe uma clara diferença entre a pressão de 0,4 mbar e todas as outras. As medições para esta pressão mostraram-se muito irregulares, sendo que nem foi possível obter resultados para os tempos 0,5 e 1 minuto pois a gota espalhava-se totalmente na superfície. Observando o Gráfico 20 verifica-se também que o ângulo de contacto decresce para todas as pressões. A partir de 1 minuto, os valores não sofrem alterações significativas, com a excepção da pressão 0,4 mbar que demonstra uma recuperação do ângulo. Em geral, pressões mais altas na câmara correspondem a ângulos de contacto superiores.

O Gráfico 21 apresenta as variações dos ângulos de contacto, quando as membranas são modificadas com Árgon, para diferentes tempo e pressão. A potência na câmara manteve-se constante.

À excepção das pressões 1 e 2 mbar, o ângulo de contacto diminui ao final de 0,5 minutos. O menor ângulo obtido ocorre para a pressão de 0,6 mbar aos 3 minutos, e

tem o valor $23,6 \pm 1,4$. Ao tempo 0, corresponde o valor do ângulo de contacto das membranas não modificadas ($86,4 \pm 0,7$).

Verifica-se também que com um aumento da pressão na câmara, aumenta o valor do ângulo de contacto, embora existam algumas variações.

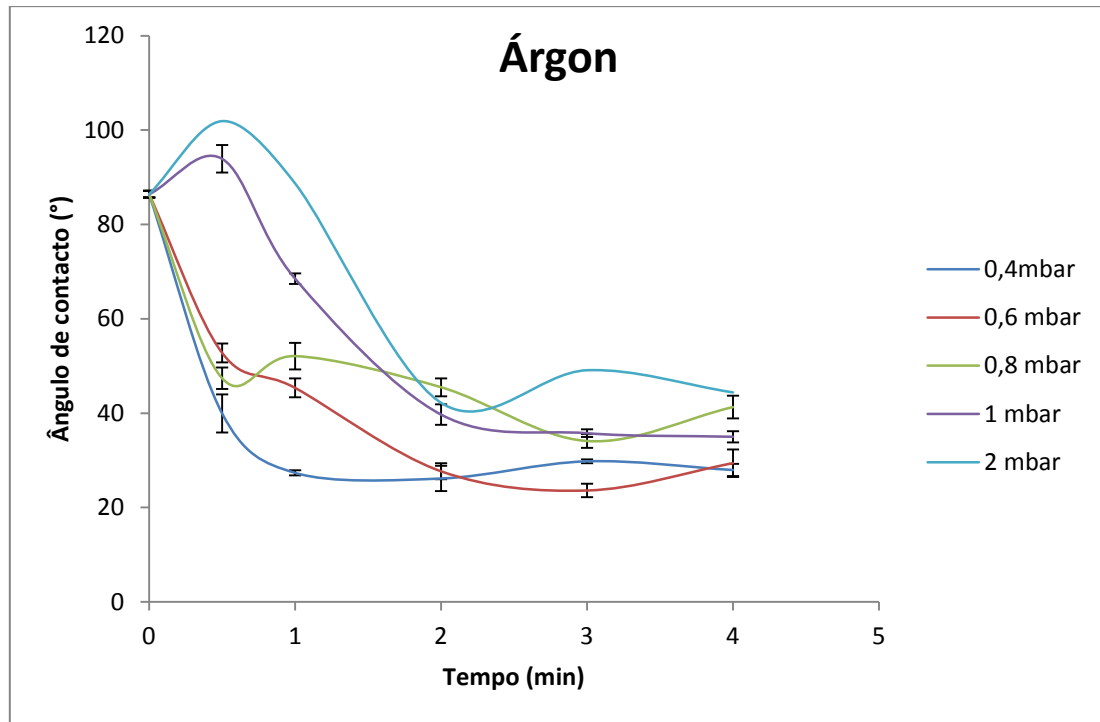


Gráfico 21: Valores dos ângulos de contacto obtidos para a modificação por Plasma com Árgon a pressão contante ao longo do tempo.

De forma a poder comparar a performance dos dois gases, e considerando a pesquisa bibliográfica de estudos já efectuados, escolheu-se o tempo 3 minutos e a pressão 0,6 mbar, que são os melhores parâmetros obtidos quando se usa o gás Árgon. Analisando os gráficos 22 e 23, verifica-se que o valor mais baixo obtido corresponde à modificação com Oxigénio para o tempo 3 minutos e pressão 0,4 mbar, com o valor $12,5 \pm 1,9$. No caso do Árgon, o valor mais baixo acontece nos 3 minutos e pressão 0,6 mbar ($23,6 \pm 1,4$). Assim, a hidrofiliabilidade foi aumentada em ambos os casos. Os dois gases podem alterar a superfície de forma diferente. No caso do Oxigénio, induz-se a formação de grupos C=O, OH e OOH na superfície. Já o Árgon apenas provoca a activação da superfície através da formação de radicais. Quando a superfície activada reage com o Oxigénio presente no ar, formam-se grupos OH na superfície. [25]

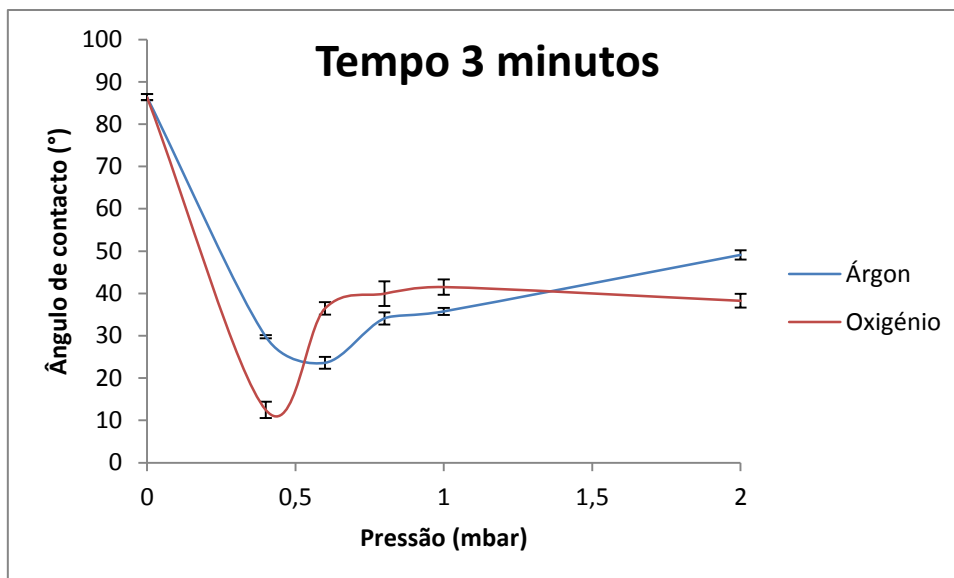


Gráfico 22: Valores dos ângulos de contacto obtidos para as modificações com os dois gases (Oxigénio e Árgon), para o tempo constante de 3 minutos e pressão variável.

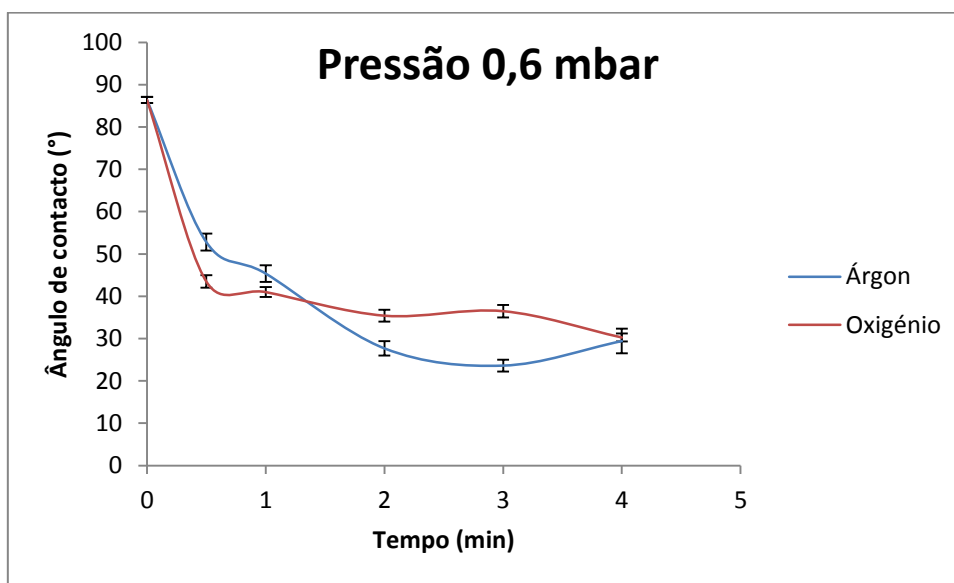


Gráfico 23: Valores dos ângulos de contacto obtidos para as modificações com os dois gases (Oxigénio e Árgon), para pressão constante de 0,6 mbar e tempo variável.

No Anexo B encontra-se uma tabela com os resultados médios determinados de todas estas medições.

5.4. Conclusão

A superfície do *Elastollan 1180A50*[®] foi modificada por Plasma. Para os dois gases usados, houve uma diminuição dos ângulos de contacto, o que conseqüentemente provoca um aumento da hidroflicidade. Os ângulos de contacto mais baixos foram obtidos para o Oxigénio, 0,4 mbar e 3 minutos. No entanto, considerando as já referidas dificuldades na determinação dos ângulos de contacto para as modificações com Oxigénio bem como a sua irregularidade, escolheu-se modificar as superfícies com o gás Árgon. Assim, tendo em conta o menor valor obtido para a modificação com este gás, definiram-se como parâmetros ideais para prosseguir os estudos, os seguintes:

- Potência: 100W;
- Gás: Árgon;
- Pressão: 0,6 mbar;
- Tempo: 3 minutos.

Capítulo 6

Modificação por Plasma com enxerto de HEMA e MAA

6.1. Técnica de modificação

À semelhança do capítulo anterior, as membranas de *Elastollan 1180A50*[®] foram modificadas por Plasma. No entanto, neste caso, após a modificação por Plasma, que permitiu a criação de radicais à superfície, foram enxertados dois monómeros diferentes: ácido metacrílico (MAA) e metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), uma vez que contêm diferentes grupos funcionais, de forma a manter as propriedades da modificação durante mais tempo.

Nesta parte do trabalho experimental, apenas se consideraram as membranas modificadas com o gás Árgon, durante 3 minutos e pressão de 0,6 mbar, uma vez que foram os melhores parâmetros encontrados anteriormente. Neste caso, a quebra das ligações duplas dos monómeros é provocada pela temperatura, permitindo o início da reacção de enxerto. Assim, a reacção ocorre da forma esquematizada na Figura 33.

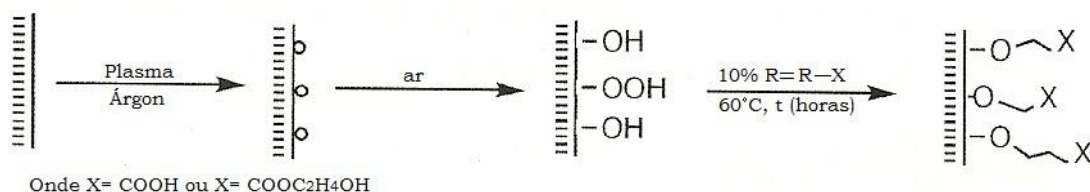


Figura 33: Representação esquemática da modificação por Plasma (Adaptada de [25]).

6.2. Procedimento experimental

As membranas foram inicialmente modificadas por Plasma. Foi utilizado o Árgon como gás, durante 3 minutos a pressão de 0,6 mbar e potência de 100W.

De seguida, as membranas foram removidas da câmara de Plasma, expostas ao ar e foram imersas em soluções 10% (m/v) de HEMA e MAA a uma temperatura de 60°C durante diferentes tempos (0,5; 1; 2; 4; 8 e 24 horas). Finalmente, as membranas foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície

No Gráfico 24 são apresentados os valores dos ângulos de contacto para os diferentes tempos avaliados. Portanto, para o caso do HEMA, o menor valor obtido foi $60,8 \pm 1,7$, ao final de uma hora. Em relação ao MAA, obteve-se passadas 8h o menor valor que é $68,4 \pm 2,0$. Estes resultados sugerem que para este monómero é necessário mais tempo para que ocorra a reticulação. Ao tempo 0, corresponde o valor dos ângulos das membranas não modificadas ($86,4 \pm 0,7$).

Deste modo, as restantes técnicas de caracterização foram apenas realizadas para as duas modificações elaboradas nestes tempos.

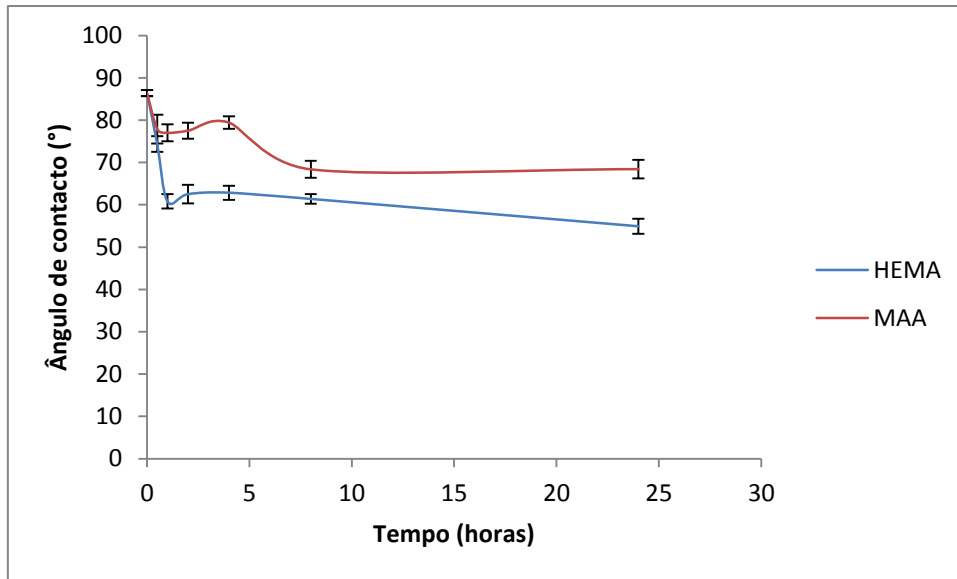


Gráfico 24: Ângulo de contacto obtido para os diferentes tempos de enxerto, para os dois monómeros (HEMA e MAA) após a activação por Plasma.

As energias de superfície das membranas modificadas foram calculadas a partir dos ângulos de contacto determinados com os líquidos: água, formamida, diiodometano e etilenoglicol. O método aplicado para a sua determinação foi o OWRK.

Ao analisar o Gráfico 25, verifica-se um aumento das energias de superfície, bem como da componente polar para ambas as modificações. Este aumento deve-se à introdução de grupos funcionais na superfície (COOH e OH). Pode também verificar-se que o aumento é mais acentuado no caso do enxerto com o monómero HEMA.

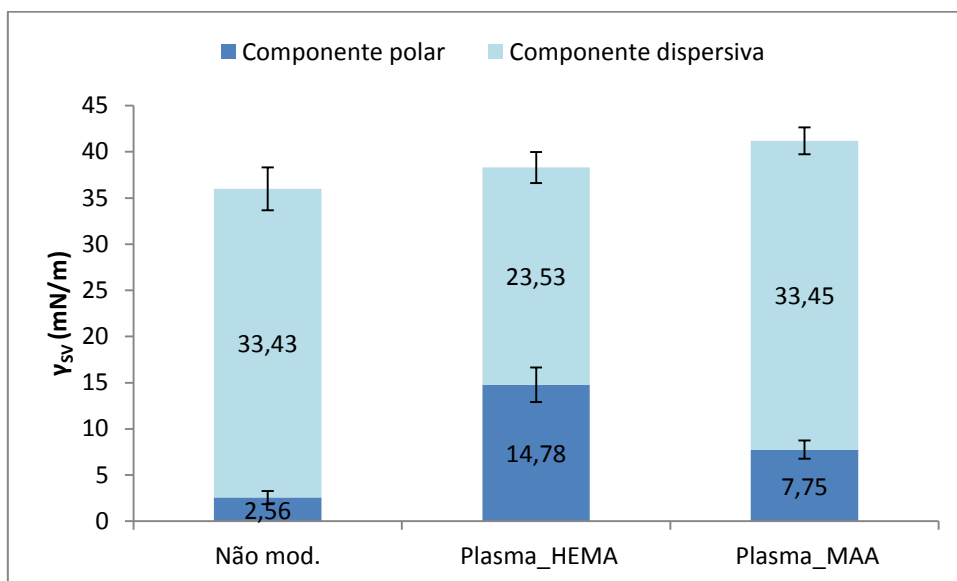


Gráfico 25: Energia de superfície representada pelas componentes polar e dispersiva, quer para as membranas não modificadas, quer para as modificadas por Plasma.

6.3.2. Hidrofilicidade ao longo do tempo

O comportamento dos ângulos de contacto das membranas ao longo do tempo foi avaliado com o objectivo de verificar se as membranas recuperam a sua hidrofobicidade. Inicialmente, os ângulos foram determinados ao final dos tempos 1, 2, 7 e 15 dias, com as membranas expostas ao ar.

Depois, foi também avaliada a evolução do ângulo de contacto destas membranas quando incubadas nos meios PBS, água destilada (H₂O) e meio de cultura (MC) durante os tempos 4, 6, 24 horas e 7, 15 dias.

Para a membrana não modificada, quando exposta ao ar, o ângulo mantém-se sempre em valores muito próximos ao longo do tempo, como já foi referido na secção 3.2.2. do capítulo 3.

Além destas membranas, o gráfico 26 também apresenta os resultados das membranas modificadas com Plasma_HEMA e Plasma_MAA, expostas ao ar.

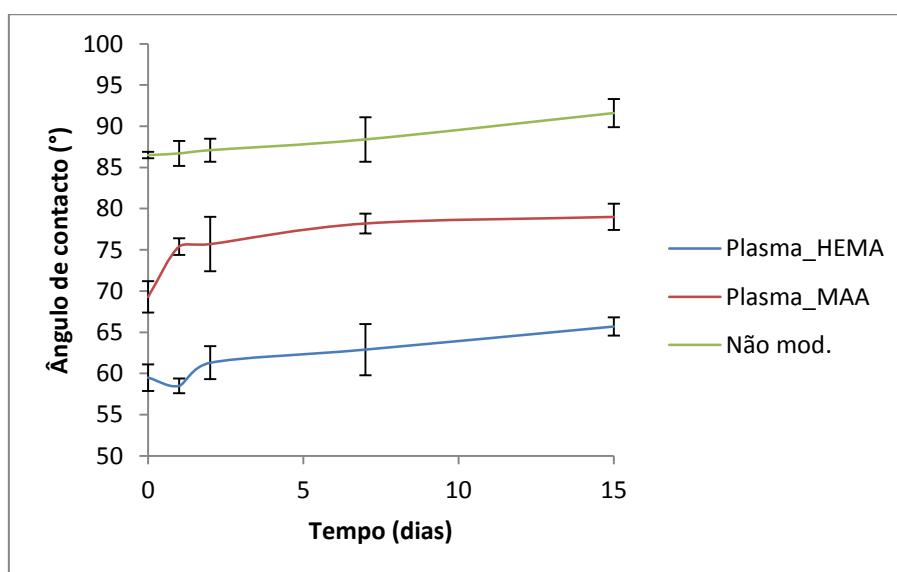


Gráfico 26: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas por Plasma e não-modificadas, expostas ao ar.

Para ambas as modificações (Plasma_HEMA e Plasma_MAA) verifica-se um aumento do ângulo de contacto ao longo do tempo. No caso do Plasma_HEMA, o ângulo inicial tem o valor de $59,5 \pm 1,6$. Apesar do decréscimo mínimo nos dois dias ($58,5 \pm 0,9$), o ângulo vai aumentando ligeiramente até atingir o valor de $65,7 \pm 1,1$ ao fim de 15 dias. Quanto ao Plasma_MAA, o ângulo no início é de $69,3 \pm 1,9$, aumentando logo ao final

de um dia para $75,4 \pm 1,0$. A partir daí, o valor do ângulo mantém-se aproximadamente constante, atingindo o valor de $79 \pm 1,6$ ao final dos 15 dias. Verifica-se então uma ligeira recuperação da hidrofobicidade das membranas. Possivelmente, esta recuperação deve-se aos contaminantes do ar que reagem com a superfície ou a rearranjos dos grupos desta.

Os gráficos 27 e 28 apresentam os resultados relativos às membranas modificadas com Plasma_HEMA e Plasma_MAA, respectivamente, nos diferentes meios de incubação.

Para o Plasma_HEMA, os ângulos são mais baixos quando as membranas são incubadas em MC, seguido da H_2O e finalmente do PBS. Para os três meios, o ângulo decresce logo ao final de 4 horas para $67,6 \pm 2,7$ no caso do PBS, $67,3 \pm 2,7$ para a H_2O e $62,3 \pm 2,9$ para o meio de cultura, mantendo-se aproximadamente constante ao longo do tempo a partir daí, apesar de existir uma ligeira diminuição. Apenas na incubação com PBS ocorre um aumento do ângulo ao final de 7 dias.

Para as membranas modificadas por Plasma_MAA, embora os ângulos mais baixos sejam obtidos com a incubação em MC, o comportamento das membranas incubadas nos outros dois meios (PBS e H_2O) é diferente das membranas modificadas por Plasma_HEMA.

Quando incubadas em MC, o ângulo decresce de $70,1 \pm 2,5$ para $40,3 \pm 5$ logo ao final de 4 horas, mantendo-se depois aproximadamente constante ao longo do tempo. Para a incubação em H_2O , o ângulo de contacto diminui, atingindo o mínimo ao final de um dia ($57 \pm 2,2$). No entanto, começa a recuperar lentamente até ter o valor de $64,0 \pm 2,7$ ao final de 15 dias, tornando-se superior ao PBS. Finalmente, para a incubação em PBS, há uma diminuição do ângulo de contacto logo ao final de 4h para $57,4 \pm 2,5$, aumentando ao final de um dia para $63,8 \pm 3,0$, mantendo-se aproximadamente constante até aos 15 dias.

Mais uma vez, os ângulos de contacto são mais baixos quando as membranas estão incubadas no meio de cultura, o que sugere que a sua constituição influencia estes resultados. As proteínas que o constituem possuem grupos amina e carboxílicos que podem interagir com a superfície tornando-a mais hidrofílica.

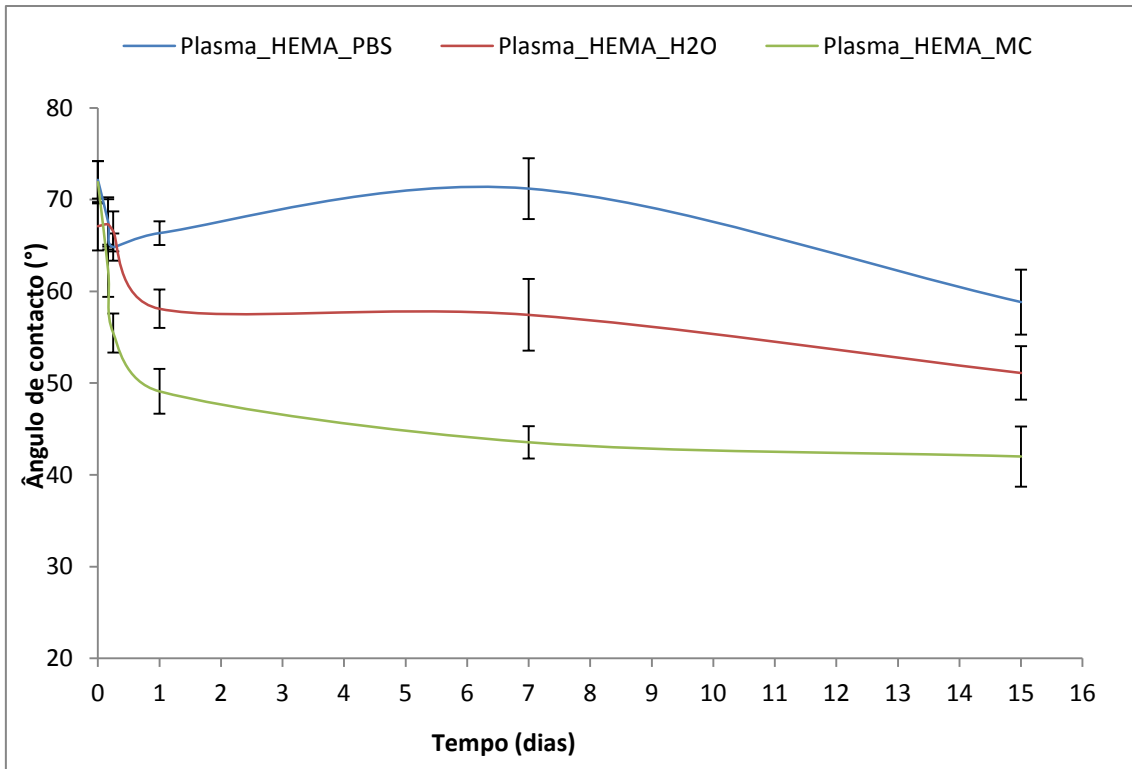


Gráfico 27: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas com Plasma_HEMA, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).

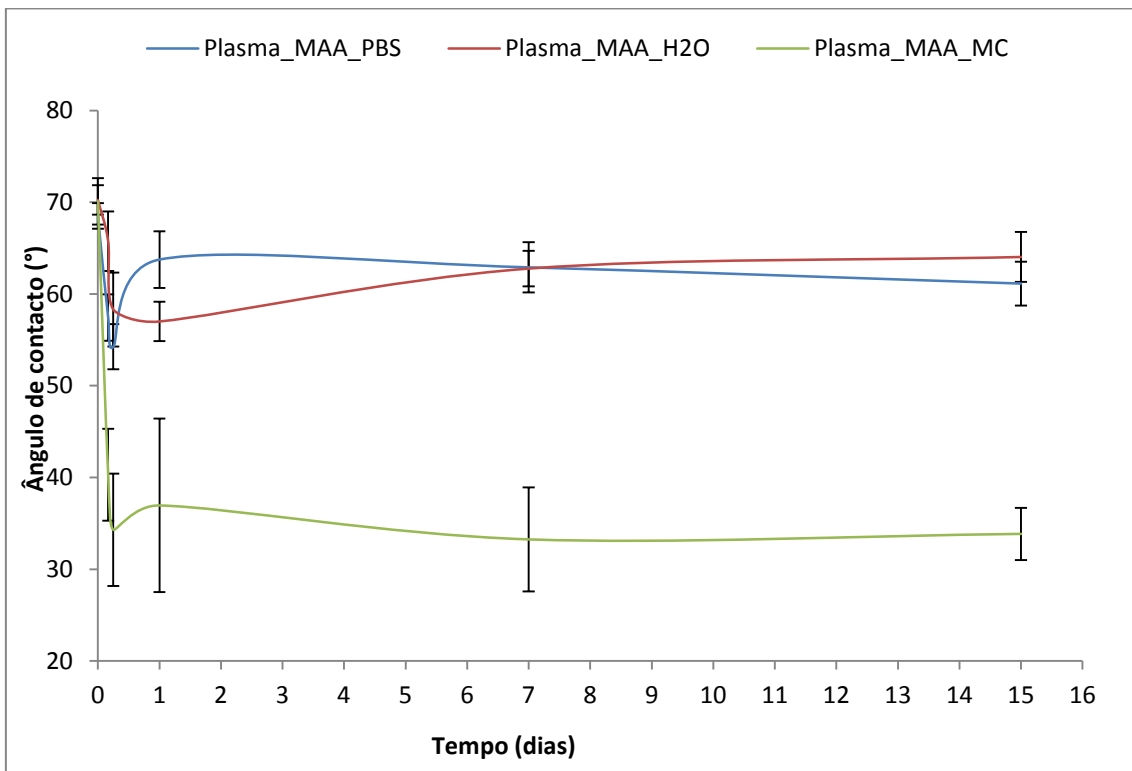


Gráfico 28: Ângulo de contacto ao longo do tempo para as membranas modificadas com Plasma_MAA, incubadas em PBS, H2O e meio de cultura (MC).

6.3.3. Avaliação da capacidade de inchaço (*Swelling*)

A capacidade de inchaço das membranas foi avaliada em três soluções distintas: PBS, água destilada (H₂O) e meio de cultura (MC). Portanto, as membranas foram incubadas nestas soluções, durante os tempos 1, 4, 6, 24, 48 e 168 horas e o seu peso foi medido para cada tempo.

Nos gráficos 29 e 30 são apresentados os resultados da capacidade de inchaço das membranas modificadas por Plasma, seguido do enxerto de HEMA e MAA, quando incubadas nas diferentes soluções, respectivamente.

Quando se enxerta HEMA nas membranas, estas incham, embora pouco, em todas as soluções, até ao tempo de 6 horas. A capacidade de inchaço é superior para o PBS, seguida do meio de cultura e finalmente da água destilada. Ao fim de 24 horas, a capacidade de inchaço é negativa, o que se pode dever à libertação do monómero enxertado para os meios de incubação.

Quando se enxerta MAA, ocorre exactamente o mesmo no que se refere a capacidades de inchaço positivas até 6 horas e negativas a partir de 24 horas. Neste caso, o meio que permite um maior inchaço das membranas é o meio de cultura.

No entanto, para ambos os casos, a capacidade de inchaço destas membranas é sempre inferior a 1%, o que não é significativo. Este resultado é expectável uma vez que a modificação é apenas superficial.

Comparando com as membranas não modificadas (gráficos 7, 8, 9, secção 3.2.3.) verifica-se que estas membranas têm uma capacidade de inchaço inferior.

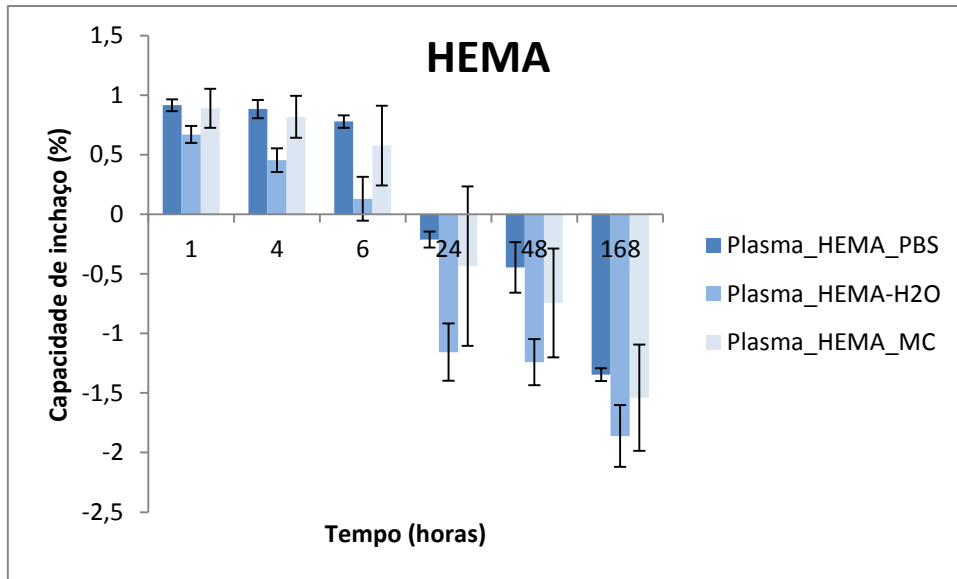


Gráfico 29: Capacidade de inchaço das membranas modificadas por Plasma_HEMA, incubadas nos três meios (H2O, PBS e MC).

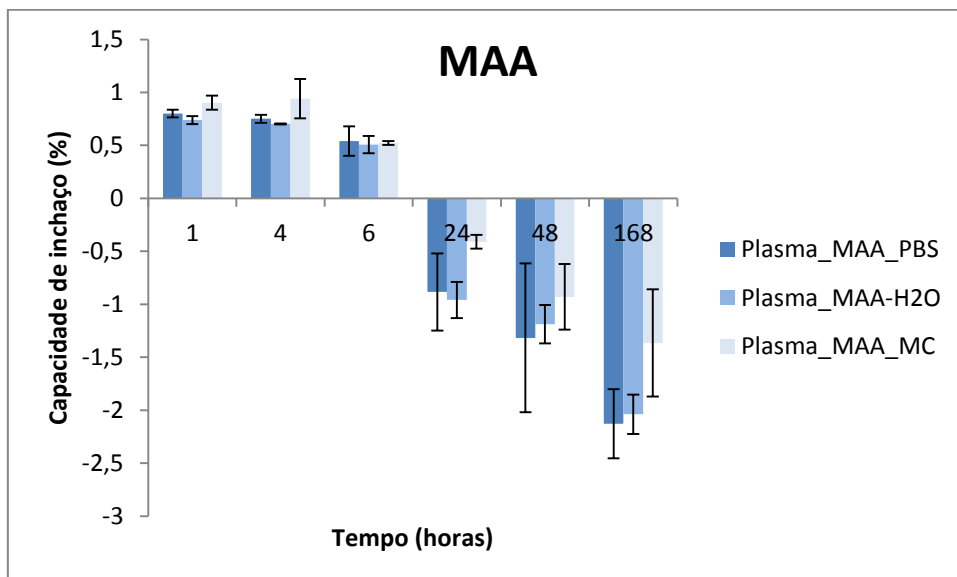


Gráfico 30: Capacidade de inchaço das membranas modificadas por Plasma_MAA, incubadas nos três meios (H2O, PBS e MC).

6.3.4. Cultura de células

Os estudos de adesão e proliferação celular foram realizados *in vitro* com fibroblastos humanos. A avaliação destes parâmetros foi feita através de imagens de microscópio óptico invertido e através do teste MTS.

A Figura 34 apresenta os resultados das membranas modificadas com Plasma seguida do enxerto de HEMA e MAA, bem como das membranas não modificadas e dos controlos positivo e negativo. Pode observar-se então que as células aderiram e

proliferaram em contacto com ambos os materiais modificados, tal como nos não-modificados e no controlo negativo.

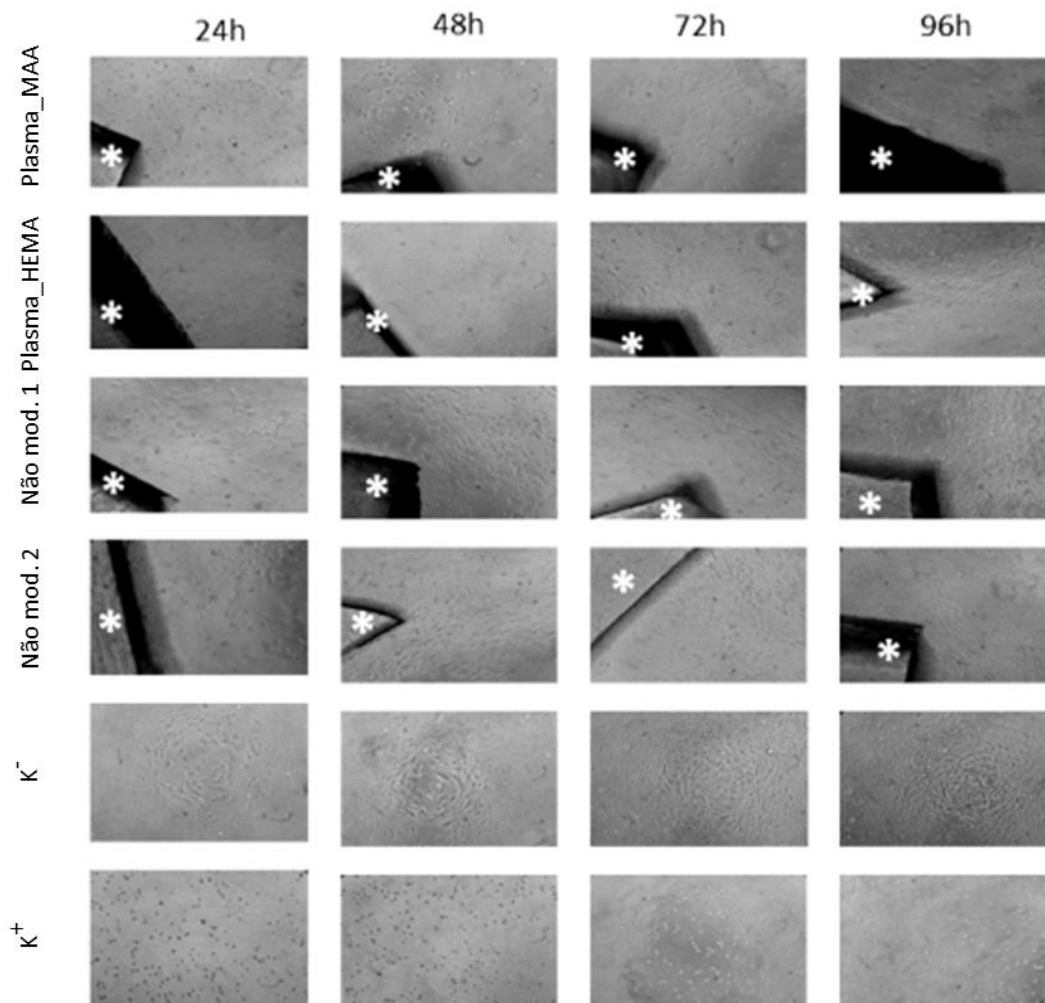


Figura 34: Fotografias microscópicas das células (fibroblastos humanos) na presença dos materiais modificados por Plasma, dos não modificados e dos controlos positivo (K+) e negativo (K-), para 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Através do teste MTS (figura 23, capítulo 3) verificou-se que as membranas modificadas com Plasma_MAA afectam a viabilidade celular, ao contrário das modificadas com Plasma_HEMA.

Quanto à avaliação do efeito antibacteriano destas amostras, os resultados podem ser consultados nas Figuras 21, 22 e 23 da secção 3.2.4. do capítulo 3.

A Figura 21, apresenta os resultados correspondentes ao teste MIC, que através da turbidez dos poços permite avaliar quais as amostras com efeito antibacteriano. Os poços que não apresentam turbidez, o que corresponde ao efeito antibacteriano da

amostra, estão rodeados com um círculo. Assim, pode verificar-se que ambas as modificações (Plasma_HEMA e Plasma_MAA) apresentam efeito antibacteriano, ao contrário das membranas não modificadas. Os resultados deste teste podem ser confirmados com o teste da resazurina (Figura 22), no qual os poços com amostras modificadas por Plasma_HEMA e Plasma_MAA apresentam mudança de cor, à medida que o peso do biomaterial (amostra) aumenta, o que leva à diminuição do crescimento bacteriano.

Finalmente, na Figura 23 podem observar-se os resultados correspondentes ao teste MBC. Verificam-se áreas definidas de inibição do crescimento das bactérias, sendo que as membranas Plasma_MAA apresentam o maior efeito antibacteriano.

6.3.5. Hemocompatibilidade

6.3.5.1. Avaliação da trombogénicidade

A avaliação da trombogénicidade foi efectuada através do peso dos coágulos formados na superfície das membranas quando em contacto com o sangue, durante 30 minutos. O vidro foi usado como controlo positivo, uma vez que é um material muito trombogénico e o índice de trombogénicidade foi determinado de acordo com a Equação 7, secção 2.4.5.1.

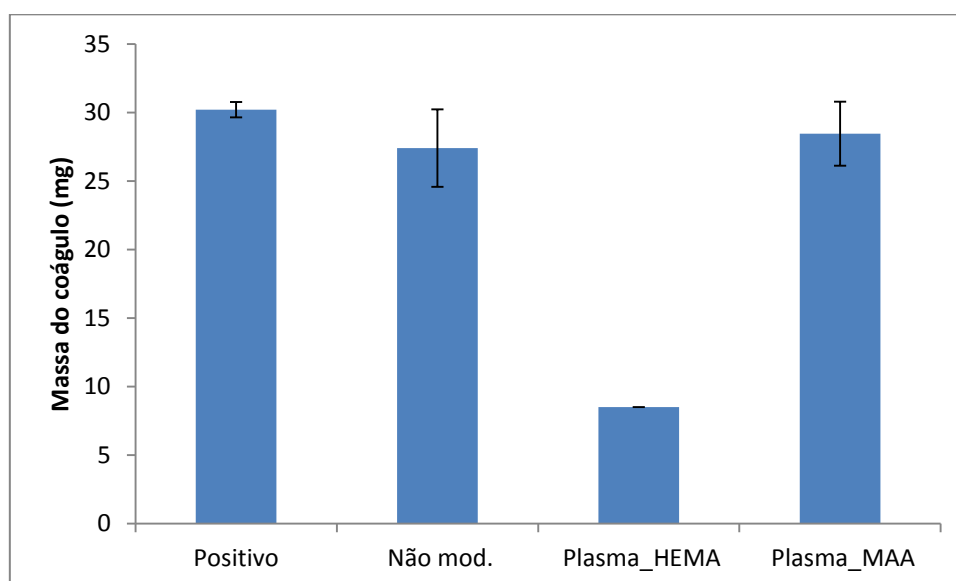


Gráfico 31: Representação gráfica dos valores médios dos coágulos formados após 30 minutos de contacto do sangue com as membranas não modificadas e modificadas por Plasma, bem como do controlo positivo.

Tabela 6: Classificação dos materiais relativamente ao seu índice hemolítico.

Membrana	% Trombogenicidade
Positivo	100
Não modificada	89,59
Plasma_HEMA	19,33
Plasma_MAA	93,49

Após o enxerto dos monómeros o índice de trombogenicidade diminui, no caso do HEMA, mas aumenta no caso do MAA (Tabela 6). As membranas modificadas por Plasma_HEMA são então as menos trombogénicas. Da análise do Gráfico 31, verifica-se que o coágulo como menor massa formado corresponde às membranas enxertadas com HEMA, daí menor percentagem de trombogenicidade.

6.3.5.2. Avaliação do índice hemolítico

A avaliação do índice hemolítico foi elaborada com base no método da cianometahemoglobina modificado. Este teste mede a capacidade de um material provocar a ruptura dos eritrócitos quando em contacto com o sangue. Foram elaborados os testes por contacto directo e indirecto e o índice foi calculado com base na equação 9, e classificados com base na tabela 3, secção 2.4.5.2.

O controlo positivo corresponde ao sangue diluído em água, mas com a mesma concentração de hemoglobina (Hb), enquanto o controlo negativo corresponde ao sangue diluído em PBS sem amostra. (ver secção 2.4.5.2).

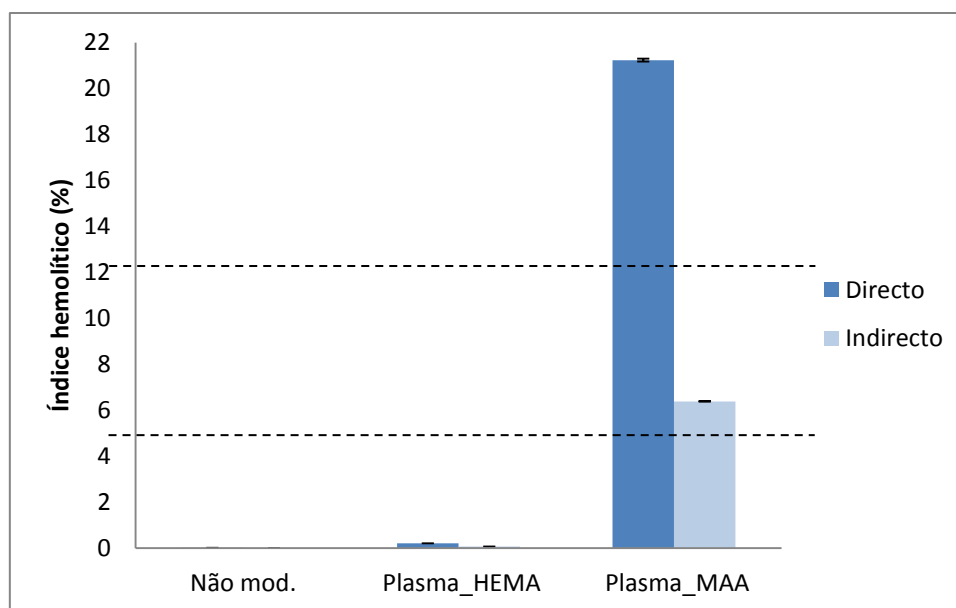


Gráfico 32: Representação gráfica do índice hemolítico das membranas não modificadas e das modificadas por Plasma, para os controlos directo e indirecto.

Observando o Gráfico 32, verifica-se que para o enxerto com HEMA, as membranas apresentam uma percentagem de índice hemolítico inferior a 2 (0,21 para o contacto directo e 0,08 para o indirecto), sendo por isso consideradas não-hemolíticas.

Em relação ao enxerto com MAA, há um aumento brutal em relação às membranas não modificadas, para ambos os contactos. O índice hemolítico é 21,23% para o contacto directo e 6,39% para o indirecto, portanto, as membranas são classificadas como hemolíticas.

6.4. Conclusão

As membranas de poliuretano foram modificadas por Plasma, seguido do enxerto dos monómeros HEMA e MAA.

A determinação dos ângulos de contacto demonstrou que estes diminuíram para as membranas modificadas em relação às não-modificadas, sendo menores no caso do enxerto do HEMA. Este é, portanto, um método eficiente para reduzir a hidrofobicidade das membranas. A avaliação das energias de superfície confirma um aumento superior da componente polar para as membranas modificadas com este monómero. No entanto, como esta componente aumenta com os dois monómeros, esta avaliação sugere que a técnica de modificação foi eficaz.

A avaliação da hidrofiliçidade ao longo do tempo demonstrou que em ambos os casos há uma recuperação dos ângulos de contacto com o passar do tempo, quando as membranas estão em contacto com o ar. O meio de incubação mais eficaz para manter a hidrofiliçidade da membrana é o meio de cultura, uma vez que quando este é usado os ângulos de contacto se mantêm em valores mais baixos.

A capacidade de inchaço apresenta valores negativos ao final de 24 horas, para ambas as modificações. Estes resultados devem-se, possivelmente, à total libertação do monómero nos meios de incubação. No entanto, como os valores obtidos são muito baixos (< 1%), não são significativos.

Os testes de adesão e proliferação celulares demonstraram que as células aderiram em ambas as membranas modificadas, no entanto as membranas enxertadas com MAA apresentam uma viabilidade celular ao fim de 4 dias inferior a 70%, valor abaixo do qual os materiais são considerados tóxicos. Pelo contrário, as membranas modificadas com MAA apresentam um maior efeito antibacteriano comparativamente com as modificadas com HEMA.

Em relação à hemocompatibilidade, as membranas enxertadas com HEMA mostraram-se não trombogénicas e não-hemolíticas. Já as membranas enxertadas com MAA demonstraram ser mais trombogénicas que as não modificadas e muito hemolíticas para ambos os contactos (directo e indirecto).

Assim, a modificação por Plasma seguida do enxerto com HEMA é o método mais eficaz entre estes dois, pois além de não afectar a viabilidade celular, é hemocompatível. Estas características são necessárias para a implantação deste material enquanto válvulas cardíacas.

Conclusão Geral e Trabalho Futuro

A necessidade de desenvolver uma válvula cardíaca artificial que seja totalmente compatível com o corpo humano ainda não foi colmatada. A modificação de superfícies é muito usada actualmente, uma vez que permite alterar as propriedades de superfície sem alterar as propriedades de massa.

Com o presente trabalho, pretenderam-se aplicar algumas técnicas de modificação de superfície (radiação UV, aminólise e Plasma) a uma poliuretana termoplástica, *Elastollan 1180A50*[®], de forma a verificar se as alterações provocadas cumpriam os requisitos necessários para a sua aplicação enquanto válvulas cardíacas.

Inicialmente, as membranas de poliuretana foram modificadas com radiação UV de forma a criar radicais livres à superfície e enxertadas com dois monómeros diferentes- HEMA e MAA. Estas membranas modificadas apresentam aumento da hidrofiliidade, relacionada com um aumento da biocompatibilidade, e uma boa adesão e proliferação celulares, bem como efeito antibacteriano. Não entanto, ambas são trombogénicas, o que não é desejável para a aplicação em causa.

De seguida, as membranas foram modificadas quimicamente com hexametilendiamina, através da ligação de grupos NH_2 na superfície. Neste caso, houve uma grande redução do ângulo de contacto tal como o desejado. A presença de grupos NH_2 foi confirmada pela técnica de ATR-FTIR.

O comportamento das membranas junto das culturas de células também foi o desejável uma vez que as células aderiram e proliferaram. No entanto estas não demonstraram qualquer efeito antibacteriano. Apesar de serem menos trombogénicas que as membranas não-modificadas, apresentaram um elevado índice hemolítico. O aumento acentuado do ângulo de contacto das membranas depois de incubadas em diferentes meios, bem como o valor superior do índice hemolítico para o contacto indirecto, sugerem a libertação dos grupos NH_2 para os meios, o que leva a concluir que os grupos não se encontravam bem ligados, ou então que estes interagem com os meios, deixando a superfície mais livre.

Finalmente, as membranas foram modificadas por Plasma com diferentes gases (Oxigénio e Árgon), até encontrar os parâmetros ideais de modificação (tempo, pressão e gás), que foram aqueles que permitiram obter o ângulo mais baixo, com alguma estabilidade. Então, estas membranas foram de seguida enxertadas com os monómeros HEMA e MAA. A hidrofiliçidade das membranas também aumentou, neste caso com o passar do tempo e o meio de cultura demonstrou ser o meio mais eficaz para manter os ângulos de contacto em valores mais baixos. Comparando com a técnica de modificação por UV, uma vez que foi feito o enxerto com os mesmos monómeros, a técnica de modificação por Plasma mostrou-se mais eficaz uma vez que o ângulo de contacto obtido é inferior. Além disso, o aumento da componente polar foi também superior para estas modificações. Quando em contacto com culturas de células, ambas as membranas permitiram a adesão celular apesar das membranas enxertadas com MAA afectarem a sua viabilidade. Por outro lado, estas foram as que demonstraram maior efeito antibacteriano, embora as modificadas com HEMA também apresentem esse efeito. Em relação à hemocompatibilidade, as membranas enxertadas com HEMA mostraram-se não trombogénicas e não-hemolíticas. Já as membranas enxertadas com MAA demonstraram ser mais trombogénicas que as não modificadas e muito hemolíticas para ambos os contactos (directo e indirecto).

Deste modo, de entre todos os métodos, a técnica que demonstrou maior eficácia foi a modificação por Plasma, seguida do enxerto de HEMA. Isto porque estas membranas demonstraram uma diminuição dos ângulos de contacto, isto é, aumento da hidrofiliçidade, relacionada com a biocompatibilidade. Além disso, o seu comportamento junto das culturas de células e bactérias (promovem a adesão e

proliferação celulares e têm um efeito antibacteriano) e em contacto com o sangue (não-trombogénicas e não-hemolíticas) são características desejáveis para a aplicação enquanto válvulas cardíacas.

Apesar do trabalho efectuado ser bastante diverso, a avaliação das membranas modificadas têm que continuar a ser estudada. Assim, como sugestão para trabalho futuro:

O enxerto e rácio de grupos químicos pode ser avaliado pela técnica de XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*) para confirmar o sucesso ou insucesso da reacção de enxerto.

O processo de lavagem das membranas tem que ser melhorado, uma vez que em diferentes casos se concluiu que havia excesso de monómero na superfície que foi libertado para os meios de incubação.

É necessário também avaliar a resistência, o alongamento e a tracção destas amostras, de forma a verificar se estão preparadas para suportar os movimentos relacionados com o bombeamento do sangue. A morfologia das amostras, que pode estar relacionada com a sua biocompatibilidade pode ser avaliada por AFM (*Atomic Force Microscopy*) Além disso, devem também realizar-se testes com culturas de células endoteliais, uma vez que as válvulas cardíacas têm que ter afinidade com estas células. A adesão celular pode também ser confirmada com recurso à técnica de SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Finalmente, pode também estudar-se o enxerto de outros monómeros que sejam biocompatíveis, como por exemplo proteínas, de forma a promover uma melhor compatibilidade das membranas quando em contacto com o sangue. Para isso, a modificação por Plasma com Oxigénio pode ser uma técnica utilizada, uma vez que com esta se obtêm ângulos de contacto baixos através da inserção de grupos hidroxílicos e carboxílicos na superfície, que se ligam com facilidade às proteínas.

Bibliografia

- [1] D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2941-2953, 2008.
- [2] G. Pocock e R. C. D., *Human Physiology The Basis of Medicine*, 3ª ed., New York: Oxford University Press, 2006.
- [3] R. R. Seeley, T. D. Stephens e P. Tate, *Anatomia & Fisiologia*, 6ª ed., McGraw-Hill Companies, Inc., 2003.
- [4] K. L. Moore e A. F. Dalley, *Anatomia orientada para a clínica*, 4ª ed., Guanabara Koogan, 2001.
- [5] G. E. Miller, *Artificial Organs*, USA: Morgan & Claypool, 2006.
- [6] C. Handler, *Guia prático Climepsi de Cardiologia nos Cuidados Primários*, Lisboa: Climepsi Editors, 2005.
- [7] J. R. Bender, "Heart valve disease," em *Yale University School of Medicine, Heart Book*, 1992, pp. 167-176.
- [8] J. G. Webster, *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, 2ª ed., Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2006.
- [9] "Heart valve surgery," USC Cardiothoracic Surgery, [Online]. Available: <http://www.cts.usc.edu/hpg-heartvalvesurgery.html>. [Acedido em 14 Junho 2012].
- [10] H. Mohammadi e K. Mequanint, "Prosthetic aortic heart valves: Modeling and design," *Medical Engineering & Physics*, vol. 33, pp. 131-147, 2011.
- [11] T. Mihaljevic, "healthTalks from The Cleveland Clinic: A Closer Look at Heart Treatments," 26 Fevereiro 2005. [Online]. Available: <http://www.clevelandclinic.org/health/webcast/handout3.pdf>. [Acedido em 14 Junho 2012].
- [12] K. Nair, C. V. Muraleedharan e G. Bhuvaneshwar, "Developments in mechanical heart valve prosthesis," *Sadhana*, vol. 28, n.º 3&4, pp. 575-587, 2003.
- [13] J. D. Bronzino, *The Biomedical Engineering Handbook*, 2ª ed., USA: CRC Press LLC, 2000.
- [14] L. Dasi e e. al, "Fluid mechanics of artificial heart valves," *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 36, n.º 2, pp. 225-237, 2009.

- [15] I. Vesely, "Heart Valve Tissue Engineering," *Circulation Research*, vol. 97, pp. 743-755, 2005.
- [16] A. G. Kidane e e. al, "A novel nanocomposite polymer for development of synthetic heart valve leaflets," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 2409-2417, 2009.
- [17] H. Ghanbari e e. al, "Polymeric heart valves: new materials, emerging hopes," *Trends in Biotechnology*, vol. 27, n.º 6, pp. 359-367, 2009.
- [18] M. Voegelé-Kadletz e E. Wolner, "Bio artificial surfaces - Blood surface interaction," *Materials Science and Engineering C*, vol. 31, pp. 1195-1200, 2011.
- [19] H. Ghanbari e e. al, "The anti-calcification potencial of a silsesquioxane nanocomposite polymer under in vitro conditions: Potential material for synthetic leaflet heart valve," *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 4249-4260, 2010.
- [20] M. P. Stevens, *Polymer chemistry: an introduction*, 3ª ed., Oxford University Press, 1999.
- [21] P. Alves e e. al, "Surface Modification of a Thermoplastic Polyurethane by Low-Pressure Plasma Treatment to Improve Hydrophilicity," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 122, pp. 2302-2308, 2011.
- [22] J. Guan, C. Gao, L. Feng e J. Shen, "Surface modification of polyurethane for promotion of cell adhesion and growth 1: Surface photo-grafting with N,N-dimethylaminoethyl metacrylate and cytocompatibility of the modified surface," *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE*, vol. 12, pp. 447-452, 2001.
- [23] J. C. Bordado e e. al, "Síntese de poliuretanos. Aplicações.," em *Química de Polímeros*, Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra, 2004, pp. 35-60.
- [24] P. C. N. F. Calvino, *Preparação e caracterização de adesivos de base uretana*, Coimbra, 2007, Tese de Doutoramento.
- [25] P. d. J. P. Alves, *Surface modifications for the development of a biosensor for on-line monitoring of cell performance*, Coimbra, 2009, Tese de Doutoramento.
- [26] "Elastollan- The high performance TPU," BASF Corporation, 2000. [Online]. Available: http://www2.basf.us/urethanechemicals/tpu/why_elastollan_tpu.htm. [Acedido em 14 Junho 2012].
- [27] B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen e J. Lemons, *Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine*, 2ª ed., Elsevier Inc., 2004.
- [28] S. V. C. Jr., *Técnicas de caracterização de polímeros*, São Paulo, Brasil: Artliber Editora Ltda., 2004.

- [29] J. Gray, P. Norton e K. Griffiths, "Surface modification of a biomedical poly(ether)urethane by a remote air plasma," *Applied Surface Science*, vol. 217, pp. 210-222, 2003.
- [30] Chesworth, *Encyclopedia of soil science*, Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008.
- [31] D. Y. Kwok e A. W. Neumann, "Contact angle measurement and contact angle interpretation," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 81, pp. 167-249, 1999.
- [32] W. A. Zisman, "Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution," *Advances in Chemistry*, vol. 43, pp. 1-51, 1964.
- [33] N. T. Correia, J. J. M. Ramos, B. J. V. Saramago e J. C. G. Calado, "Estimation of the Surface Tension of a Solid: Application to a Liquid Crystalline Polymer," *Journal of colloid and interface science*, vol. 189, pp. 361-369, 1997.
- [34] DataPhysics, *Interfacial Chemistry, Operating manual DataPhysics OCA.*, Germany: Data Physics Instruments GmdH, 2002.
- [35] T. Ulrich, *Energetic Materials: Particle Processing and Characterization.*, Weinheim: Wiley-VCH, 2004.
- [36] D. L. Pavia, G. M. Lampman e G. S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy A guide for students of Organic Chemistry*, USA: Saunders College Publishing, 1996.
- [37] "FTIR (Fourier Transform Infrared) Spectroscopy," [Online]. Available: <http://www.siliconfareast.com/FTIR.htm>. [Acedido em 6 Agosto 2012].
- [38] "Fourier Transform-Infrared Spectroscopy-Materials Evaluation and Engineering, Inc.," [Online]. Available: <http://www.mee-inc.com/ftir.html>. [Acedido em 6 Agosto 2012].
- [39] "http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf," [Online]. Available: http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf. [Acedido em 6 Agosto 2012].
- [40] D. Shi, *Biomaterials and Tissue Engineering*, Germany: Springer, 2004.
- [41] Z. Ma, Z. Mao e C. Gao, "Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering," *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 60, pp. 137-157, 2007.
- [42] M. Khorasani, S. MoemenBellah, H. Mirzadeh e B. Sadatnia, "Effect of surface charge and hydrophobicity of polyurethanes and silicone rubbers on L929 cells response," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 51, pp. 112-119, 2006.
- [43] N. Gomathi, A. Sureshkumar e S. Neogi, "RF plasma-treated polymers for biomedical

applications," *Current Science*, vol. 94, pp. 1478-1486, 2008.

- [44] P. Alves, S. Pinto, J.-P. Kaiser, A. Bruinink, H. C. d. Sousa e M. Gil, "Surface grafting of a thermoplastic polyurethane with methacrylic acid by previous plasma surface activation and by ultraviolet irradiation to reduce cell adhesion," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 82, pp. 371-377, 2011.
- [45] D. Rana e T. Matsuura, "Surface Modifications for Antifouling Membranes," *Chem. Rev.*, vol. 110 (4), pp. 2448-2471, 2010.
- [46] K. Bazaka, M. V. Jacob, R. J. Crawford e E. P. Ivanova, "Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, pp. 2015-2028, 2011.
- [47] M. Ribeiro, A. Espiga, D. Silva, P. Baptista, J. Henriques, C. Ferreira, J. C. Silva, J. P. Borges, E. Pires, P. Chaves e a. others, "Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing," *Wound Repair Regen*, vol. 17, pp. 817-824, 2009.
- [48] J. Maia, M. P. Ribeiro, C. Ventura, R. A. Carvalho, I. J. Correia e M. Gil, "Ocular injectable formulation assessment for oxidized dextran-based hydrogels," *Acta Biomater*, vol. 5, pp. 1948-1955, 2009.
- [49] P. Coimbra, P. Alves, T. A. Valente, R. Santos, I. J. Correia e P. Ferreira, "Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: synthesis and characterization," *Int J Biol Macromol*, vol. 49, pp. 573-579.
- [50] P. Coimbra, P. Ferreira, H. C. B. P. de Sousa, M. A. Rodrigues, I. J. Correia e M. H. Gil, "Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications," *Int J Biol Macromol*, vol. 48, pp. 112-118.
- [51] M. S. da Silva, R. Viveiros, P. I. Morgado, A. Aguiar-Ricardo, I. J. Correia e T. Casimiro, "Development of 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate-based molecular recognition devices for controlled drug delivery using supercritical fluid technology," *Int J Pharm*, vol. 416, pp. 61-68.
- [52] A. Panáček, L. Kvítek, R. Pucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V. K. Sharma, N. a. Tat'jana e R. Zboril, "Silver colloid nanoparticles synthesis, characterization, and their antibacterial activity," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, pp. 16248-16253, 2006.
- [53] S. D. Sarker, L. Nahar e Y. Kumarasamy, "Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals," *Methods*, vol. 42, pp. 321-324, 2007.
- [54] J. P. Ruparelia, A. K. Chatterjee, S. P. Duttagupta e S. Mukhergi, "Strain specificity in

- antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, pp. 707-716, 2008.
- [55] R. W. Colman, V. J. Marder, A. W. Clowes, J. N. George e S. Z. Goldhaber, *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 5ª ed., USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [56] *ISO 10993-4 - Biological Evaluation of Medical Devices - Part 4: Selection of Tests for Interaction with Blood*, 1 st February of 2009.
- [57] G. Bernacca, M. Gulbransen, R. Wilkinson e D. Wheatley, "In vitro blood compatibility of surface-modified polyurethanes," *Biomaterials*, vol. 19, pp. 1151-1165, 1998.
- [58] LAPPSTECH, *Blood Compatibility Protocol- Thrombogenicity*, Coimbra.
- [59] (. F. 7.-0. American Standart for Testing Materials, "*Standart Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*", 2000.
- [60] M. Ebara, J. M. Hoffman, P. S. Stayton e A. S. Hoffman, "Surface modification of microfluidic channels by UV-mediated graft polymerization of non-fouling and 'smart' polymers," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 76, pp. 1409-1413, 2007.
- [61] J. Deng, L. Wang, L. Lianying e W. Yang, "Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations," *Progress in Polymer Science*, vol. 34, pp. 156-193, 2009.
- [62] S. Mc Arthur e K. McLean, "Surface modification," em *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, vol. 2, Marcel Dekker, Inc., 2004.
- [63] L. Mascia, *Polymers in Industry from A-Z a concise encyclopedia*, Germany: WILEY-VCH, 2012.
- [64] D. A. Puleo e R. Bizios, *Biological Interactions on Materials Surfaces Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue Responses*, Springer, 2009.
- [65] J. S. Kiew, X. Sui, Y.-S. Chu, J. P. Thiery e I. Rodriguez, "Fabrication of Adhesive Protein Micropatterns In Application of Studying Cell Surface Interactions," em *ICBME 2008- 13th International Conference on Biomedical Engineering*, Singapore, 2008.
- [66] "What is Photoiniciator? | Hyaluronan-based Hydrogels by Glycosan," [Online]. Available: <http://www.glycosan.com/what-is-photoinitiator/>. [Acedido em 10 Agosto 2012].
- [67] "<http://www.nicnas.gov.au/publications/car/new/na/nafullr/na0900fr/na991fr.pdf>," [Online]. Available: <http://www.nicnas.gov.au/publications/car/new/na/nafullr/na0900fr/na991fr.pdf>. [Acedido em 10 Agosto 2012].

- [68] "Methacrylic acid CAS#: 79-41-4," [Online]. Available:
http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB9240023_EN.htm.
[Acedido em 8 Agosto 2012].
- [69] "Methacrylic acid purum, monomer, >= 98.0% (T) | Sigma-Aldrich," [Online]. Available:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/64050?lang=pt®ion=PT>.
[Acedido em 8 Agosto 2012].
- [70] "http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4690827.htm,"
[Online]. Available:
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4690827.htm. [Acedido em 8 Agosto 2012].
- [71] "<http://www.polysciences.com/Core/Display.aspx?pageId=98&categoryId=411&productId=378>," [Online]. Available:
<http://www.polysciences.com/Core/Display.aspx?pageId=98&categoryId=411&productId=378>. [Acedido em 8 Agosto 2012].
- [72] "<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/128635?lang=pt®ion=PT>,"
[Online]. Available:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/128635?lang=pt®ion=PT>.
[Acedido em 8 Agosto 2012].
- [73] "<http://www.fp7nadine.eu/upload/sites/fp7nadine/publications/chemistrymater2637.pdf>,"
[Online]. Available:
<http://www.fp7nadine.eu/upload/sites/fp7nadine/publications/chemistrymater2637.pdf>.
[Acedido em 8 Agosto 2012].
- [74] S. Huang e X. Fu, "Cell behavior on microparticles with different surface morphology,"
Journal of Alloys and Compounds, vol. 493, pp. 246-251, 2010.
- [75] H. Zhou e H. H. K. Xu, "The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, 2011.
- [76] R. Ziano, "http://boa.unimib.it/bitstream/10281/7774/1/phd_unimib_708227.pdf,"
[Online]. Available:
http://boa.unimib.it/bitstream/10281/7774/1/phd_unimib_708227.pdf. [Acedido em 14 Agosto 2012].
- [77] Y. Zhu, C. Gao, T. He e J. Shen, "Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 423-430, 2004.
- [78] N. Inagaki, *Plasma Surface Modification and Plasma Polimerization*, Thecnomic Publishing Company, Inc., 1996.

- [79] "<http://www.plasmatechnology.com/pdf/PlasmaSurfMod03-07v2.pdf>," [Online]. Available: <http://www.plasmatechnology.com/pdf/PlasmaSurfMod03-07v2.pdf>. [Acedido em 16 Agosto 2012].
- [80] M. Sanchis, O. Calvo, O. Fenollar, D. Garcia e R. Balart, "Surface Modification of a Polyurethane Film by Low Pressure Glow Discharge Oxygen Plasma Treatment," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 105, pp. 1077-1085, 2007.
- [81] "diener electronic: Plasma-Surface-Technology. Plasma cleaner, Plasma activation, Plasma asher, Plasma etcher, diener electronic," [Online]. Available: <http://www.plasma-us.com/>. [Acedido em 16 Agosto 2012].
- [82] Z. E. d. Grades, "http://www.mpip-mainz.mpg.de/groups/knoll/Publication/theses/2003/zhang_2003," [Online]. Available: http://www.mpip-mainz.mpg.de/groups/knoll/Publication/theses/2003/zhang_2003. [Acedido em 16 Agosto 2012].
- [83] P. Vermette, H. J. Griesser, G. Laroche e R. Guidoin, "7.6 Plasma Surface Modifications for Biomedical applications of polyurethanes 2001- Vermette," [Online]. Available: <http://pt.scribd.com/doc/52711054/43/Plasma-Surface-Modifications>. [Acedido em 17 Agosto 2012].
- [84] N. M. Martins, "<http://home.utad.pt/~ume/Fundamentos%20Te%F3ricos.pdf>," [Online]. Available: <http://home.utad.pt/~ume/Fundamentos%20Te%F3ricos.pdf>. [Acedido em 3 Junho 2012].
- [85] B. Stuart, *Polymer analysis*, Sydney, Australia: John & Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- [86] "scanning electron microscope-- Britannica Online Encyclopedia," [Online]. Available: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/110970/Scanning-electron-microscope>. [Acedido em 3 Junho 2012].
- [87] J. E. Gray, P. R. Norton e K. Griffiths, "Surface modification of a biomedical poly(ether)urethane by a remote air plasma," *Applied Surface Science*, vol. 217, pp. 210-222, 2003.
- [88] M. G. Guzmán, J. Dille e S. Godet, "Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity," *Int J. Chem. Biomol. Eng*, vol. 2, pp. 104-111, 2009.

Anexos

Anexo A

Tabela 7: Resultados médios obtidos para os ângulos de contacto das membranas modificadas por UV, durante diferentes tempos de irradiação, para os 2 monómeros enxertados (HEMA e MAA).

Ângulos de Contacto (°)		
Tempo (horas)	HEMA	MAA
0,25	81,5 ± 1,2	87,3 ± 1,9
0,5	75,0 ± 0,4	74,4 ± 1,3
1	83,0 ± 1,8	79,3 ± 1,7
2	79,1 ± 2,2	76,6 ± 2,1
3	75,8 ± 3,7	78,1 ± 3,0
4	78,8 ± 2,4	81,4 ± 3,0

Anexo B

Tabela 8: Resultados médios obtidos para os ângulos de contacto das membranas modificadas por Plasma, com o gás Árgon, para diferentes tempos e pressões.

Ângulos de Contacto (°)					
Tempo (horas)	0,4 mbar	0,6 mbar	0,8 mbar	1 mbar	2 mbar
0,5	40,0 ± 4,0	52,8 ± 2,0	47,4 ± 2,3	93,9 ± 2,9	101,9 ± 2,5
1	27,4 ± 0,5	45,4 ± 2,0	52,1 ± 2,8	68,5 ± 1,1	88,7 ± 3,2
2	26,2 ± 2,7	27,7 ± 1,7	45,5 ± 1,9	39,7 ± 2,2	42,2 ± 1,0
3	29,8 ± 0,4	23,6 ± 1,4	34,1 ± 1,4	35,8 ± 0,8	49,1 ± 1,1
4	28,0 ± 1,3	29,4 ± 2,9	41,3 ± 2,4	35,0 ± 1,2	44,4 ± 2,9

Tabela 9: Resultados médios obtidos para os ângulos de contacto das membranas modificadas por Plasma, com o gás Oxigénio, para diferentes tempos e pressões.

Ângulos de Contacto (°)					
Tempo (horas)	0,4 mbar	0,6 mbar	0,8 mbar	1 mbar	2 mbar
0,5	-	43,5 ± 1,5	57,6 ± 1,7	51,8 ± 6,9	53,4 ± 4,7
1	-	41,0 ± 1,2	39,7 ± 1,7	41,7 ± 3,0	36,8 ± 1,3
2	13,3 ± 1,5	35,4 ± 1,4	32,2 ± 2,0	46,4 ± 1,4	36,0 ± 0,9
3	12,5 ± 1,9	36,5 ± 1,5	40,0 ± 2,9	41,5 ± 1,8	38,3 ± 1,6
4	18,4 ± 0,4	30,3 ± 1,0	37,4 ± 0,6	37,2 ± 0,5	40,1 ± 1,6