



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Monocamadas Auto-Estruturadas de Alcanotióis sobre Ouro no Estudo da Hemocompatibilidade de Materiais

Carlos André Videira Ramos

---

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Monocamadas Auto-Estruturadas de Alcanotíóis sobre Ouro no Estudo da Hemocompatibilidade de Materiais**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar (Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra).

Carlos André Videira Ramos

---

2015

## **AGRADECIMENTOS**

Perto de terminar a escrita desta dissertação, quero deixar registado publicamente a minha mais profunda gratidão:

Ao meu orientador Professor António Jorge Guiomar, pela supervisão e disponibilidade;

Ao Instituto Português do Sangue e da Transplantação de Coimbra;

À Doutora Ana Donato, do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra;

Ao Professor Carlos Leal, do Departamento de Matemática da Universidade de Coimbra, pela sua boa vontade e disponibilidade;

À Amélia Henriques, pela companhia e disponibilidade no laboratório;

À Alice Alves, pelo seu carinho e amizade;

À minha irmã, aos meus avós, ao Gustavo, à minha família, por fazerem parte da minha vida;

À minha namorada pela enorme paciência, compreensão, por caminhar ao meu lado;

Aos meus PAIS, pelo apoio incondicional, a quem devo tudo, porque sem o esforço, o amor e a dedicação deles não seria possível atingir esta, nem outras, metas.

*"Aproveitem a vida e ajudem-se uns aos outros. Apreciem cada momento. Agradeçam e não deixem nada por dizer, nada por fazer." António Feio*

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. Biomateriais	1
1.2. Monocamadas Auto-Estruturadas de Alcanotióis sobre Ouro	2
1.2.1. Aspetos Gerais	3
1.2.2. Formação das Monocamadas Auto-Estruturadas (SAMs)	7
1.3. Caracterização superficial	14
1.3.1. Goniometria de Ângulos de Contacto	15
1.4. Hemocompatibilidade de Superfícies Artificiais	22
1.4.1. Coagulação Sanguínea	23
1.4.2. Ativação da Via Extrínseca da Cascata da Coagulação	26
1.4.3. Adesão e ativação das plaquetas à superfície dos biomateriais	29
1.4.4. Adsorção de proteínas do plasma à superfícies dos biomateriais	33
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36
2.1. Monocamadas Auto-Estruturadas (SAMs)	36
2.1.1. Preparação das SAMs	36
2.2. Caracterização da superfície das SAMs por goniometria de ângulos de contacto	37
2.2.1. Medição do ângulo de contacto estático	39
2.2.2. Medição do ângulo de contacto dinâmico	40
2.3. Avaliação da hemocompatibilidade	43
2.3.1. Tempo de Tromboplastina Parcial (PTT)	43
2.3.2. Tempo de Protrombina (PT)	47
2.3.3. Adesão de Plaquetas às SAMs	49
2.3.4. Adsorção de Proteínas às SAMs	52
2.4. Análise estatística	54
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	55
3.1. Preparação e caracterização das superfícies utilizadas	55
3.1.1. Preparação e caracterização do substrato de ouro	55
3.1.2. Caracterização das SAMs	56
3.1.3. Limpeza e caracterização da superfície de vidro	59
3.2. Caracterização da interação entre o sangue e as diferentes superfícies	60
3.2.1. Tempos de coagulação do plasma sanguíneo	60

3.2.2. Adesão de plaquetas	75
3.2.3. Adsorção de proteínas	81
<b>4. CONCLUSÃO</b>	89
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	91

## RESUMO

O contacto entre a superfície de determinados materiais e o sangue pode induzir a coagulação do sangue. Um dos grandes desafios da ciência dos biomateriais é o desenvolvimento de materiais que minimizem ou anulem a coagulação sanguínea, melhorando a hemocompatibilidade de dispositivos médicos. No presente estudo, foram preparadas monocamadas auto-estruturadas (SAMs) sobre ouro de 1-undecanotiol (UDT) e ácido 11-mercaptopropionico (MUA), que possuem diferentes grupos químicos à superfície (UDT: grupos metilo; MUA: grupos carboxilo), de forma avaliar o efeito da hidrofiliidade/hidrofobicidade e da carga elétrica das superfícies sobre alguns aspetos da coagulação do sangue: a coagulação do plasma sanguíneo, a adesão de plaquetas e a adsorção de proteínas. Verificou-se que as proteínas do plasma adsorviam fortemente à SAM de UDT, hidrofóbica e apolar. Nesta superfície, também ocorreu uma elevada adesão de plaquetas, explicável pela interligação entre a adsorção de proteínas e a adesão celular. A SAM de UDT induziu uma menor ativação das vias intrínseca e extrínseca da coagulação quando comparada com a SAM de MUA, ou seja, a superfície hidrofílica e com carga elétrica negativa, ativou mais fortemente a coagulação do plasma sanguíneo, pelas vias intrínseca e extrínseca. Relativamente à adesão de plaquetas nas superfícies, verificou-se que na SAM com características hidrofóbicas e apolar, as plaquetas aderiam em maior quantidade do que à SAM hidrofílica e com carga elétrica negativa. Nos estudos de adsorção de proteínas do plasma à superfície das diferentes SAMs, verificou-se que, em ambas as SAMs, havia adsorção de proteínas do plasma havendo, no entanto, uma maior adsorção de proteínas à superfície da SAM com características hidrofóbicas e apolar.

Palavras-Chave: blood; materials; hemocompatibility; self-assembled monolayers; surface characterization

## **ABSTRACT**

The contact between blood and the surface of certain materials can induce blood clotting. One of the great challenges of the science of biomaterials is the development of materials that minimize or eliminate blood clotting, improving the hemocompatibility of medical devices. In this study, self-assembled monolayers of alkanethiols on gold (SAMs) were prepared with 1-undecanethiol (UDT) and with 11-mercapto-1-undecanoic acid (MUA), two molecules which have different chemical groups exposed at the surface (UDT: methyl groups; MUA: carboxyl groups) and used to evaluate the effect of the hydrophilicity/hydrophobicity and the electric charge of the surfaces on some aspects of blood coagulation, such as blood plasma clotting, platelet adhesion and protein adsorption. It was found that plasma proteins strongly adsorb to the hydrophobic and nonpolar UDT SAM. On this surface, there is also a high adhesion of platelets, which can be explained by the interconnection between protein adsorption and cell adhesion. The UDT SAM also induced a lower activation of the intrinsic and extrinsic pathways of coagulation when compared to the hydrophilic and negatively charged MUA SAM, which strongly activates coagulation of blood plasma through the intrinsic and extrinsic pathways. With regard to platelet adhesion on surfaces, platelets adhere in greater quantity to the SAM with hydrophobic and nonpolar characteristics than to the SAM with hydrophilic character and negative electric charge. In the plasma protein adsorption studies, there is plasma protein adsorption on both SAMs, however, there is a greater adsorption of plasma proteins on the surface of the SAM with hydrophobic characteristics and nonpolar.

Keywords: blood; materials; hemocompatibility; self-assembled monolayers; surface characterization

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Biomateriais

A área dos biomateriais pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos físicos e biológicos resultante da interação entre um material e um ambiente biológico (Ratner *et al.*, 2004). Por sua vez, um biomaterial é um material destinado a interagir com um sistema biológico para tratar, avaliar ou substituir um tecido ou órgão do corpo, como exemplo, as próteses vasculares, ortopédicas, oftalmológicas, dentárias, membranas de hemodiálise, suturas e dispositivos para libertação controlada de fármacos (e.g. lentes de contato). Os biomateriais podem ser metais, cerâmicos, polímeros ou compósitos.

O contacto entre a superfície de determinados biomateriais e o sangue pode induzir a coagulação do sangue, num processo similar ao que ocorre quando há dano físico nos vasos sanguíneos, de modo a manter-se a homeostasia do sangue. Um dos grandes desafios da ciência dos materiais é o desenvolvimento de biomateriais que minimizem ou anulem a coagulação sanguínea, melhorando a hemocompatibilidade de dispositivos médicos tais como cateteres, próteses endovasculares expansíveis (*stents*), membranas de hemodiálise e outros dispositivos extracorporais. O uso de materiais que ativam a cascata da coagulação *in vivo* resulta em reações severas, tais como embolias e enfartes.

A coagulação sanguínea induzida pelo contacto com biomateriais limita o uso terapêutico de alguns produtos médicos, havendo a necessidade de compreender os mecanismos biológicos da interação sangue – material, de modo a definir a estratégia mais adequada para a modificação da superfície dos biomateriais. As abordagens para melhorar a hemocompatibilidade dos biomateriais incluem a modificação passiva e ativa da superfície.

As propriedades físico-químicas das superfícies tais como a composição química, molhabilidade e polaridade são parâmetros de modificação passiva e são o foco central deste trabalho. No presente estudo foram preparados dois tipos de monocamadas auto-estruturadas contendo um de dois grupos químicos à superfície ( $-CH_3$  ou  $-COOH$ ), de modo a conseguir avaliar a influência da hidrofiliicidade/hidrofobicidade e da polaridade de uma superfície sobre a coagulação sanguínea e sobre a adesão de plaquetas. Para isso, as monocamadas foram incubadas com plasma sanguíneo humano ou com suspensões de plaquetas. Posteriormente, foram analisados alguns parâmetros que permitem avaliar a hemocompatibilidade de materiais, em particular, a ativação da cascata da coagulação pela via extrínseca e intrínseca, a adesão de plaquetas e a adsorção de proteínas do plasma.

## **1.2. Monocamadas Auto-Estruturadas de Alcanotióis sobre Ouro**

Auto-organização (*self-assembly*) é o termo usado para descrever a formação espontânea de uma estrutura complexa, ordenada e estável a partir dos seus constituintes químicos individuais (Ulman, 1996). As monocamadas auto-estruturadas (SAMs, de *Self-Assembled Monolayers*) são montagens moleculares de elevada organização formadas pela interação espontânea entre um tensoativo e um substrato, possuindo uma molécula de espessura, i.e., uma espessura da ordem dos nanómetros.

Em 1946, Zisman publicou a preparação de uma camada monomolecular por adsorção de um tensoativo à superfície de um metal, mas na época o potencial das SAMs não foi reconhecido. Os trabalhos iniciais com monocamadas foram feitos usando derivados de clorosilanos sobre vidro (Bigelow *et al.*, 1946). Posteriormente, Nuzzo e Allara descobriram que SAMs de alcanotióis sobre ouro podiam ser preparadas por quimissorção de dialquil

dissulfetos a uma superfície de ouro (Nuzzo e Allara, 1983) e, no final da década de 80, Bain e Whitesides prepararam monocamadas mistas de alcanotióis com grupos químicos terminais de metilo (-CH<sub>3</sub>) e hidroxilo (-OH), de forma a variar a molhabilidade da superfície (Bain *et al.*, 1989a).

As monocamadas auto-estruturadas de alcanotióis têm sido aplicadas em múltiplas áreas em que se necessita modificar ou controlar as propriedades das superfícies. Têm aplicações em áreas como os biossensores, a preparação de matrizes para ligação de biomoléculas, nomeadamente, enzimas, anticorpos e DNA, na preparação de superfícies resistentes a adsorção de proteínas, adesão celular, na funcionalização de superfícies de nanopartículas, impressão (*microcontact printing*),<sup>1</sup> sensores óticos, biorreatores, catálise, proteção contra corrosão, alteração de adesão/ lubrificação, entre muitas outras aplicações (Love *et al.*, 2005; Mrksich e Whitesides, 1995; Freire *et al.*, 2003).

### **1.2.1. Aspetos Gerais**

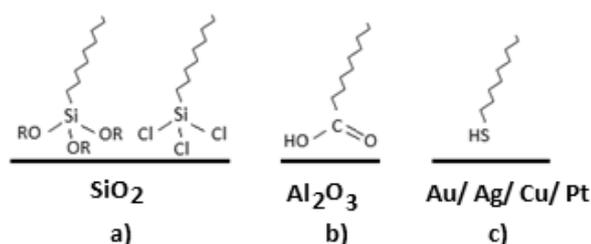
A grande variedade de tensioativos e substratos com os quais se podem preparar SAMs abrem-nos a possibilidade de criar superfícies com diferentes propriedades e funções. Além disso, no mesmo tipo de SAM é possível alterar as suas propriedades e funções por alterações de determinadas características químicas, tais como a carga, a polaridade, o comprimento das cadeias, a presença de grupos terminais hidrofílicos ou hidrofóbicos, entre muitos outros fatores.

Têm sido preparados diversos tipos de SAMs com diferentes tipos de substratos e tensioativos. Entre os mais comuns, encontram-se os seguintes: (i)

---

<sup>1</sup> Uma forma de litografia que usa um elastómero de silicone embebido num organotiol como "carimbo" para formar padrões de SAMs sobre uma superfície de ouro.

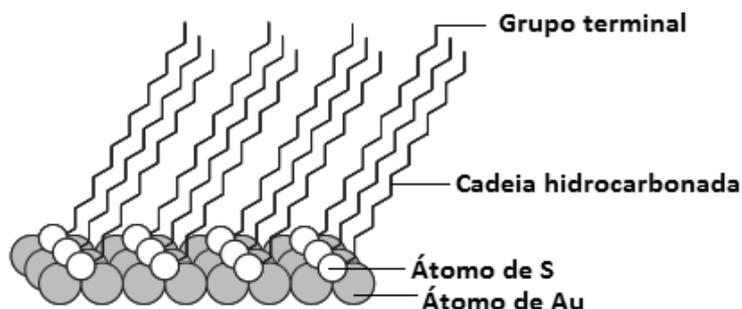
derivados de organotióis sobre ouro (Au), prata (Ag), cobre (Cu) ou platina (Pt); (ii) derivados de organosilanos sobre superfícies hidroxiladas (vidro, quartzo, dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ; sílica), óxido de alguns metais – alumínio, titânio, estanho; (iii) álcoois sobre platina; (iv) aminas sobre platina; (v) ácidos carboxílicos sobre alumínio oxidado e prata; (vi) organofosfatos e organofosfonatos sobre óxidos de metais de transição; e (vii) derivados de ácidos gordos sobre óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; alumina), entre outros sistemas possíveis (Prime e Whitesides, 1991; Ulman, 1996; Love *et al.*, 2005). Na Figura 1 apresentam-se três dos principais tipos de tensioativos e substratos utilizados na formação de SAMs. Como neste trabalho foram utilizadas SAMs de organotióis sobre ouro, este tipo de SAM irá, em seguida, ser apresentado mais detalhadamente.



**Figura 1** – Representação esquemática de alguns pares tensioativo/substrato suscetíveis de formar SAMs. a) Derivados de organosilanos/dióxido de silício; b) Derivados de ácidos gordos/alumina; c) Derivados de organotióis/superfícies metálicas de ouro, prata, cobre ou platina.

Os alcanotióis possuem características específicas que possibilitam a formação de uma monocamada auto-estruturada quando em presença de uma superfície de ouro: (i) possuem um grupo cabeça, que contém um átomo de enxofre, que se liga à superfície do ouro, ancorando a monocamada à superfície, (ii) possuem uma cadeia hidrocarbonada longa, que confere organização à SAM através de interações intercatenares e (iii) possuem um

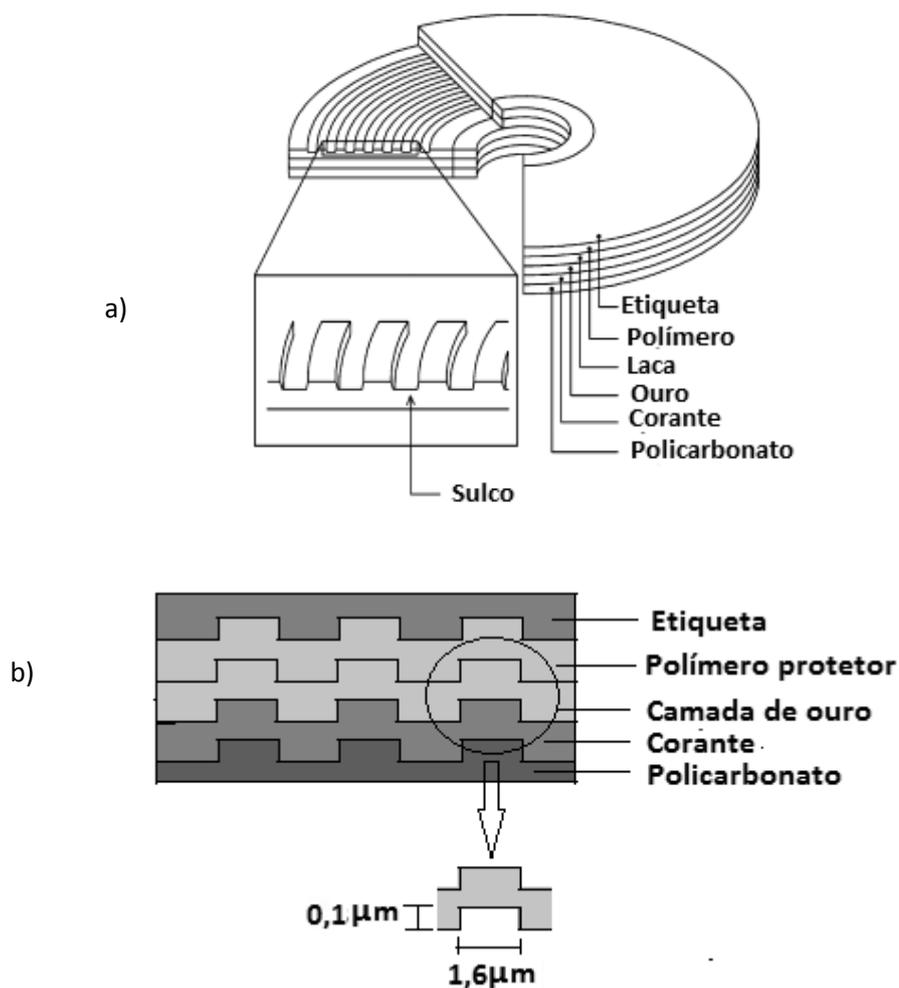
grupo terminal livre, que determina as características principais da superfície da SAM (Fig. 2) (Vericat *et al.*, 2010).



**Figura 2** – Ilustração de uma monocamada auto-estruturada de um alcantiois sobre uma superfície de ouro (adaptado de Freire *et al.*, 2003).

Os compostos de enxofre possuem uma grande afinidade para com a superfície de metais de transição, entre os quais se encontra o ouro. A maioria dos metais oxida facilmente, formando um óxido à superfície, que impede possíveis interações químicas com o metal, tendo de ser removida. As superfícies de ouro são muito usadas na formação das SAMs uma vez que o ouro (metal nobre) não oxida com facilidade, não havendo nenhuma barreira à interação química entre o metal e o tensoativo. Os contaminantes atmosféricos adsorvidos à superfície do ouro são facilmente removidos, por lavagem. Neste trabalho, a superfície de ouro utilizada foi a da camada metálica de um CD-R (*Compact Disc – Recordable*) de ouro. Os CD-Rs são constituídos por quatro camadas: (i) uma camada superior, destinada à impressão, que constitui a etiqueta, (ii) uma camada de um polímero protetor, (iii) uma camada de ouro puro de 24 quilates (99,99%), com uma espessura entre os 50 e os 100 nm (iv) uma camada de corante, na qual é guardada a informação com o auxílio de um *laser* e (v) a base de policarbonato. A base de policarbonato possui uma espiral

gravada em baixo-relevo, destinada a guiar o *laser* do leitor/gravador de CDs. Os sulcos da espiral encontram-se espaçados entre si por  $1,6\ \mu\text{m}$  e possuem uma altura de  $0,1\ \mu\text{m}$ , (Fig. 3a). Conseqüentemente, a camada de ouro que se encontra sobre a camada de policarbonato também exibe esta mesma topografia (Fig. 3b) (Singh e Hillier, 2006).



**Figura 3** – Representação esquemática de um CD (*Compact Disc*) comercial. a) Representação tridimensional dos vários constituintes de um CD (etiqueta, polímero, laca, camada de ouro, corante, camada de policarbonato e espirais/sulcos) (adaptado de Singh e Hillier, 2006); b) vista de corte de um CD.

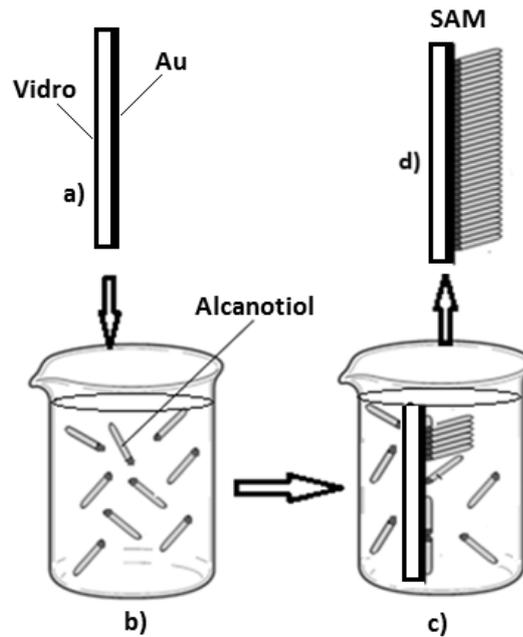
Existe uma grande variedade de compostos orgânicos sulfurados que formam monocamadas sobre o ouro, tais como os dissulfetos, os tiofenóis, as cisteínas, os tiocarbamatos, as mercaptopiridinas, entre muitos outros. Os compostos organossulfurados também coordenam fortemente com a prata, o cobre, a platina, o mercúrio e o ferro (Ulman, 1996). No entanto, as SAMs mais estudadas são de alcanotióis sobre Au(111)<sup>(2)</sup>. No entanto, também se podem formar SAMs de alcanotióis sobre cobre, platina, prata, ferro e níquel, entre outros (Vericat *et al.*, 2005).

### **1.2.2. Formação das Monocamadas Auto-Estruturadas**

As monocamadas auto-estruturadas de alcanotióis sobre ouro são preparadas por imersão do substrato de ouro numa solução do alcanotiol. Após o período de incubação, o substrato é lavado com o solvente do alcanotiol (etanol, geralmente) para remoção de moléculas de alcanotióis que não se ligaram ao substrato (Fig. 4).

---

<sup>2</sup> Um dos estados cristalinos do ouro, no qual os átomos se encontram num arranjo hexagonal.



**Figura 4** – Representação esquemática da formação de uma monocamada auto-estruturada de um alcanotiol (RSH) sobre ouro (Au). a) Superfície de ouro; b) solução do alcanotiol; c) quimissorção do alcanotiol à superfície; d) estrutura final da monocamada auto-estruturada.

A cinética de formação das monocamadas de alcanotióis sobre ouro pode ser dividida em três passos distintos:

1. Transporte da molécula de alcanotiol da solução para a superfície;
2. Ligação do grupo tiol (-SH) à superfície do ouro, através da quimissorção do átomo de enxofre a átomos de ouro;
3. Organização bidimensional das moléculas ligadas à superfície.

Os dois primeiros passos são rápidos e, ao fim de intervalos de tempo que podem variar entre milissegundos e minutos, a superfície apresenta-se já quase totalmente preenchida. Numa primeira fase, após a chegada à superfície, as moléculas do alcanotiol são adsorvidas horizontalmente à superfície do ouro, devido a forças de interação de van der Waals, exibindo um elevado grau de desordem. Estando as moléculas sobre a superfície, ocorre quimissorção entre os átomos de enxofre e os de ouro (Equação 1).



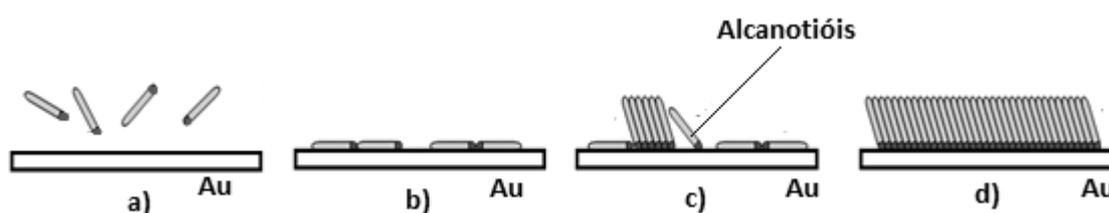
Posteriormente, ocorre um processo lento de organização bidimensional da monocamada, na escala temporal das horas, que depende da natureza química e concentração do organotiol, do solvente, da temperatura e do grau de limpeza da superfície, entre outros (Ulman, 1996; Schwartz, 2001; Vericat *et al.*, 2010).

A ligação química Au-S, designada de quimissorção, é um tipo de ligação química relativamente forte, frequentemente irreversível. Esta ligação química possui um caráter polar e covalente, devido à sobreposição parcial entre as orbitais  $3p$  do átomo de enxofre e as orbitais  $6s$  do átomo de ouro (com alguma contribuição também de orbitais  $p$  e  $d$  do átomo de Au) (Ulman, 1991). Trata-se de um tipo de ligação mais forte do que a simples adsorção, ainda que não tão forte como uma ligação covalente. A ligação covalente, em que ocorre a partilha de um ou mais pares de elétrons entre os átomos envolvidos, bem como sobreposição completa das respectivas orbitais, ocorre nas SAMs de organosilanos sobre superfícies hidroxiladas (Vansant *et al.*, 1995); já a adsorção, em que átomos interagem através de interações de van der Waals, ocorre, p. ex., nas SAMs de ácidos gordos sobre alumina (Ulrich *et al.*, 1988).

Relativamente ao modo como o átomo de enxofre se posiciona em relação aos átomos de ouro no Au(111), existem vários modelos que permitem explicar a evidência experimental existente: (i) ligação do átomo de enxofre apenas a um átomo de ouro (modelo *atop site*); ligação do átomo de enxofre a dois átomos de ouro (modelo *bridge site*); e (iii) ligação do átomo de enxofre a três átomos de ouro (modelo *3-fold hollow site*) (Gronbeck *et al.*, 2000).

A passagem da fase 2 para a fase 3 não ocorre de forma contínua. À medida que aumenta o número de moléculas à superfície, formam-se aglomerados de moléculas na forma de linhas (fase designada por *striped phase*), correspondentes a moléculas dispostas horizontalmente sobre a superfície. Com a chegada de mais moléculas, ocorre a formação de domínios contendo moléculas dispostas quase na vertical (*standing up phase*), impulsionada por interações de van der Waals entre as cadeias carbonadas. Estes domínios coalescem, resultando uma monocamada contínua (Schwartz, 2001). Subsequentemente, num processo lento, ocorre uma organização bidimensional da monocamada, devido a rearranjos moleculares impulsionados por interações entre as cadeias carbonadas das moléculas da monocamada. A organização da SAM não é termodinamicamente espontânea mas, a energia que advém das interações não-covalentes entre as cadeias dos alcanotóis, é suficiente para ultrapassar a barreira energética, permitindo a formação das monocamadas de forma espontânea (García-Raya *et al.*, 2008).

A orientação final do alcanotiol, relativamente à superfície, depende do volume do grupo químico terminal e dos grupos metileno da cadeia carbonada, sendo as interações de van der Waals entre as moléculas vizinhas maximizadas quando a cadeia se encontra ligeiramente inclinada ( $30^\circ$ ) em relação à normal ao plano do substrato (Fig. 5) (Vericat *et al.*, 2010).

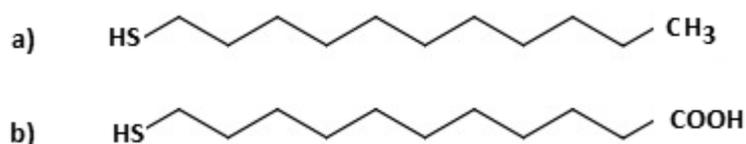


**Figura 5** – Esquema da formação espontânea de uma monocamada auto-estruturada sobre Au. a) Adsorção do alcanotiol à superfície; b) formação da fase horizontal; c) nucleação da fase vertical; d) estrutura final da monocamada (adaptada de Vericat *et al.*, 2010).

Nas SAMs de alcanotióis sobre ouro, platina, cobre ou prata, entre outros substratos, os alcanotióis atingem uma estrutura quase cristalina, sendo que as cadeias dos alcanotióis se encontram estendidas numa conformação do tipo *trans*, permitindo assim, um melhor empacotamento da cadeia hidrocarbonada dos alcanotióis. A inclinação do alcanotiol, relativamente à normal à superfície, depende do tipo de metal usado como substrato, uma vez que os diferentes tipos de metais encontram-se, dispostos no substrato, em diferentes orientações geométricas. Nos substratos do ouro, a inclinação típica das moléculas dos alcanotióis é de 30°, ao invés de 0°, devido à simetria hexagonal dos átomos de Au. O arranjo cristalino dos átomos de Au(111) não permite que as cadeias dos alcanotióis permaneçam na vertical, uma vez que ficariam demasiado afastadas uma das outras para conseguirem interagir entre si, pelo que adquirem uma inclinação de 30° relativamente à normal à superfície (Ulman, 1996; Love *et al.*, 2005).

A organização das SAMs depende, entre outros fatores, do comprimento da cadeia do alcanotiol, conseguindo-se um grau de ordem elevado somente para cadeias carbonadas com um número igual ou superior a 10 grupos metileno (Folkers *et al.*, 1992). Outros parâmetros que influenciam a organização das monocamadas são a natureza do solvente, a temperatura, as forças intermoleculares entre as moléculas do alcanotiol, o tempo de imersão do substrato na solução do alcanotiol e a concentração do alcanotiol (Bain *et al.*, 1989a; Chen *et al.*, 2008). O tempo de imersão do substrato na solução do alcanotiol depende, entre outros, do comprimento da cadeia hidrocarbonada do alcanotiol, sendo que para os alcanotióis de cadeia longa ( $n \geq 10$ ) varia entre 2 e 12 h e, para os alcanotióis de cadeia curta ( $n < 10$ ) são necessárias pelo menos 24 horas. Em geral, quanto maior o tempo de imersão, maior é o grau de ordem da monocamada auto-estruturada (Vericat *et al.*, 2005).

Mudanças no grupo terminal implicam alterações das propriedades físico-químicas da superfície da SAM, obtendo-se superfícies diferenciadas. Por exemplo, se o grupo terminal for um grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a monocamada possui características hidrofóbicas, caso o grupo terminal seja um grupo hidroxilo (-OH) a superfície tem características hidrofílicas (Vericat *et al.*, 2010; Bain *et al.*, 1989a). Neste trabalho, prepararam-se dois tipos distintos de SAMs a partir do ácido 11-mercapto-1-undecanoico (MUA, HS(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>COOH) e do 1-undecanotiol (UDT, HS(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>) (Fig.6).

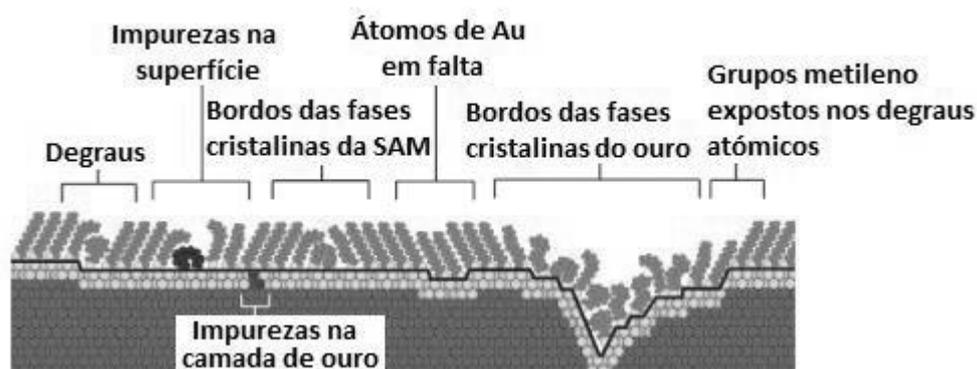


**Figura 6** – Representação esquemática da estrutura química dos alcanotióis: a) 1-undecanotiol (UDT); b) ácido 11-mercapto-1-undecanoico (MUA).

Aquando da formação da SAM, alguns alcanotióis necessitam de condições específicas, devido ao grupo terminal que possuem. As SAMs com grupos carboxilo (-COOH) à superfície apresentam um certo grau de desordem, com tendência para a formação de uma dupla camada ou estruturas cíclicas, devido à formação de ligações de hidrogénio entre os grupos carboxílicos (Arnold *et al.*, 2002). Segundo Arnold *et al.* este problema pode ser contornado ao usar uma mistura de ácido acético 2% e etanol como solvente do tiol, provocando a disrupção das ligações de hidrogénio entre os tióis da monocamada e os tióis livres em solução (Arnold *et al.*, 2002).

As SAMs não são sistemas totalmente perfeitos e podem conter defeitos na superfície. Na Figura 7 mostram-se os principais defeitos que podem existir numa SAM (Fig. 7). Estes defeitos na topografia das SAMs são, na maioria das

vezes, inevitáveis, uma vez que dependem de fatores extrínsecos, tais como os métodos de preparação do substrato, a topografia do substrato, o grau de limpeza do substrato, o grau de pureza das soluções dos alcanotóis, e de fatores intrínsecos, uma vez que as SAMs são sistemas dinâmicos que possuem um comportamento complexo que influencia a sua organização (Love *et al.*, 2005).



**Figura 7** – Representação esquemática dos principais defeitos presentes nas SAMs de alcanotóis sobre ouro policristalino (adaptado de Love *et al.*, 2005).

Neste trabalho, é esperado que as SAMs preparadas apresentem alguma desordem, devido à topografia particular da camada de ouro proveniente dos CDs, tendo como consequência a exposição de alguns grupos metileno, para além do grupo terminal do alcanotiol.

As monocamadas auto-estruturadas têm sido usadas como superfície-modelo em variados tipos de estudos, nomeadamente em estudos de hemocompatibilidade. A facilidade de formação das SAMs, a sua integridade estrutural e a facilidade de controlar diversos parâmetros físico-químicos na superfície das SAMs, permite avaliar uma a uma a influência de diversas propriedades superficiais, tais como a hidrofobicidade e a polaridade, na resposta biológica associada à coagulação do plasma sanguíneo. Adicionalmente,

permitem criar superfícies bem definidas que possibilitam o estudo de apenas um determinado parâmetro mantendo os outros constantes, algo que não é possível com substratos comuns. Neste trabalho, de forma a estudar o efeito da hidrofiliicidade e da polaridade das superfícies na coagulação do plasma sanguíneo, usaram-se SAMs, em que as moléculas dos alcanotóis possuem o mesmo comprimento mas grupos terminais distintos: uma SAM com um grupo terminal hidrofílico, carregado negativamente (polar) e, uma outra SAM, com um grupo terminal hidrofóbico, sem carga elétrica (apolar).

### **1.3. Caracterização Superficial**

Quando se pretende procurar correlações entre características de uma superfície e efeitos biológicos, a superfície necessita ser caracterizada, de forma a obtermos um conjunto de parâmetros físico-químicos que permitam quantificar determinadas características da superfície e, desta forma, poder distingui-las. A caracterização de superfícies com diferentes características, tais como as SAMs com diferentes grupos terminais, nomeadamente SAMs com um grupo terminal hidrofílico, carregado negativamente (polar) e, SAMs com um grupo terminal hidrofóbico, sem carga elétrica (apolar), permite estabelecer correlações entre o efeito destes parâmetros na coagulação do plasma sanguíneo quando em contacto com as superfícies.

Entre as principais técnicas de caracterização superficial utilizadas na caracterização das SAMS encontram-se as seguintes (Adamson e Gast, 1997): (i) Espectroscopia de Absorção-Reflexão de Infravermelhos (RAIRS, *Reflection Absorption Infrared Spectroscopy*), que permite obter informação acerca da estrutura, das espécies químicas e de defeitos da superfície; (ii) Espectroscopia de Difração de Raios-X (XRD, *X-Ray Diffraction*), que permite obter informação acerca do arranjo atómico, da espessura da camada, defeitos, e sobre a fase

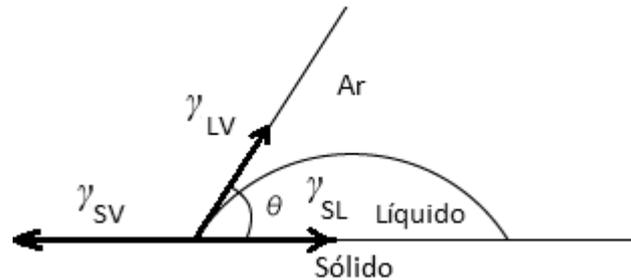
cristalina; (iii) Microscopia de Força Atômica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) ou Microscopia de Varrimento por Sonda (SPM, *Scanning Force Microscopy*), que permitem obter informação ao nível atômico, sobre a estrutura, defeitos, espessura do filme, morfologia e topografia do substrato; (iv) Espectroscopia de Fotoeletrões de Raios-X (XPS, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*), que permite obter informação acerca da composição atômica e grupos funcionais presentes, entre outros e (v) Goniometria de Ângulos de Contacto, que será detalhada a seguir, por ter sido a técnica utilizada neste trabalho para caracterizar a superfícies das SAMs preparadas.

### **1.3.1. Goniometria de Ângulos de Contacto**

A goniometria de ângulos de contacto fornece um conjunto de informações acerca da superfície das SAMs, tais como que grupos funcionais estão presentes à superfície, a sua hidrofiliicidade/hidrofobicidade, o grau de homogeneidade química, de porosidade, de rugosidade e o grau de ordem das monocamadas (Ulman *et al.*, 1992).

O ângulo de contacto ( $\theta$ ) é definido como o ângulo interno entre a linha tangente ao perfil da gota, quando vista em corte, e a superfície no ponto onde se interseccionam as três fases (líquida, sólida e gasosa). É determinado pelo balanço das interações entre as três fases em contacto e representa uma medida quantitativa do espalhamento da gota de água, ou seja, da molhabilidade da superfície (Cassie, 1948). A forma da gota também pode ser vista como o resultado do balanço entre as forças de coesão do líquido e as forças de adesão entre o sólido e o líquido. A tensão superficial é definida como a força por unidade de comprimento que atua na perpendicular à superfície de um líquido, sólido ou gás e que realiza trabalho quando se aumenta essa superfície. No caso de uma gota de líquido sobre a superfície de um sólido definem-se, três

tipos de tensões superficiais: a tensão superficial do líquido ( $\gamma_{LV}$ ); a tensão superficial do sólido ( $\gamma_{SV}$ ), em equilíbrio com o vapor do líquido, e a tensão interfacial sólido-líquido ( $\gamma_{SL}$ ) (Fig. 8).



**Figura 8** – Representação das tensões superficiais das interfaces em interação.  $\gamma_{SL}$  – tensão interfacial sólido – líquido;  $\gamma_{LV}$  – tensão superficial do líquido;  $\gamma_{SV}$  - tensão superficial do sólido,  $\theta$  – ângulo de contacto.

Definindo trigonometricamente o cosseno do ângulo de contacto, obtém-se a equação de Young (Equação 2), que relaciona o ângulo de contacto  $\theta$  com a tensão superficial do líquido ( $\gamma_{LV}$ ), a tensão interfacial sólido-líquido ( $\gamma_{SL}$ ) e a tensão superficial do sólido ( $\gamma_{SV}$ ).

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (2)$$

A tensão superficial ( $\gamma$ ) também pode ser definida como a força por unidade de comprimento ( $f$ ) que atua na perpendicular à superfície de um líquido, sólido ou gás e que realiza trabalho ( $W$ ) quando há um aumento dessa superfície ( $dx$ ) (Equação 3).

$$W = f dx = \gamma dx \quad (3)$$

As moléculas no interior de um líquido sentem o efeito das forças atrativas de van der Waals (forças de coesão), sendo atraídas em todas as direções, devido à interação com as moléculas vizinhas, sendo a resultante das forças nula. Por sua vez, as moléculas do líquido situadas na interface líquido-gás sofrem apenas atração pelas moléculas situadas por baixo e ao seu lado, pelo que a força resultante puxa as moléculas para o interior do líquido. A tensão superficial de um líquido deve-se a esta força e ela é também a responsável por conferir uma forma arredondada a uma gota (Decker *et al.*, 1998). A tensão superficial da água apresenta um valor de 72,8 mN/m a 20 °C (Agathopoulos e Nikilopoulos, 1995).

Define-se o trabalho de adesão ( $W_A$ ), de um líquido em contacto com um sólido, como o trabalho realizado pela força de adesão, entre o líquido e o sólido, ou seja, a força necessária para separar o líquido da superfície. O trabalho de adesão é calculado pela equação de Dupré (Equação 4).

$$W_A = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \quad (4)$$

sendo que  $\gamma_{LV}$  corresponde à tensão superficial do líquido,  $\gamma_{SL}$  à tensão interfacial sólido-líquido e  $\gamma_{SV}$  à tensão superficial do sólido. Combinando a equação de Dupré (Equação 4) com a equação de Young (Equação 2), obtém-se a equação de Young-Dupré (Equação 5), que permite calcular o trabalho de adesão ( $W_A$ ) a partir do ângulo de contacto ( $\theta$ ) e da tensão superficial do líquido ( $\gamma_{LV}$ ).

$$W_A = \gamma_{LV} (1 + \cos\theta) \quad (5)$$

A partir da equação de Young (Equação 2), define-se a tensão de adesão do líquido à superfície ( $\tau_a$ ) como sendo igual ao produto da tensão superficial do líquido pelo cosseno do ângulo de contacto, que é o mesmo que a diferença entre a tensão superficial do sólido e a tensão interfacial sólido-líquido (Equação 6).

$$\tau_a = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos\theta \quad (6)$$

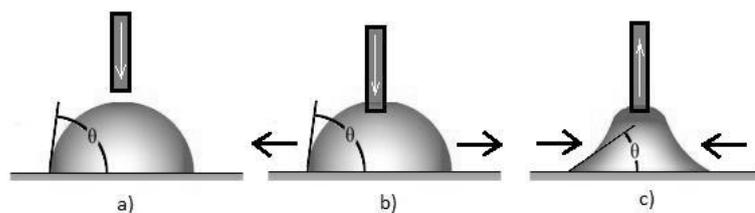
O valor da tensão de adesão da água permite classificar a superfície quanto à sua hidrofiliicidade/hidrofobicidade. Numa superfície de hidrofiliicidade máxima, uma gota de água sobre ela colocada espalha-se completamente, exibindo um ângulo de contacto nulo, ao qual, corresponde um valor de tensão de adesão igual a 72,8 mN/m. Ao invés, numa superfície de máxima hidrofobicidade, o ângulo de contacto de uma gota de água sobre ela colocada exhibe um valor de 180°, a que corresponde um valor de tensão de adesão de -72,8 mN/m (Vogler, 1998).

O Limite de Berg, proposto por Erwin Vogler (Vogler, 1998), define o valor do ângulo de contacto de uma gota de água ou o valor da tensão de adesão entre a gota de água e a superfície para o qual se passa de uma superfície com características hidrofílicas para uma superfície com características hidrofóbicas, permitindo classificar uma superfície em hidrofílica ou hidrofóbica. Baseia-se em evidência experimental obtida por Johan Berg (Berg *et al.*, 1994), que verificou que as forças de interação entre duas superfícies hidrofóbicas se detetam a uma distância superior àquela a que as forças de van der Waals e as interações electroestáticas se detetam e que, ao alterar a composição dessas superfícies de modo a diminuir a sua hidrofobicidade (através da introdução de grupos polares), quando obteve uma superfície com um ângulo de contato em avanço ( $\theta_a$ ) igual a 65°, para gotas de água, esta interação atrativa hidrofóbica a

longa distância desaparecia, detetando-se somente interações devidas a forças de van der Waals e à dupla camada elétrica. Assim, Vogler sugeriu que as superfícies hidrofílicas são todas aquelas que apresentem um valor para a tensão de adesão da água superior a 30 mN/m, ao qual corresponde um ângulo de contacto inferior a 65°. As moléculas de água, quando se encontram em contacto com superfícies hidrofílicas, formam uma estrutura 3D colapsada, devido à competição entre a auto-associação e a interação com os grupos ácido/base de Lewis da superfície. Ao invés, as superfícies hidrofóbicas apresentam um valor da tensão de adesão da água inferior a 30 mN/m, ao qual corresponde um ângulo de contacto superior a 65° (Vogler, 1998). Nestas superfícies, as moléculas de água formam uma rede 3D bem definida, uma vez que as interações com a superfície são mínimas. No Limite de Berg ( $\tau_a = 30$  mN/m;  $\theta = 65^\circ$ ), a estrutura das moléculas de água corresponde a água num estado equivalente ao da água no estado líquido afastada das superfícies. A proposta de Vogler não foi universalmente aceite, no entanto, tem sido utilizada com sucesso na interpretação da resposta biológica a superfícies.

van Oss e Giese propuseram outro limite, que também não foi universalmente aceite. As superfícies com as quais a água interaja de modo a exibir uma tensão de adesão inferior a 45 mN/m são classificadas como hidrofóbicas. Ao invés, as superfícies que exibem uma tensão de adesão da água superior a 45 mN/m são hidrofílicas. Esta proposta é baseada numa teoria, também proposta por estes autores, que divide a tensão superficial de um sólido em três componentes distintas: uma componente devido a interações apolares, outra devido a interações do tipo ácido de Lewis e, por fim, uma componente devido a interações do tipo base de Lewis (van Oss e Giese, 1995), que também não foi universalmente aceite.

O ângulo de contacto exibido por uma gota de um líquido sobre uma superfície pode ser medido de três modos diferentes, consoante o estado em que a gota se encontra. Assim, pode-se obter o ângulo de contacto estático ( $\theta_s$ ), em avanço ( $\theta_a$ ) e em retrocesso ( $\theta_r$ ) (Fig. 9).



**Figura 9** – a) Medição do ângulo de contacto estático depositando uma gota de água sobre a superfície; b) medição do ângulo de contacto em avanço de uma gota de água numa superfície; com a seringa Hamilton, aumenta-se, lentamente e continuamente o volume da gota, obrigando-a a avançar sobre o substrato; c) medição do ângulo de contacto em retrocesso nas condições indicadas acima, sugando-se a gota, provoca-se a sua retração sobre a superfície.

Estes três tipos de ângulo de contacto fornecem um conjunto distinto de informação acerca da superfície e, em conjunto, permitem uma melhor caracterização da mesma. A diferença entre o ângulo de contacto em avanço e em retrocesso, a que se chama histerese ( $H$ ), é um parâmetro que permite avaliar a homogeneidade química e física (rugosidade e porosidade) das superfícies, sendo tanto maior quanto maior a rugosidade.

O grau de ordem das SAMs pode ser estimado a partir do valor do ângulo de contacto. No caso das cadeias hidrocarbonadas dos alcanotióis que compõem a SAM possuem um elevado grau de ordem, os grupos expostos à superfície serão os grupos terminais da cadeia carbonada e o valor do ângulo de contacto será o correspondente a uma superfície que só exiba o grupo terminal. Caso contrário, se houver algum grau de desordem, haverá também exposição de grupos metileno, apresentando o ângulo de contacto um valor

próximo dos 107°, o valor do ângulo de contacto de uma superfície que só exiba grupos metileno (Bain *et al.*, 1989b).

Nas SAMS de UDT usadas neste trabalho, se houver um elevado grau de ordem, o ângulo de contacto aproximar-se-á dos 112°, valor correspondente ao valor do ângulo de contacto dos grupos metilo (Bain *et al.*, 1989b). No caso da SAM de MUA, o valor típico do ângulo de contacto da água em contacto com o grupo terminal carboxilo (-COOH) encontra-se abaixo dos 10° (Wang *et al.*, 2005).

A goniometria de ângulos de contacto também é usada para se confirmar a ocorrência da formação da SAM. O valor do ângulo de contacto estático permite verificar se ocorreu quimissorção do alcanotiol à superfície do ouro: se o valor do ângulo de contacto obtido for diferente do ângulo de contacto da superfície de ouro e próximo do valor de referência do grupo químico terminal do alcanotiol, então há indicação de que a quimissorção do alcanotiol à superfície de ouro possa ter ocorrido.

A goniometria de ângulos de contacto permite, ainda, estudar a adsorção de proteínas a uma superfície. Wilhelm Neumann e colaboradores mostraram que o estudo da variação temporal do ângulo de contacto estático de uma solução de proteínas colocada sobre uma superfície ( $\theta_s$ ) permitia obter informação sobre a adsorção dessas proteínas a essa superfície (Voigt *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1993), já que alterações na tensão interfacial superfície-solução de proteína relativamente ao sistema superfície-água são uma consequência direta da quantidade de proteína adsorvida à superfície e da sua conformação: no caso de ocorrer a adsorção de proteínas a uma superfície, o valor da tensão interfacial sólido-líquido diminui em consequência da adsorção de proteínas à superfície (Miller *et al.*, 1993). Para o cálculo da tensão interfacial sólido-líquido ( $\gamma_{SL}$ ), e também da tensão superficial do sólido ( $\gamma_{SV}$ ), Neumann e

colaboradores propuseram combinar a equação de Young (Equação 2), com a “equação de estado”, proposta pelo próprio Neumann. A equação de estado foi criada como um modo de se determinar a tensão interfacial sólido-líquido e a tensão superficial do sólido, que não podem ser medidas, a partir das outras duas únicas grandezas que podem ser medidas: a tensão superficial do líquido e o ângulo de contacto. Uma das formas da equação de estado apresenta-se abaixo (Equação 7), onde  $\gamma_{LV}$  corresponde à tensão superficial do líquido,  $\gamma_{SL}$  à tensão interfacial sólido-líquido,  $\gamma_{SV}$  à tensão superficial do sólido (Kwok e Neumann, 2000).

$$\cos\theta = -1 + 2 \sqrt{\frac{\gamma_{SV}}{\gamma_{LV}}} \quad (7)$$

Uma vez calculado o valor da tensão superficial do sólido, o valor da tensão interfacial sólido-líquido ( $\gamma_{SL}$ ) é determinado pela equação de Young (Equação 2), uma vez que são conhecidos todos os outros parâmetros necessários.

#### **1.4. Hemocompatibilidade de Superfícies Artificiais**

Entre os principais dispositivos médicos que contactam com o sangue incluem-se os cateteres, as próteses endovascular auto-expansíveis, as válvulas cardíacas artificiais, os dispositivos de suporte circulatório (*cardiopulmonary bypass*) e membranas de hemodiálise e de oxigenação. A eficiência terapêutica destes dispositivos é comprometida quando há ativação da coagulação sanguínea, podendo ser os pacientes alvo de complicações clínicas graves (Ratner, 2007). Desta forma, é necessário desvendar os processos bioquímicos

que ocorrem aquando da interação sangue-material para melhorar a hemocompatibilidade dos dispositivos.

A avaliação da hemocompatibilidade dos dispositivos biomédicos que entram em contacto com o sangue e dos materiais que os compõem é efetuada seguindo-se a norma ISO 10993-4:2009, intitulada "Avaliação Biológica dos Dispositivos Médicos – Parte 4: Seleção de Ensaios para Interações com Sangue" (ISO, 2009). Esta norma classifica estes dispositivos de acordo com o tipo de contacto com o sangue e, de acordo com essa classificação, fornece diretrizes relativas a categorias de testes ao qual o material deve ser submetido. As categorias de testes apresentadas pela norma são as seguintes: "trombose", "coagulação", "plaquetas", "hematologia" e "sistema de complemento". Para cada uma destas categorias são indicadas várias possibilidades de escolha relativamente aos ensaios bioquímicos a realizar. Neste trabalho pretendeu-se comparar duas superfícies-modelo quimicamente distintas – uma hidrofílica, polar e com carga eléctrica negativa e outra hidrofóbica, apolar, sem carga eléctrica – no que diz respeito a efeitos sobre a coagulação sanguínea, procurando-se seguir as indicações na norma ISO 10993-4:2009 relativas aos ensaios efectuados. Foram avaliados efeitos sobre a coagulação do sangue, em particular, sobre dois tempos de coagulação do plasma, e sobre a adesão de plaquetas.

#### **1.4.1. Coagulação Sanguínea**

Um dos maiores desafios da ciência dos biomateriais é a obtenção de materiais compatíveis com o sangue. Apesar dos longos anos de investigação na área, ainda não há um consenso relativamente a que materiais são compatíveis com o sangue. Nesta perspetiva, Buddy Ratner apontou as seguintes hipóteses para justificar aquilo a que chamou uma "catástrofe

intelectual”: a impossibilidade de se ter um material compatível com o sangue; a falta de conhecimento dos mecanismos biológicos por detrás da hemocompatibilidade; a incapacidade de testar e avaliar a compatibilidade dos materiais com o sangue; o facto de alguns materiais de origem natural parecerem apresentar uma melhor compatibilidade com o sangue, mas não sabermos como explorar esse facto e, por fim, o facto de nos últimos anos se ter conseguido obter melhores materiais hemocompatíveis mas não ter sido possível testá-los em ambiente médico, devido ao clima económico (Ratner, 2007).

A trombose induzida por biomateriais é um processo muito complexo e interligado com a resposta inflamatória. A par da ativação da coagulação, do sangue, ocorre também a ativação do sistema de complemento, das plaquetas e de algumas células do sistema imunitário, tal como neutrófilos e monócitos. A combinação destes processos biológicos torna o mecanismo da trombose induzida por biomateriais um processo altamente complexo e, em muito, desconhecido (Gorbert *et al.*, 2004).

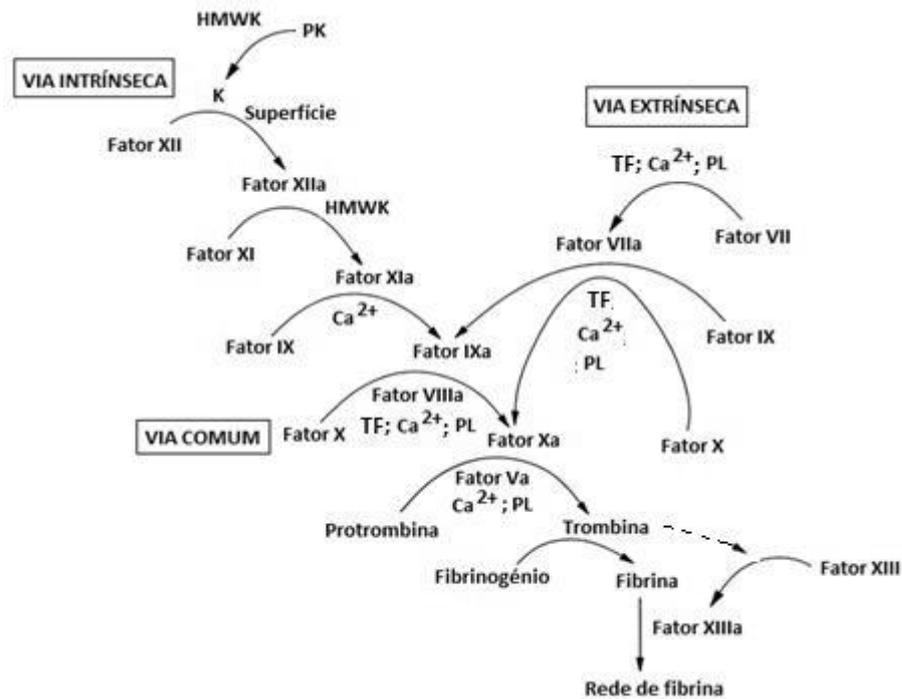
A cascata da coagulação, sequência de reações envolvidas na coagulação do sangue, pode ser ativada por duas vias distintas: pela via extrínseca ou pela via intrínseca. Ambas as vias convergem para a via comum, responsável pela polimerização do fibrinogénio, catalisada pela trombina, formando uma rede de fibrina. A coagulação do sangue induzida pelo contacto com superfícies artificiais depende diretamente da adsorção de proteínas do plasma, sendo as principais o fator XII (FXII), FXI, cininogénio de elevado peso molecular (HMWK) e a pré-caliceína (PK). Estas proteínas são as responsáveis pela ativação da via intrínseca da cascata da coagulação, cujo resultado final é a formação de uma rede de fibrina (coágulo).

A ativação por contacto da via intrínseca da coagulação, *in vitro*, é iniciada pela adsorção do FXII à superfície do biomaterial. Em superfícies com carga negativa, o processo que culmina na conversão de protrombina em trombina é iniciado pela chamada auto-ativação do FXII, que se passa a designar FXIIa na sua forma ativada (Luchtman-Jones e Broze, 1995). A auto-ativação do FXII é devida à adsorção ao material, da qual resulta uma alteração conformacional no fator. A complexação entre o FXII e o HMWK, que interage com a superfície de modo idêntico ao FXII, resulta na ativação do FXI e, simultaneamente, na ativação da PK (Kozin *et al.*, 1992).<sup>3</sup> O FXIa, juntamente com o HMWK e o íão cálcio, catalisam a conversão do FIX ao FIXa. Por sua vez, o FIXa, o íão cálcio ativam o FX, que passa a ser designado por FXa. O FXa, o fator FVa, o íão cálcio e os fosfolípidos plaquetários são responsáveis pela ativação da protrombina, passando a designar-se trombina. Nas plaquetas ativadas, ocorre a translocação de fosfolípidos carregados negativamente para a superfície da membrana, tais como a fosfatidilserina, que se liga ao FX, FXa e FVII, funcionando com um regulador alostérico, isto é, promove a alteração da estrutura da enzima, ativando as reações de coagulação (Ren *et al.*, 2010).

A trombina, a enzima presente na etapa final da coagulação, cliva o fibrinogénio, designado por FI, em monómeros de fibrina, FIa. Por ação do FXIIIa ocorre a formação de uma rede de fibrina reticulada, permitindo a reparação da parede do vaso sanguíneo danificado (Kozin *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2007). A formação da rede de fibrina em dispositivos médicos compromete a sua funcionalidade. Tem sido demonstrado em diversos estudos que a formação do coágulo nos biomateriais depende diretamente do FXIIa (Chen *et al.*, 2007; Schulman *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 2002) (Fig. 10).

---

<sup>3</sup> Sabe-se, atualmente, que a diferença na ativação por contacto da cascata da coagulação em materiais hidrofílicos e hidrofóbicos, não depende da carga negativa da superfície mas da capacidade das proteínas do plasma adsorverem à superfície. Superfícies hidrofóbicas, que adsorvem uma grande quantidade de proteínas do plasma, não ativam a coagulação; por outro lado, superfícies hidrofílicas, que adsorvem uma baixa quantidade de proteínas, ativam a coagulação do sangue (Leibner *et al.*, 2009).



**Figura 10** – Esquema simplificado da cascata da coagulação. Via intrínseca, com início na ativação do FXII, e via extrínseca, com início na ativação do FVII pelo fator tecidual, convergindo para a via comum por ativação do FX. HMWK – cininogénio de elevado peso molecular; K – caliceína; PK – pré-caliceína; PL – fosfolípidos plaquetários e TF- fator tecidual (adaptado de Ilesanmi, 2010).

#### 1.4.2. Ativação da Via Extrínseca da Cascata da Coagulação

A via extrínseca da coagulação é iniciada pelo fator tecidual (TF), também designado de tromboplastina ou FIII, uma proteína transmembranar presente nos tecidos, que formam os vasos sanguíneos, e nos leucócitos, que permite diminuir a hemorragia quando ocorre dano físico nos vasos sanguíneos, por ativação desta via de coagulação do sangue. Quando ocorre uma lesão vascular, o TF é exposto à superfície da membrana das células endoteliais em contacto com o sangue, formando um complexo com o FVIIa que, juntamente com o íon cálcio permite a clivagem do FX e a sua conversão no FXa (Camerer *et al.*, 1996). Por sua vez, o FXa converte a protrombina (FII) em trombina (FIIa) que, por sua vez, converte o fibrinogénio (FI) em fibrina. Posteriormente, ocorre

a formação de uma rede de fibrina reticulada, sendo esta reação catalisada pelo FXIIIa (Rauch *et al.*, 2000) (Fig. 10).

A sequência de reações até aqui descrita diz respeito à sequência de reações *in vitro*. A sequência de reações *in vivo* não é totalmente conhecida mas, alguns autores referem que a coagulação do sangue, em casos de lesão vascular, é iniciada pela via extrínseca, sendo posteriormente ativada a via intrínseca sem envolvimento da ativação por contacto (a não ser que esteja presente alguma superfície estranha), de forma a amplificar o processo (Mackman *et al.*, 2007). A relevância clínica da via intrínseca da coagulação *in vivo* tem sido questionada, uma vez que indivíduos sem o FXII não sofrem hemorragias graves (Schmidbauer *et al.*, 2009). Este efeito poderá dever-se ao facto do FXIIa regular a ligação de trombina à glicoproteína Ib (GP Ib-IX-V) nas plaquetas, de forma a controlar a extensão da agregação das plaquetas *in vivo* (Bradford *et al.*, 2000).

Sem controlo, a coagulação afetaria todo o aparelho circulatório. De forma a prevenir a coagulação indesejável, o sangue contém várias anticoagulantes (heparina, antitrombina, prostaciclina, entre outros), que impedem os fatores de coagulação de iniciar a formação de coágulos. Na zona da lesão vascular, são ativados uma grande quantidade de fatores de coagulação, de tal forma que os anticoagulantes são incapazes de evitar a formação do trombo, mas à medida que nos afastamos do local da lesão, os fatores de coagulação ativados são diluídos no sangue, sendo os anticoagulantes capazes de os neutralizar, impedindo a coagulação (Esmon, 1987).

As alterações na cascata da coagulação do sangue podem ser estudadas através de ensaios clínicos específicos para avaliar a coagulação pela via intrínseca ou pela via extrínseca. O tempo de tromboplastina parcial ativada

(APTT) é um teste de rastreio da coagulação pela via intrínseca, permitindo detetar efeitos sobre os FXII, FXI, FIX, FVIII, FX, FV, FII e FI. Clinicamente, é utilizado na deteção de deficiências congénitas e adquiridas, assim como na monitorização de terapêutica anticoagulante com heparina não fracionada (Langdell *et al.*, 1953; Triplett *et al.*, 1978). O ensaio clínico consiste na adição de uma mistura de cefalina (um substituto plaquetário) e de uma suspensão de caulino (um ativador do fator XII) a uma amostra de plasma obtida a partir de sangue recolhido em citrato (um sequestrante de  $\text{Ca}^{2+}$ ), que é incubada durante exatamente 3 minutos a 37 °C. Posteriormente, a recalcificação por adição de cloreto de cálcio permite a ocorrência da sequência de reações que envolvem  $\text{Ca}^{2+}$ , originando a formação de um coágulo de fibrina, cujo aparecimento pode ser detetado, p. ex., por turbidimetria. O tempo decorrido entre adição de cloreto de cálcio e a formação do coágulo corresponde ao tempo de tromboplastina parcial ativada (Langdell *et al.*, 1953; Larrieu M.J. e Weilland C, 1957). Na avaliação de efeitos de materiais sobre a via intrínseca da coagulação do sangue usa-se o tempo de tromboplastina parcial (PTT) em vez do APTT (ISO 10993-4:2009). Trata-se de um ensaio em tudo semelhante ao APTT com a diferença de não se usar um ativador exógeno (o caulino), já que poderia não permitir detetar o efeito ativador da superfície que pretendemos avaliar, sobrepondo-se a ele.

Para se avaliar a ativação da via extrínseca, pode determinar-se o tempo de protrombina (PT). Trata-se de um ensaio clínico que permite avaliar efeitos sobre os FII, FV, FVII, FX e fibrinogénio. Também é usado para monitorizar a terapêutica com anticoagulantes orais inibidores da vitamina K, como a varfarina. O tempo de protrombina mede o tempo necessário para que ocorra a coagulação do plasma sanguíneo, após a adição ao plasma de um extrato de cérebro de coelho num tampão contendo estabilizadores, cloreto de cálcio e o fator tecidual, que por sua vez, ativa o FVII da via extrínseca da coagulação,

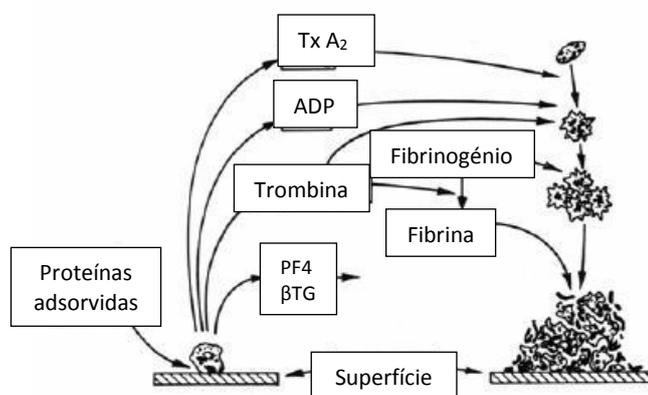
cujo resultado final é a formação de uma rede de fibrina reticulada (Quick, 1939; Quick, 1942).

### **1.4.3. Adesão e Ativação das Plaquetas à Superfície dos Biomateriais**

As plaquetas são células não nucleadas, com um diâmetro médio de 3 a 4  $\mu\text{m}$  e uma forma discoide. São produzidas na medula óssea e a sua concentração média no sangue está compreendida entre as 150 000 e 450 000 por microlitro de sangue (Neame *et al.*, 1980). Têm como função a formação de um tampão em vasos sanguíneos danificados, catalisam as reações de coagulação e participam na resposta inflamatória, pela libertação de mediadores químicos da inflamação (Ratner, 2004).

A ativação de plaquetas desempenha um papel determinante na coagulação sanguínea e nas reações imunológicas que surgem como resposta à presença dos biomateriais (Heemskerk *et al.*, 2002). As plaquetas *in vivo* são ativadas após aderirem diretamente ou indiretamente (por via do vWF) ao colagénio, exposto devido à lesão vascular, ou quando expostas a outros ativadores, como a trombina, a adrenalina e a adenosina difosfato (ADP) (Zarbock *et al.*, 2007). As plaquetas ativadas libertam mediadores químicos, alteram a sua forma, expressam recetores à superfície da membrana e sofrem translocação de fosfolípidos carregados negativamente para a superfície da membrana, (e.g. fosfatidilserina), catalisando as reações de coagulação e estabilizando o tampão plaquetário (Ren *et al.*, 2010). A alteração da composição química da membrana das plaquetas promove a libertação do conteúdo de grânulos intracelulares, que contêm os fatores de coagulação FVII e FXI, tromboxano  $A_2$ , ADP,  $\beta$ -tromboglobulina, moléculas de adesão como a selectina-P e o vWF, o fator plaquetário 4 (PF4) e a serotonina, promovendo a

ativação e agregação de outras plaquetas, resultando formação do trombo (Fig. 11) (Colman *et al.*, 1994).

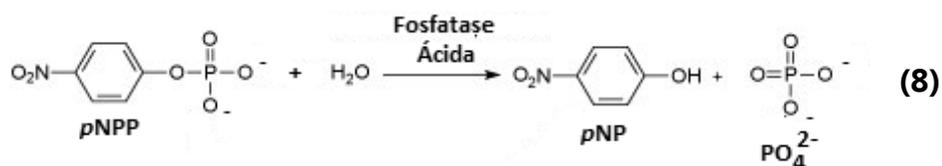


**Figura 11** – Esquema da adesão e ativação das plaquetas em contato com uma superfície artificial levando à formação de um tampão plaquetário e da rede de fibrina (trombo) (adaptado de Ratner, 2004).

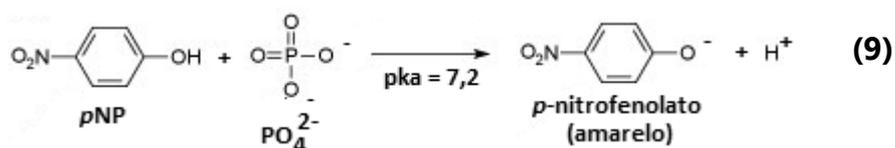
A adesão e ativação das plaquetas devido ao contacto com um biomaterial depende das proteínas adsorvidas à superfície. A adsorção de fibronectina, do vWF, de colagénio e de fibrinogénio às superfícies promove a adesão de plaquetas, uma vez que estas células possuem recetores adesivos com afinidade para estas proteínas (Grunkemeier *et al.*, 2000). Os recetores GP IIb/IIIa e GP Ib são os que existem em maior densidade à superfície das plaquetas. O recetor GP IIb/IIIa permite a adesão das plaquetas ao fibrinogénio, ao vWF, e ficando exposto na superfície das plaquetas devido a uma mudança na sua conformação, em consequência da ativação da plaqueta. Para além de ser um recetor adesivo das plaquetas, também é um recetor que permite a agregação de plaquetas (ligação plaqueta-plaqueta), através de uma molécula de fibrinogénio (Phillips *et al.*, 1988). A glicoproteína GP Ib, presente nas plaquetas, medeia a adesão do vWF, produzida pelo endotélio vascular, possibilitando a ligação ao colagénio exposto em vasos sanguíneos onde tenha

ocorrido uma lesão vascular, ou adsorvido na superfície dos biomateriais (Shen *et al.*, 2000). A trombina também é responsável pela ativação do recetor da GP Ib, promovendo a adesão, a agregação e a ativação das plaquetas, produzindo mais trombina. O recetor GP Ib promove a ativação das plaquetas, mesmo em baixas concentrações de trombina (Adam *et al.*, 2003).

Os efeitos dos biomateriais sobre as plaquetas podem ser estudados por diversos modos (ISO, 2002): por contagem de plaquetas aderentes à superfície, após visualização por microscopia eletrónica de varrimento ou microscopia de fluorescência (Goodman, 1999; Frank *et al.*, 2000), avaliação da agregação de plaquetas, quantificação de marcadores específicos da ativação das plaquetas, tais como o PF4, tromboxano B2 e  $\beta$ -TG, entre outros. Neste trabalho, estudou-se a adesão de plaquetas empregando o ensaio da fosfatase ácida para quantificar as plaquetas aderentes às superfícies utilizadas (Bellavite *et al.*, 1993). As fosfatases são enzimas que removem grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) de um grande número de moléculas, nomeadamente de nucleótidos e proteínas, estando presentes em diversas células, incluindo as plaquetas (Wagner e Yourke, 1955). O *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) é um substrato cromogénico para a fosfatase ácida. A fosfatase ácida cataliza a clivagem do grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) do *p*NPP, obtendo-se o *p*-nitrofenol (*p*NP) e um grupo fosfato livre (Equação 8).



O *p*NP é um produto solúvel, de coloração amarela sob condições alcalinas, que é quantificado a 405 nm (Equação 9).



O ensaio da fosfatase ácida permite quantificar o número de plaquetas aderentes a uma superfície após contacto entre a superfície e uma suspensão de plaquetas, através de uma curva de calibração ou em termos relativos, ainda que não forneça informação acerca do estado de ativação das plaquetas aderentes à superfície.

SAMs de alcanotíóis sobre ouro com diferentes grupos terminais (-OH, CH<sub>3</sub> e -COOH) e mistas, foram utilizadas em estudos de adesão de plaquetas. Os resultados obtidos indicam que nas SAMs com características hidrofóbicas as plaquetas aderem em grande número. Ao invés, nas SAMs com características hidrofílicas, o número de plaquetas aderentes à superfície é menor (Sperling *et al.*, 2005).

O efeito da molhabilidade das superfícies sobre a adesão e ativação de plaquetas foi estudado usando SAMs mistas de alcanotíóis (-CH<sub>3</sub> e -OH) com diferentes comprimentos. De forma a estudar o efeito de algumas proteínas adsorvidas às superfícies na adesão e ativação de plaquetas, os autores incubaram o plasma rico em plaquetas (PRP) numa SAM sem proteínas adsorvidas e numa SAM com proteínas adsorvidas, nomeadamente, uma SAM com fibrinogénio adsorvido, outra com albumina sérica humana (HSA) adsorvida e outra que tinha estado em contacto com plasma (Rodrigues *et al.*, 2006). Os resultados obtidos demonstram uma redução linear da adsorção de fibrinogénio em SAMs com uma maior percentagem de grupos hidrofílicos. Verificaram também que, a adesão e ativação de plaquetas diminuía com o aumento da hidrofilicidade da superfície e que o efeito de passivação da HSA na adesão e ativação de plaquetas ocorria em SAMs puras com grupos terminais hidroxilo. Nas SAMs imersas em plasma, verificaram que a adesão de plaquetas é praticamente nula nas SAMs mistas (-CH<sub>3</sub>, -OH), com uma maior percentagem de grupos hidrofílicos, e nas SAMs puras com grupos terminais

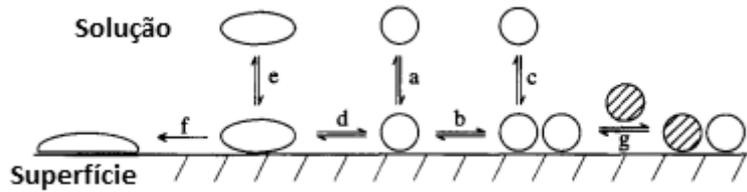
hidroxilo. Estes resultados podem ser explicados, pela maior afinidade da HSA à SAM mista (-CH<sub>3</sub>, -OH), com uma maior percentagem de grupos hidrofílicos, e uma adsorção de proteínas totais mais baixa associada com a SAM pura de com grupos terminais hidroxilo.

A adesão de plaquetas à superfície dos biomateriais depende da adsorção de fibrinogénio à superfície. Os resultados obtidos por Sivaraman e Latour, indicam que a adesão de plaquetas correlaciona-se fortemente com as alterações conformacionais induzidas no fibrinogénio aquando da sua adsorção à superfície. As mudanças conformacionais provocam a exposição de motivos de ligação de plaquetas no fibrinogénio, que de outra forma (e.g. solução nativa do fibrinogénio) não estariam acessíveis aos recetores das plaquetas (Sivaraman e Latour, 2010).

Os leucócitos também aderem aos biomateriais em vários tipos de terapêuticas como a hemodiálise, hemofiltração, circulação extracorporeal (*bypass*), sendo ativados por esse contacto (Yung *et al.*, 1999; Gorbett *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2003).

#### **1.4.4. Adsorção de Proteínas do Plasma à Superfície dos Biomateriais**

O processo de adsorção de proteínas a superfícies é complexo, mesmo nos casos mais simples da adsorção de uma proteína a uma superfície uniforme. Em superfícies heterogéneas, a presença de microambientes diferentes traduz-se em múltiplas alterações na conformação das proteínas adsorvidas (Fig. 12).



**Figura 12** – Esquema simplificado de um modelo representativo do processo de adsorção de uma proteína a uma superfície. (a) Adsorção da proteína à superfície, dissociação e retorno à solução; (b) desnaturação reversível e alteração na conformação da proteína; (c) dissociação da superfície da proteína desnaturada; (d) desnaturação da proteína que resulta na adsorção irreversível; (e) mobilidade lateral da proteína e alteração da sua orientação; (f) permuta de proteínas em solução (adaptado de Mrksich *et al.*, 1996).

Quando o sangue contacta com um biomaterial, numa primeira fase, ocorre a adsorção de moléculas de água e de solutos de baixo peso molecular à superfície, seguindo-se a adsorção de proteínas do plasma. A adsorção de proteínas a uma superfície relaciona-se com a adesão celular já que, uma vez adsorvidas à superfície, as proteínas adsorvidas permitem que as células adiram facilmente à monocamada proteica, através de proteínas transmembranares (Wittmer *et al.*, 2005). A adesão de leucócitos e plaquetas é também determinada pela monocamada de proteínas adsorvidas. As proteínas mais importantes que promovem adesão celular são o fibrinogénio, o fator de von Willebrand (vWF), o colagénio e a vitronectina (Grunkemeier *et al.*, 2000). A adesão celular correlaciona-se com a quantidade de proteína adsorvida à superfície, mas também com a conformação, a orientação e a funcionalidade da proteína. Alguns estudos demonstram que, na adesão de plaquetas, a conformação e orientação do fibrinogénio são fatores mais relevantes do que a quantidade da proteína adsorvida (Hylton *et al.*, 2005).

A adsorção de proteínas à superfície do biomaterial depende das características físico-químicas tanto da superfície da proteína como da superfície do material, tais como a carga, polaridade e

hidrofilicidade/hidrofobicidade. Nas superfícies hidrofóbicas, há uma grande adsorção de proteínas, ao invés do que acontece nas superfícies hidrofílicas. Este fenómeno é explicado pelas interações menos favoráveis entre as superfícies hidrofóbicas e a água, sobrepondo-se as interações superfície-proteínas. Nas superfícies hidrofílicas, as interações entre a superfície e as moléculas de água são relativamente fortes, formando-se uma camada de água interfacial fortemente ligada à superfície, impedindo o estabelecimento de interações superfície-proteínas (Vogler, 1998).

O tipo de superfície também afeta a adsorção de proteínas e as reações biológicas subsequentes. Em SAMs com grupos químicos terminais metilo e carboxilo, incubadas com uma solução de fibrinogénio e trombina, em que a trombina cliva o fibrinogénio em fibrinopeptídeos, que possibilitam a formação de fibrina, verificou-se que a quantidade de fibrinogénio adsorvido em ambas as superfícies foi a mesma, mas a formação de fibrina foi menor na superfície com carga negativa (Evans-Nguyen *et al.*, 2005).

A adsorção de proteínas às superfícies dos biomateriais, também pode afetar alguns aspetos da resposta imunitária, em particular, o sistema de complemento. A ativação do sistema de complemento devido ao contato com biomateriais é uma questão de grande interesse na área da hemocompatibilidade de materiais, tendo sido usadas SAMs para estudar o efeito de diversos parâmetros, tais como a hidrofilicidade/hidrofobicidade, polaridade, entre outros, na ativação do sistema de complemento (Sperling *et al.*, 2005; Cornelius *et al.*, 2011).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Monocamadas Auto-Estruturadas (SAMs)

#### 2.1.1. Preparação das SAMs

Foram preparadas soluções do ácido 11-mercapto-1-undecanoico (*Sigma Aldrich*, Alemanha) e de 1-undecanotiol (*Sigma Aldrich*, Alemanha) com a concentração de 1 mM em etanol absoluto (*Fisher Chemical*, Inglaterra).

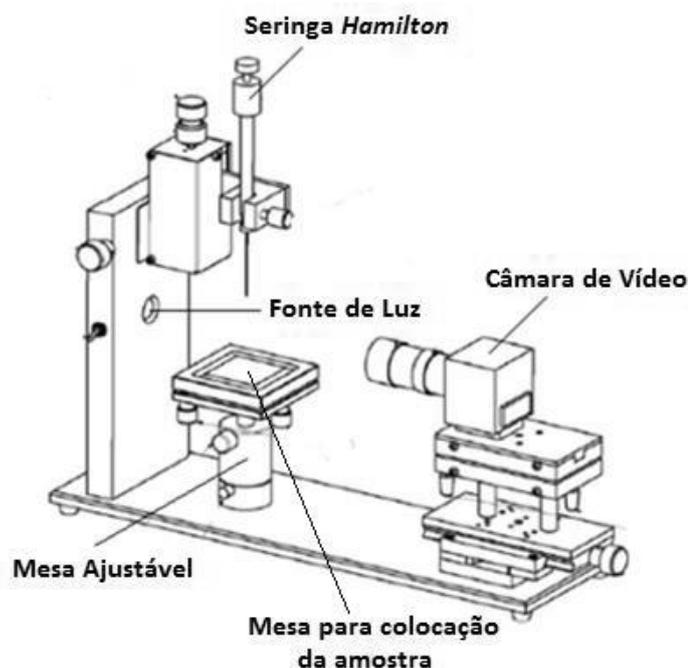
Os substratos de ouro utilizados na formação das monocamadas provieram de *Compact Disc* (CDs) de ouro virgens (MAM-A, EUA). Os CDs foram previamente cortados em placas aproximadamente retangulares de dimensões 5 x 3 cm. Para remover o revestimento que protege a superfície de ouro do CD, as placas foram imersas numa solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) a 65%, em volume, durante cerca de 25 s, a uma temperatura nunca inferior a 20 °C. Em seguida, foram imediatamente imersas em água MilliQ (preparada num sistema *Millipore Simplicity*, *Molshem*, França) até a superfície de ouro se apresentar completamente exposta. Seguidamente, o substrato de ouro foi colocado na vertical, segurado com uma pinça e lavado com água MilliQ e etanol absoluto, direcionando o jato de solvente de cima para baixo, de modo a evitar a contaminação da superfície por resíduos que possam existir na pinça. A zona da placa em contacto com a pinça foi sempre a mesma, situando-se numa das extremidades e longe da zona que foi estudada.

As SAMs foram preparadas por imersão do substrato de ouro na solução do alcanotiol 1 mM em etanol absoluto, durante 2 h e a uma temperatura nunca inferior a 20 °C, estando a parte que contacta com a pinça fora do solvente. Findo o período de incubação na solução do alcanotiol, procedeu-se à lavagem da SAM com etanol absoluto, procedendo como já referido na secção 2.1.1. No

caso do ácido 11-mercapto-1-undecanoico (MUA), dissolveu-se numa solução de etanol absoluto acidificado com ácido clorídrico concentrado (até possuir um valor de pH igual a 2), tendo a lavagem da SAM sido feita com este etanol absoluto acidificado. De seguida, a SAM foi colocada na vertical num copo com etanol absoluto (etanol absoluto acidificado, no caso da SAM de MUA), que se encontrava num banho de ultrassons (*Ultrasonic Cleaner, VWR, EUA*) e sonicada, estando a parte que contacta com a pinça fora do solvente, durante 15 s (3 min no caso da SAM de MUA). Por fim, lavou-se com água desionizada procedendo tal como referido na secção 2.1.1. Nos vários ensaios realizados neste trabalho, as diferentes SAMs (UDT e MUA) foram produzidas em triplicado.

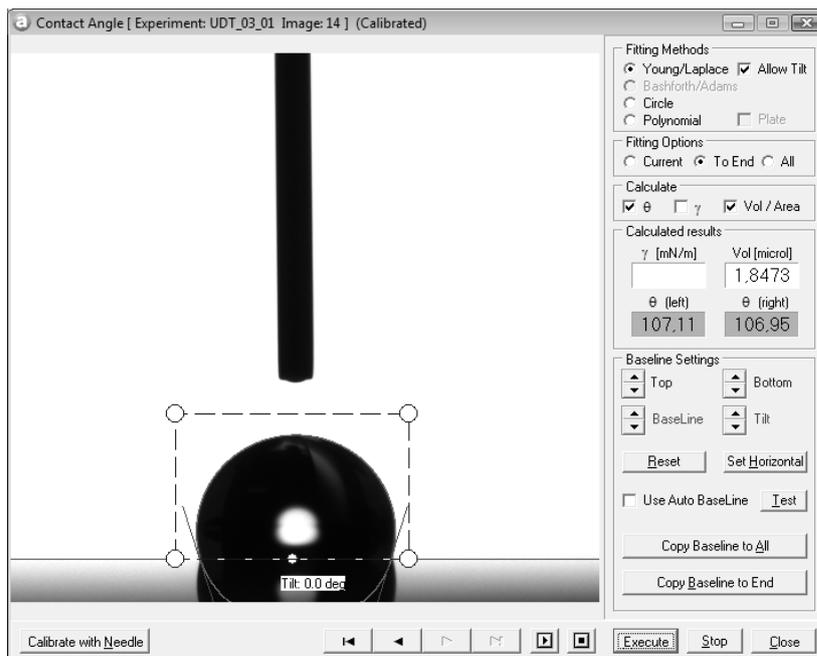
## **2.2. Caracterização da Superfície das SAMs por Goniometria de Ângulos de Contacto**

O ângulo de contacto exibido por gotas de água colocadas sobre as superfícies estudadas foi determinado usando um goniómetro KSV CAM 101 (*KSV Instruments, Filândia*). O equipamento é constituído por uma seringa *Hamilton* contendo água MilliQ, uma mesa mecânica ajustável onde a amostra é colocada, uma câmara de vídeo e uma fonte de luz (Fig. 13), tendo sido calibrado conforme as indicações do fabricante.



**Figura 13** – Descrição do goniómetro KSV CAM 101 (adaptado de KSV, 2006).

Após a deposição de uma gota de água sobre a superfície, é iniciada a aquisição de imagens de forma manual ou automática, durante um certo intervalo de tempo, pelo *software* do goniómetro (*Attension Theta v.4.1.0*). As imagens obtidas, são posteriormente digitalizadas e analisadas com o *software*, de forma a obter-se o valor do ângulo de contacto  $\theta$ . A forma geométrica das gotas de água foi analisada por ajuste automático de uma curva ao perfil da gota, utilizando a equação de Young-Laplace. Por meio do *software Attension Theta v.4.1.0 (Biolin, Scientific, Filândia)*, o goniómetro digitaliza a imagem da gota. Após se identificar manualmente a linha de base da gota, a partir da curva ajustada ao perfil da gota, o *software* calcula as suas dimensões e o seu volume e, traçando uma linha tangente à superfície da gota que passa no ponto de intersecção das três fases, calcula o ângulo de contacto no lado direito e no lado esquerdo da gota. A média destes dois valores é tomada como o valor do ângulo de contacto da gota em análise (Fig. 14).



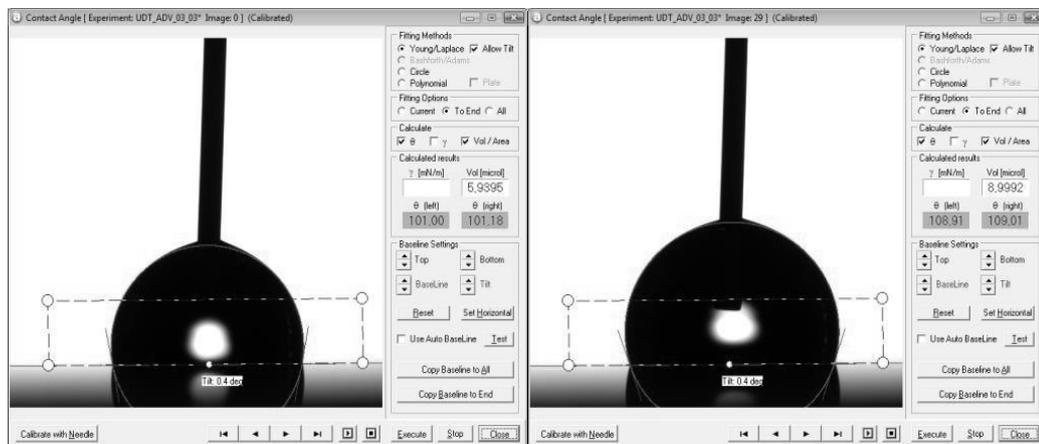
**Figura 14** – Ilustração da determinação do ângulo de contacto pelo *software Attension Theta* (v.4.1.0).

### 2.2.1. Medição do Ângulo de Contacto Estático

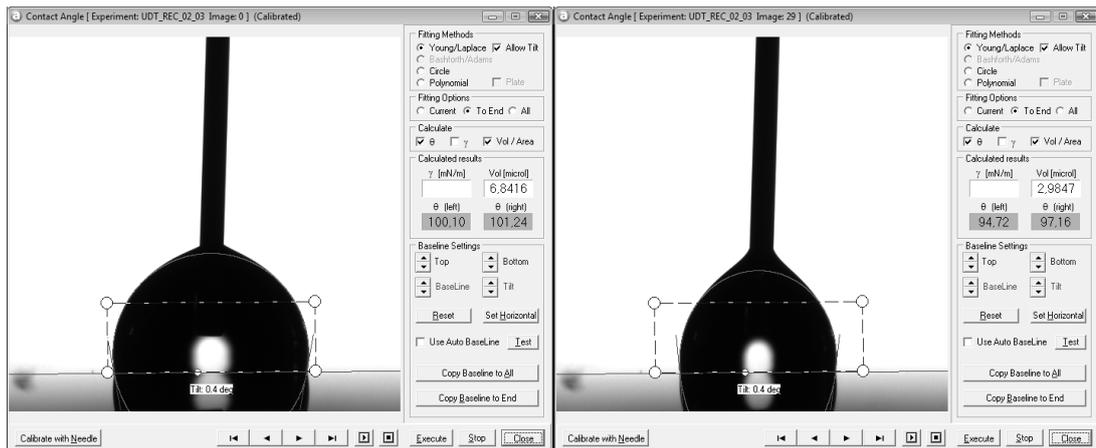
O ângulo de contacto estático ( $\theta_s$ ) das superfícies foi determinado usando uma gota estática de água colocada sobre a superfície. A seringa foi posicionada a uma distância vertical fixa em relação à superfície, colocando-se uma gota de cerca de 3  $\mu\text{L}$  de água MilliQ sobre a superfície. Imediatamente após adição da gota de água à superfície, foram adquiridas imagens a uma taxa de uma imagem por segundo, durante 15 s. Os 15 s de aquisição de imagens servem para que o ângulo de contacto atinja o *plateau*, sendo que o valor do ângulo de contacto estático da gota corresponde ao valor médio do ângulo de contacto medido ao longo dos 15 s, ou seja, durante o *plateau*. Tomou-se como valor do ângulo de contacto estático da superfície a média do ângulo de contacto estático medido em 3 superfícies iguais, sendo que em cada superfície o ângulo de contacto foi determinado em 5 locais diferentes.

## 2.2.2. Medição do Ângulo de Contacto Dinâmico

Na determinação do ângulo de contacto dinâmico, quer em avanço ( $\theta_a$ ), quer em retrocesso ( $\theta_r$ ), colocou-se uma gota de água MilliQ com um volume aproximado de 6  $\mu\text{L}$  sobre a superfície. A agulha da seringa foi inserida no interior da gota de forma a poder variar-se o volume da gota, aumentando-o ou diminuindo-o, consoante o ângulo de contacto dinâmico pretendido. Em simultâneo, adquiriu-se um total de 30 imagens com um intervalo de 512 ms. Na determinação do ângulo de contacto em avanço, fez-se avançar a gota de água sobre a superfície, aumentando o seu volume por adição de água a uma velocidade constante (Fig. 15); no caso do ângulo de contacto em retrocesso, fez-se retraindo a gota sobre a superfície, diminuindo o seu volume por remoção de água a uma velocidade constante (Fig. 16).



**Figura 15** – Exemplificação da medição do ângulo de contacto em avanço de uma gota de água MilliQ depositada sobre a SAM de UDT. Com a seringa Hamilton aumenta-se, lentamente e continuamente o volume da gota, obrigando-a a avançar sobre uma SAM de UDT.

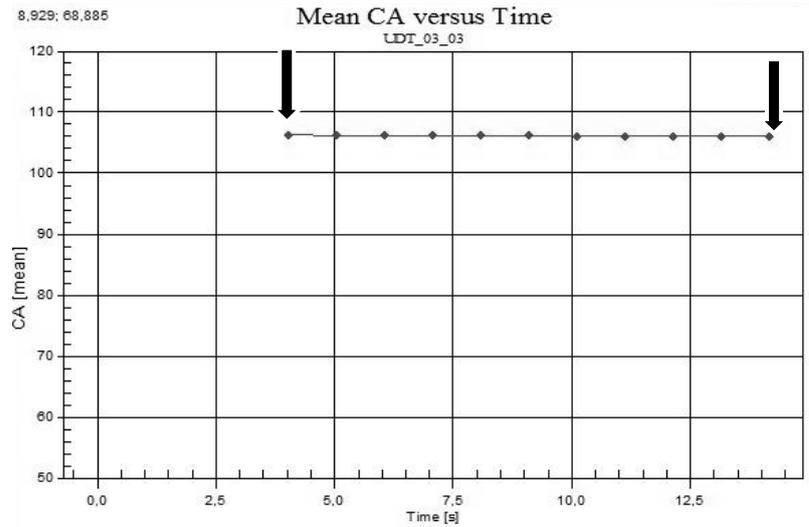


**Figura 16** – Exemplificação da medição do ângulo de contacto em retrocesso de uma gota de água MilliQ depositada sobre uma SAM de UDT. Com a seringa Hamilton, diminui-se, lentamente e continuamente o volume da gota, obrigando-a a retroceder sobre o substrato.

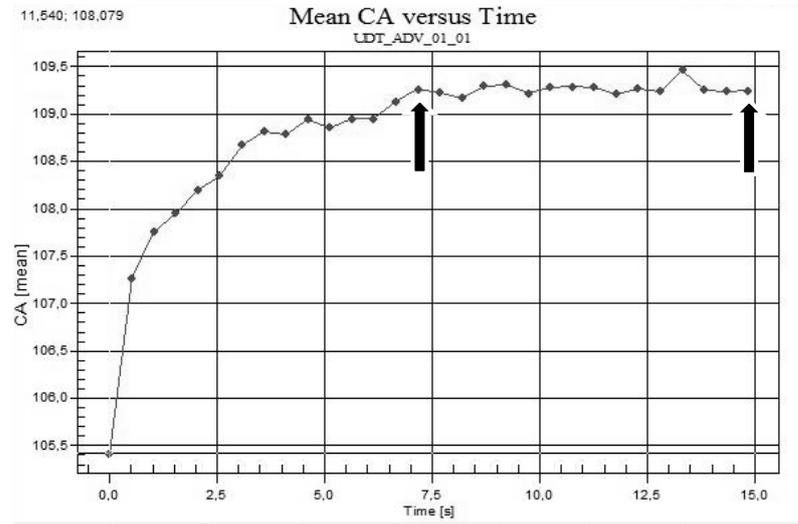
O valor medido para o ângulo de contacto estático para as diferentes superfícies corresponde ao valor médio do ângulo de contacto medido ao longo de um intervalo de tempo de 15 s, uma vez que a variação do ângulo de contacto estático ao longo do tempo é praticamente nula (Fig. 17A). O valor apresentado como o ângulo de contacto dinâmico para as diferentes superfícies é o valor médio dos valores do ângulo de contacto medidos ao longo de um intervalo de tempo quando, graficamente, se atinge um *plateau* quando se representa o ângulo de contacto em função do tempo (Fig. 17B e C).

As medições do ângulo de contacto nas diferentes superfícies foram feitas em três réplicas de cada superfície e, em cada uma destas réplicas, foram feitas cinco medições em diferentes posições.

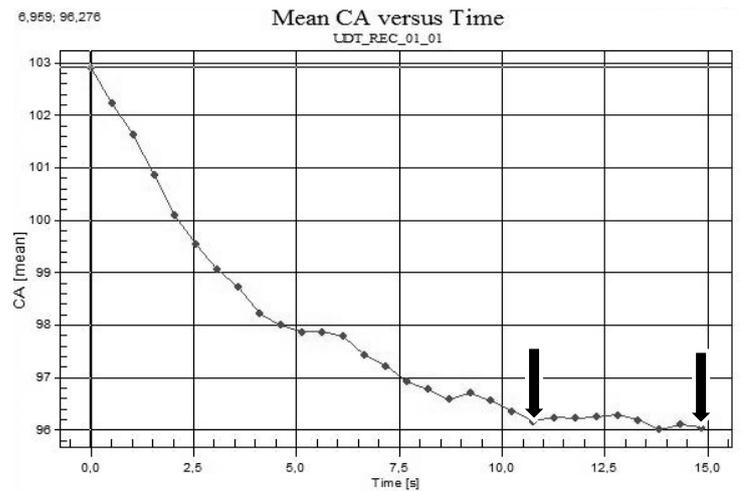
A)



B)



C)



**Figura 17** – Representação gráfica da variação do ângulo de contacto estático (A) em avanço (B) e em retrocesso (C) em função do tempo. As setas a preto indicam a zona do *plateau* usada no cálculo do valor médio do ângulo de contacto.

## **2.3. Avaliação da Hemocompatibilidade**

### **2.3.1. Tempo de Tromboplastina Parcial (PTT)**

Determinou-se o tempo de tromboplastina parcial de plasma sanguíneo humano em contacto com as diferentes SAMs. O plasma humano foi amavelmente cedido pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP, de Coimbra, sendo proveniente de sangue recolhido em citrato-fosfato-dextrose (CPD).

#### **Reagentes Utilizados**

Preparou-se uma solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) por dissolução de uma pastilha de PBS (*Calbiochem – Merck Millipore*, EUA) em 1 L de água MilliQ. A solução de PBS contém 140 mM de cloreto de sódio, 10 mM de fosfato de sódio e 3 mM de cloreto de potássio, a pH 7,4. Preparou-se, também, uma solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 25 mM em água MilliQ. O substituto plaquetário utilizado foi a cefalina, também designada tromboplastina parcial, reconstituída com 2 mL de PBS, seguindo as instruções do fabricante, que fazia parte do *kit* C. K. Prest (*Roche Diagnostic*, Alemanha) para determinação do APTT.

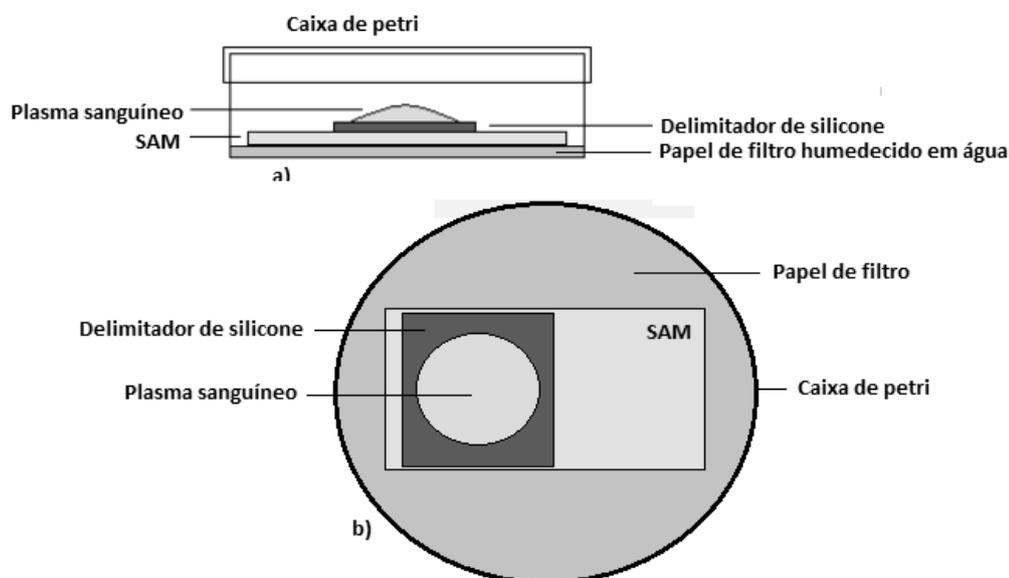
#### **Controlos**

Como controlo negativo do ensaio, utilizou-se plasma sanguíneo em contacto com o interior de um *ependorf*, uma vez que o material que o constitui não induz a coagulação do plasma. O controlo positivo consistiu em plasma em contacto direto com uma lâmina de vidro (*Thermo Scientific*, Inglaterra), uma vez que o vidro é um material trombogénico. As lâminas de

vidro foram lavadas no próprio dia do ensaio (de modo a minimizar a adsorção de contaminantes atmosféricos) por sonicação em etanol absoluto durante 5 min, seguida de uma lavagem com um jato de etanol absoluto, nova sonicação em água MilliQ durante 5 min e, finalmente, uma lavagem com um jato de água MilliQ.

### Contacto Superfície – Plasma

De forma a delimitar de modo exato e reproduzível a área de contacto entre o plasma sanguíneo e as diferentes superfícies, definiu-se uma área circular de 4,91 cm<sup>2</sup> (diâmetro: 2,5 cm) utilizando delimitadores de silicone para cultura de células (*Fastwells<sup>TM</sup>*, *Sigma-Aldrich*, EUA). Posteriormente, as superfícies foram colocadas numa caixa de Petri tapada contendo um disco de papel de filtro humedecido com água, de forma a evitar a evaporação do plasma durante o ensaio (Fig. 18).



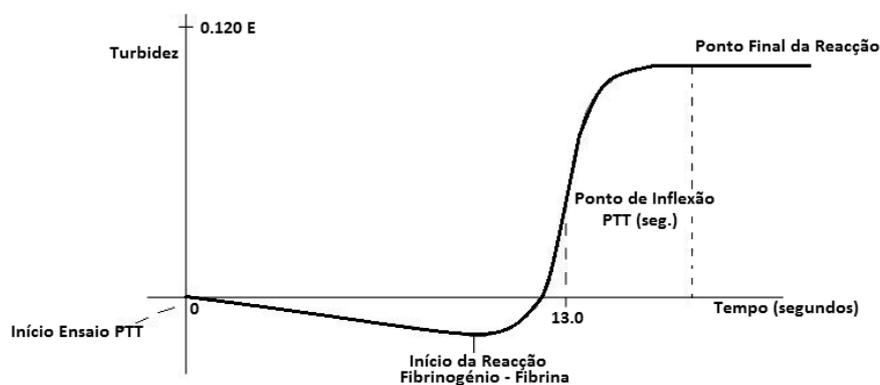
**Figura 18** – Esquema ilustrativo de uma caixa de Petri contendo uma SAM em contacto com plasma sanguíneo na área delimitada pelo delimitador de silicone. a) Vista lateral da caixa de Petri; b) vista superior da caixa de Petri.

As caixas de Petri e o *ependorf* destinado ao controlo negativo, foram pré-incubadas a 37 °C durante 10 min, de modo a estarem àquela temperatura quando fossem utilizados. Quando se procedeu ao ensaio de cada uma das três réplicas da SAM, cada uma foi ensaiada simultaneamente com os controlos negativo e positivo. Para isso, no interior do delimitador, adicionou-se 500 µL de plasma sanguíneo humano pré-aquecido a 37 °C, sendo as amostras incubadas durante 30 min a 37 °C, numa estufa. Após o período de incubação, recolheram-se 75 µL de plasma para cinco *ependorfs* diferentes, que foram imediatamente colocados em gelo por um período mínimo de 20 min., de modo a parar ou a diminuir consideravelmente todos os processos em curso.

### **Determinação do PTT**

Terminado o período de incubação em gelo, determinou-se o tempo de tromboplastina parcial. Para isso, as amostras em gelo foram colocadas uma a uma num banho a 37 °C, durante 5 min. A uma *cuvette* do coagulómetro pré-aquecida a 37 °C, adicionou-se 25 µL do plasma sanguíneo e 25 µL de cefalina reconstituída em PBS (seção 2.3.1), também pré-aquecida, incubando-se a mistura, exatamente 3 min a 37°C no coagulómetro. Após este tempo, adicionou-se 25 µL de CaCl<sub>2</sub> 25 mM, desencadeando a coagulação do plasma. A sequência das amostras durante a determinação do PTT foi alterada, de ensaio para ensaio, de modo a que os diferentes tempos de incubação das amostras em gelo não tivessem influência no PTT do plasma sanguíneo. A sequência da determinação do PTT das amostras de plasma foi a seguinte: a) controlo positivo – SAM – controlo negativo; b) SAM – controlo positivo – controlo negativo; c) controlo negativo – controlo positivo – SAM; d) controlo positivo – controlo negativo – SAM e, e) SAM – controlo negativo – controlo positivo.

O PTT foi determinado num coagulómetro *Coatron M1 C1.20*, modificado pelo fabricante de modo a permitir medir tempos de coagulação até 999 s (*TECO GmbH*, Alemanha), que mede o tempo decorrido entre adição de  $\text{CaCl}_2$  e a formação de fibrina a 37 °C. A formação da fibrina resulta num aumento da turbidez da amostra, que é detetada pelo coagulómetro, sendo o valor do PTT correspondente ao intervalo de tempo que decorre desde adição do cloreto de cálcio até ao início da formação do coágulo (valor da abcissa no ponto de inflexão da curva) (Fig. 19).



**Figura 19** – Representação da curva típica da turbidez da amostra em função do tempo, utilizada na obtenção do PTT (adaptado de *Teco GmbH*, 2008).

Para cada amostra, o PTT foi expresso sob a forma de percentagem em relação ao controlo positivo ensaiado em paralelo com a amostra e é apresentado como a média das três réplicas. Considerou-se a percentagem do PTT para o vidro igual a 100%, uma vez que este é trombogénico (Equação 10).

$$\%PTT = 100 \times \frac{PTT (SAM)}{PTT (Vidro)} \quad (10)$$

### **2.3.2. Tempo de Protrombina (PT)**

#### **Reagentes Utilizados**

Utilizou-se o reagente TEClot PT-SR *liquid* (TECO GmbH, Alemanha), composto por um extrato de cérebro de coelho (contendo fator tecidual) num tampão não especificado contendo estabilizadores não especificados e cloreto de cálcio. Antes do ensaio, o reagente foi equilibrado a 37 °C durante, pelo menos, 10 min. Para o controlo positivo utilizou-se uma suspensão de caulino a 5 mg mL<sup>-1</sup> (proveniente do *kit* C. K. Prest (Roche Diagnostic, Alemanha) para determinação do APTT), num tampão não revelado pelo fabricante. O plasma sanguíneo utilizado teve a mesma origem do plasma utilizado na determinação do PTT (secção 2.3.1.).

#### **Controlos**

Tal como sucedeu no caso da determinação do PTT (secção 2.3.1.), cada uma das três réplicas da SAM foram ensaiadas em simultâneo com um controlo positivo e com um controlo negativo. No controlo positivo, misturaram-se 400 µL de plasma com 100 µL da suspensão de caulino, um ativador da coagulação sanguínea. O controlo negativo consistiu em plasma diluído 1:1,25 com PBS (diluição do plasma igual à do controlo positivo) em contacto com um *eppendorf*, de modo a ter a mesma diluição do controlo positivo.

A área de contacto entre o plasma e a superfície da SAM foi delimitada tal como no ensaio de determinação do PTT (secção 2.3.1.), procedendo-se igualmente à pré-incubação a 37 °C aí referida, o mesmo sucedendo a um *eppendorf* contendo 100 µL da suspensão de caulino (controlo positivo) e a um *eppendorf* destinado ao controlo negativo.

## **Contacto Superfície – Plasma**

À SAM e ao controlo negativo adicionaram-se 500 µL de plasma sanguíneo diluído 1:1,25 com PBS e equilibrado a 37 °C. Ao controlo positivo, adicionou-se 400 µL de plasma sanguíneo, não diluído, aos 100 µL da suspensão de caulino, sendo todos incubados a 37 °C. Após 30 min de incubação, de cada amostra (SAM e controlos positivo e negativo) recolheram-se 75 µL para cinco *eppendorfs*, que foram colocados em gelo por um período mínimo de 20 min.

## **Determinação do PT**

As amostras de plasma recolhidas, que se encontravam em gelo, foram aquecidas uma a uma a 37 °C, por colocação num banho termostático durante 5 min. De seguida, pipetou-se 25 µL de cada amostra para uma *cuvette* do coagulómetro, como já referido na secção 2.3.1., pré-aquecida a 37 °C, incubando-se exatamente durante 90 s a 37°C, no próprio coagulómetro. Por fim, de modo a desencadear a coagulação do plasma, adicionou-se 50 µL do reagente PT-SR *liquid*. A sequência das amostras durante a determinação do PT foi alterada de modo a que os diferentes tempos de incubação das amostras em gelo não tivessem influência no PT do plasma sanguíneo. A sequência da determinação do PT das amostras de plasma foi a seguinte: a) controlo positivo – SAM – controlo negativo; b) SAM – controlo positivo – controlo negativo; c) controlo negativo – controlo positivo – SAM; d) controlo positivo – controlo negativo – SAM e, e) SAM – controlo negativo – controlo positivo.

O tempo de protrombina foi obtido pelo coagulómetro, tendo sido expresso sob a forma de percentagem em relação ao controlo positivo ensaiado em paralelo com a amostra e apresentado como a média das três réplicas.

Considerou-se a percentagem do PT para a suspensão de caulino igual a 100%, uma vez que este é um ativador exógeno da coagulação (Equação 11).

$$\%PT = 100 \times \frac{PT (SAM)}{PT (Suspensão de Caulino)} \quad (11)$$

### 2.3.3. Adesão de Plaquetas às SAMs

#### Preparação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir de uma camada leuco-plaquetária (*buffy coat*, BC) proveniente de sangue humano recolhido em citrato-fosfato-dextrose (CPD), amavelmente cedida pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP, de Coimbra (IPST). O PRP foi obtido por centrifugação do BC a 970 g durante 20 min. numa centrífuga de bancada (*Rotofix 32 A, Hettich GmbH, Alemanha*), seguida de uma segunda centrifugação do sobrenadante a 1500 g durante 15 min. As plaquetas recolhidas na forma de sedimento foram ressuspensas em igual volume de plasma sanguíneo do mesmo grupo sanguíneo do sangue do BC, também amavelmente decido pelo IPST.

#### Curva de Calibração

A curva de calibração permitiu verificar se existia uma relação linear entre a concentração de plaquetas e a absorvância a 405 nm, de modo a poder-se usar a absorvância a 405 nm como um indicador da quantidade de plaquetas. De forma a estabelecer a correlação entre a atividade da fosfatase ácida das plaquetas e o número de plaquetas presentes, o PRP foi diluído 1:20, 1:25, 1:50,

1:100 e 1:200 com NaCl (*Fisher Scientific*, Alemanha) a 0,9% e as plaquetas presentes em cada diluição contadas com um contador hematológico automático (*Coulter MAXM Hematology Flow Cytometer*, *Coulter Corporation*, EUA). A 150  $\mu$ L de cada diluição adicionou-se 300  $\mu$ L de *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) (*Sigma Aldrich*, Germany) 5 mM num tampão de acetato de sódio (*Merck*, Alemanha) 0,1 M e a pH 5,4, contendo 0,1% Triton X-100 (*Sigma Aldrich*, Alemanha). Ao fim de 60 min de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 200  $\mu$ L de NaOH (*Fluka Chemie*, Alemanha) 2 M. As amostras foram centrifugadas a 2500 g, durante 10 min e, posteriormente, a atividade da fosfatase ácida nas várias diluições do PRP foi medida a 405 nm contra um branco de água MilliQ contendo a mesma quantidade dos reagentes usados nas restantes amostras. De forma a descontar o efeito da fosfatase ácida presente no plasma do PRP, o ensaio foi realizado utilizando plasma diluído 1:20, 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 com NaCl 0,9%.

### **Controlos**

Como controlo negativo do ensaio, utilizou-se o PRP em contacto com o lado interno do saco de armazenamento do BC (*Composelect 600 mL Fresenius Kabi AG, Bade Hamburg*, Alemanha), tendo a área de contacto um diâmetro de 2 cm, igual à área de contacto PRP/SAMs. O controlo positivo consistiu em PRP em contacto direto com uma lâmina de vidro (*Thermo Scientific*, Inglaterra), uma vez que o vidro é um material trombogénico. As lâminas de vidro e a porção de 2 cm de diâmetro do saco de armazenamento do BC foram lavadas no próprio dia do ensaio (de modo a minimizar a adsorção de contaminantes atmosféricos) por sonicação em etanol absoluto durante 5 min, seguida de uma lavagem com um jato de etanol absoluto, nova sonicação em água MilliQ durante 5 min e, finalmente, uma lavagem com um jato de água MilliQ.

## **Contacto Superfície-Plaquetas**

De forma a delimitar de modo exato e reprodutível a área de contacto entre as plaquetas e as diferentes superfícies, definiu-se uma área circular de 2,5 cm de diâmetro utilizando os delimitadores de silicone, adotando o mesmo procedimento referido na secção 2.3.1. na determinação do PTT.

Quando se procedeu ao ensaio das três réplicas da SAM, as três SAMs foram ensaiadas simultaneamente com um controlo negativo e um positivo. Para isso, no interior do delimitador adicionou-se 500 µL de PRP diluído 1:8 pré-aquecido a 37 °C, sendo as amostras incubadas durante 30 min a 37 °C, numa estufa. Após o período de incubação, as superfícies foram lavadas três vezes com 1 mL de NaCl 0,9%, de forma a remover as plaquetas não aderentes às superfícies.

## **Ensaio da Fosfatase Ácida**

Às SAMs, ao controlo positivo e ao controlo negativo foram adicionados 300 µL da solução de *p*NPP 5 mM em 0,1% Triton X-100 referida na secção 2.3.3. A quantidade relativa de plaquetas aderentes às superfícies foi estimada pela leitura da absorvância a 405 nm, medindo-se a quantidade de *p*-nitrofenol formado, que resulta da atividade da fosfatase ácida das plaquetas aderentes à superfície. A absorvância a 405 nm foi medida num espectrofotómetro Genesis 20 (*Thermo Spectronic*, EUA), contra uma mistura (branco) de 300 µL de *p*NPP 5mM num tampão de acetato de sódio 0,1 M a pH 5,4 com 0,1% Triton X-100 e 200 µL de NaOH 2 M. A quantidade relativa de plaquetas aderentes foi expressa como percentagem em relação ao controlo positivo (lâmina de vidro) (Equação 12). Considerou-se a percentagem de plaquetas aderentes ao controlo positivo como 100%, uma vez que no vidro há uma grande adesão de plaquetas (Mohammad *et al.*, 1974).

$$\% \text{Plaquetas aderentes} = \frac{A_{405 \text{ nm}}(\text{SAM})}{A_{405 \text{ nm}}(\text{Vidro})} \quad (12)$$

#### 2.3.4. Adsorção de Proteínas às SAMs

A adsorção de proteínas do plasma às SAMs preparadas foi estudada seguindo-se o procedimento de Neumann (Kwok e Neumann, 2000), que utiliza a goniometria de ângulos de contacto para determinar alterações na tensão interfacial sólido-líquido devidas à adsorção de proteínas. De forma a determinar o valor da tensão interfacial superfície-plasma e superfície-água, realizaram-se estudos cinéticos do ângulo de contacto do plasma sanguíneo e da água colocado sobre as SAMs, bem como da tensão superficial do plasma e da água.

#### **Estudo da Variação da Tensão Superficial da Água e do Plasma em Função do Tempo**

A determinação da tensão superficial do plasma sanguíneo e da água foi realizada numa câmara fechada e saturada com vapor de água. Uma pipeta com plasma ou água foi colocada no interior da câmara onde, posteriormente, se formou uma gota pendente. Iniciou-se a aquisição de imagens de modo automático sempre para o mesmo tempo após a formação da gota, adquirindo-se, nos primeiros 20 s, imagens em intervalos de tempo de 980 ms e, subsequentemente, de 10 em 10 s até aos 600 s. Em cada imagem, a tensão superficial foi calculada automaticamente utilizando o *software* do goniómetro, como referido na secção 2.2.3., e representou-se a variação da tensão superficial da gota em função do tempo. As experiências foram repetidas até as curvas

serem concordantes (pelo menos cinco repetições). O valor da tensão superficial do plasma e da água foi tomado como o valor médio da tensão superficial para  $t = 0$  s, obtido a partir de cinco curvas concordantes de variação da tensão superficial em função do tempo.

### **Estudo da Variação do Ângulo de Contacto Estático de Plasma Sanguíneo em Função do Tempo de Contacto com as SAMs**

A determinação do ângulo de contacto estático do plasma sanguíneo em função do tempo de contacto com as SAMs foi realizado numa câmara fechada saturada com vapor de água. No interior da câmara previamente saturada com vapor de água, formou-se uma gota de plasma na ponta de uma micropipeta e depositou-se sobre a superfície, sendo o programa de aquisição de imagens imediatamente ativado, de modo automático. Nos primeiros 20 s, as imagens da gota foram adquiridas em intervalos de tempo de 980 ms sendo, subsequentemente, adquiridas de 10 em 10 s até aos 600 s, determinando-se o ângulo de contacto para cada uma delas. As experiências foram repetidas em intervalos de 1 h até se conseguir obter reprodutibilidade das curvas, uma indicação de que a câmara tinha atingido a saturação com vapor de água. Tomou-se como valor do ângulo de contacto estático do plasma sanguíneo e da água, o valor médio do ângulo de contacto, de cinco curvas reprodutíveis, após um tempo de contacto com a superfície de 600 s.

## 2.4. Análise Estatística

Para comparação de duas médias com o objetivo de detetar diferenças com significado estatístico, utilizou-se o teste  $t$  de Student com um grau de confiança de 95%, utilizando *software* disponível *online* (*GraphPad QuickCalcs*, 2015) e, no caso de mais do que duas médias, usou-se uma análise de variâncias (ANOVA), seguida do *Tukey HSD test*, com um grau de confiança de 95%, para identificar entre que médias existia uma diferença significativa, utilizando *software* disponível *online* (*VassarStats*, 2015). Na deteção de valores discrepantes (*outliers*), utilizou-se o teste de Grubbs, com um grau de confiança de 95%, utilizando *software* disponível *online* (*GraphPad QuickCalcs*, 2015). Todas as médias são apresentadas indicando-se o valor médio e o seu desvio padrão.

### **3. Resultados e Discussão**

O presente trabalho tem como objetivo investigar a influência da hidrofiliicidade/hidrofobicidade e da polaridade de uma superfície sobre alguns aspectos da interação entre as superfícies artificiais e o sangue. Para isso, utilizaram-se superfícies-modelo que consistiam na superfície de SAMs de dois alcanotióis sobre ouro: o 1-undecanotiol (UDT) e o ácido 11-mercapto-1-undecanoico (MUA). Os resultados apresentados, numa primeira fase, são relativos à preparação e caracterização das SAMs. Posteriormente, as SAMs foram usadas na avaliação de efeitos sobre dois tempos de coagulação do plasma – o tempo de tromboplastina parcial (PTT) e o tempo de protrombina (PT), sobre a adesão de plaquetas e sobre a adsorção de proteínas do plasma.

#### **3.1. Preparação e Caracterização das Superfícies Utilizadas**

##### **3.1.1. Preparação e Caracterização do Substrato de Ouro**

Os substratos de ouro usados para a formação das várias SAMs foram obtidos a partir de CDs de ouro. Uma vez que a camada de ouro se encontra revestida com camadas protetoras de polímeros (Fig. 3), foi necessário removê-las, de modo a expô-la. Isto foi conseguido por tratamento com ácido nítrico concentrado. Houve necessidade de encontrar as melhores condições para a remoção do revestimento protetor, em particular, o tempo de tratamento e a temperatura, tendo-se utilizado um tempo de 25 s a uma temperatura nunca inferior a 20 °C. Verificou-se que, para tempos de imersão superiores a 25 s, ocorria a degradação da camada de ouro e, quando o tratamento decorria a uma temperatura inferior a 20 °C, era necessário um tempo de imersão superior (cerca de 60 s), mas que resultava na degradação da camada de ouro.

O valor do ângulo de contacto estático das superfícies de ouro utilizadas foi  $51,1^\circ \pm 2,6^\circ$ , ou seja, o substrato de ouro usado possui características hidrofílicas, segundo o Limite de Berg (Tab. 1). Ainda que as superfícies de ouro, apresentem um ângulo de contacto estático para a água igual a  $0^\circ$  imediatamente após a sua formação, uma vez que a superfície se encontra livre de contaminantes atmosféricos (Bernett e Zisman, 1970), com o decorrer da exposição ao ambiente este valor aumenta até se atingirem valores próximos dos  $50^\circ$ , devido à adsorção de hidrocarbonetos poluentes, que se encontram no ar (Smith, 1980). Por outro lado, como a superfície de ouro usada possui uma topografia que exhibe sulcos espaçados regularmente, com dimensões de  $1,6 \mu\text{m}$  (Fig. 3), pelo modelo de Wenzel para uma superfície de Au com uma topografia particular, é de esperar que o valor do ângulo de contacto estático da água seja inferior ao de uma superfície de ouro plana.

### **3.1.2. Caracterização das SAMs**

A medição do ângulo de contacto após a formação das SAMs permite evidenciar se ocorreu a quimissorção dos alcanotóis sobre a superfície de ouro, avaliar o nível de organização da monocamada e classificar a superfície como hidrofílica ou hidrofóbica, seguindo o critério do Limite de Berg (secção 1.3.1.). Quando se coloca uma gota de água sobre a superfície de uma SAM com um grau de ordem elevado, as moléculas de água interagem somente com os grupos terminais da cadeia do alcanotiol. A obtenção de um valor do ângulo de contacto diferente do exibido por gotas de água sobre a superfície de ouro, e de acordo com o esperado, indicia que ocorreu quimissorção do alcanotiol à superfície de ouro, formando a SAM. Na Tabela 1 são apresentados os valores do ângulo de contacto estático da água e o respetivo valor da tensão de adesão da água das SAMs de UDT, de MUA e da superfície de ouro utilizada.

**Tabela 1.** Valor médio do ângulo de contacto estático da água e da tensão de adesão da água da superfície de ouro ( $n = 3$ ), das SAMs UDT e MUA ( $n = 10$ ) e do vidro ( $n = 6$ ). Apresenta-se o valor médio e o respetivo desvio padrão.

Superfícies	$\theta_s$ (°)	$\tau_a$ (mN m <sup>-1</sup> )
Au	51,1 ± 2,6	45,4 ± 2,6
UDT	106,2 ± 3,2***	-20,2 ± 3,8***
MUA	17,3 ± 5,0***	69,0 ± 2,1***
Vidro	23,8 ± 4,1***	66,1 ± 2,2***

\*\*\* Diferença "extremamente significativa" ( $p < 0,0001$ ) por comparação com o valor do ouro (teste  $t$  de Student).

O valor médio do ângulo de contacto estático da água na SAM de UDT aumentou em relação ao ângulo de contacto estático da água na superfície do ouro, o que permite inferir que ocorreu quimissorção das moléculas do alcanotiol à superfície de ouro, uma vez que o valor médio do ângulo de contacto das SAMs é diferente do valor da superfície de ouro e está concordante com o valor esperado para uma superfície exibindo grupos metilo. Verifica-se, de acordo com o Limite de Berg (secção 1.3.1.), que a SAM de UDT é uma superfície hidrofóbica e a SAM de MUA, assim como a lâmina de vidro usada como controlo positivo (secções 2.3.1. e 2.3.3.), são superfícies hidrofílicas. A SAM de UDT possui um ângulo de contacto estático da água próximo dos 112°, um valor típico do de uma superfície que exhibe grupos metilo (Bain et al., 1989b). Os valores ligeiramente inferiores obtidos podem ser explicados pela existência de algum grau de desordem na SAM, já que a topografia do substrato de ouro pode induzir alguma desordem na monocamada (secção 1.2.2.), que resulta na exposição de grupos metileno (-CH<sub>2</sub>-). Como o ângulo de contacto estático dos grupos metileno é, aproximadamente, 107° (Bain *et al.*,

1989b), uma SAM de UDT que apresente grupos metileno expostos à superfície, juntamente com grupos metilo, deverá apresentar um valor entre os 107° e os 112°, implicando que poderão existir expostos à superfície um número significativo de grupos metileno.

As SAMs de MUA apresentam grupos terminais carboxilo (-COOH). SAMs com grupos terminais deste tipo podem apresentar um certo grau de desordem, sendo possível a formação de uma dupla camada ou estruturas cíclicas devido à formação de ligações de hidrogénio entre grupos carboxilo de diferentes moléculas. Como já referido na Introdução (secção 1.2.2.), o grau de ordem das SAMs de MUA pode ser optimizado acidificando-se a solução do alcanotiol, em etanol absoluto, o que provoca a disrupção das ligações de hidrogénio entre grupos carboxilo dos tióis da monocamada e dos tióis livres (Arnold *et al.*, 2002). O valor médio do ângulo de contacto estático e em avanço da água sobre as SAMs de MUA, preparadas por acidificação da solução do alcanotiol, foi de  $75,9^\circ \pm 2,0^\circ$  e  $79,4^\circ \pm 1,3^\circ$ , sendo este um valor muito discrepante do valor típico do ângulo de contacto da água em contacto com SAMs exibindo grupos carboxilo à superfície, que é inferior a 10° (Wang *et al.*, 2005). Perante os resultados obtidos, supõe-se que o ácido utilizado (HCl) possa ter funcionado como catalisador da formação de um grupo éster à superfície da SAM, por reacção entre o grupo carboxilo da SAM e o etanol (Laibinis e Whitesides, 1991), pelo que este procedimento não foi seguido.

Quando as SAMs de MUA foram preparadas com uma solução de MUA 1 mM em etanol absoluto não acidificado, obtiveram-se os valores médios do ângulo de contacto estático da água e da tensão de adesão da água apresentados na Tabela 1. Verifica-se que o ângulo de contacto da SAM de MUA é inferior ao da superfície de ouro, podendo-se inferir que ocorreu quimissorção das moléculas do alcanotiol à superfície de ouro, uma vez que o

valor médio do ângulo de contacto estático das monocamadas é diferente do ângulo de contacto estático da superfície de ouro e concordante com o valor esperado para uma superfície exibindo grupos carboxilo. As SAMs de MUA são superfícies hidrofílicas, sendo o ângulo de contacto estático da água típico abaixo dos 10° (Wang *et al.*, 2005). Como o valor médio do ângulo de contacto estático da água nas SAMs de MUA preparadas se encontra acima dos 10°, isso indicia algum grau de desordem na SAM, com a exposição de grupos metileno da cadeia carbonada do alcanotiol, já que a topografia do substrato de ouro pode induzir alguma desordem na monocamada (Fig. 7), que resulta na exposição de grupos metileno.

### **3.1.3. Limpeza e Caracterização da Superfície de Vidro**

Foram utilizadas lâminas de vidro como controlo positivo nalguns dos ensaios efetuados (determinação do tempo de tromboplastina parcial e no ensaio de adesão de plaquetas) pelo que também se caracterizaram por goniometria de ângulos de contacto. De forma a minimizar a contaminação da superfície do vidro pela adsorção de contaminantes atmosféricos e a garantir reprodutibilidade, as lâminas foram sempre lavadas imediatamente antes da sua utilização, seguindo sempre o mesmo procedimento. Os valores referentes ao ângulo de contacto estático da água na superfície de vidro estão apresentados na Tabela 1. Verifica-se, de acordo com o Limite de Berg (secção 1.3.1.), que a superfície da lâmina de vidro é uma superfície hidrofílica. O ângulo de contacto da água nas superfícies de vidro varia consoante a técnica de limpeza aplicada à

superfície. O valor obtido neste trabalho encontra-se próximo do valor de 20° que se obtém por limpeza com "solução piranha"<sup>4</sup> (Bhattacharya *et al.*, 2005).

## **3.2. Caracterização da Interação entre o Sangue e as Diferentes Superfícies**

### **3.2.1. Tempos de Coagulação do Plasma Sanguíneo**

As superfícies artificiais, quando em contacto com o sangue, ativam a cascata da coagulação, levando à formação de um trombo. As SAMs de UDT e de MUA permitem estudar a influência da hidrofiliicidade e hidrofobicidade das superfícies na coagulação do plasma sanguíneo, uma vez que as SAMs possuem uma cadeia com o mesmo comprimento e diferem no grupo químico terminal (UDT: -CH<sub>3</sub>; MUA: -COOH). Os tempos de coagulação do plasma determinados foram o tempo de tromboplastina parcial (PTT) e o tempo de protrombina (PT).

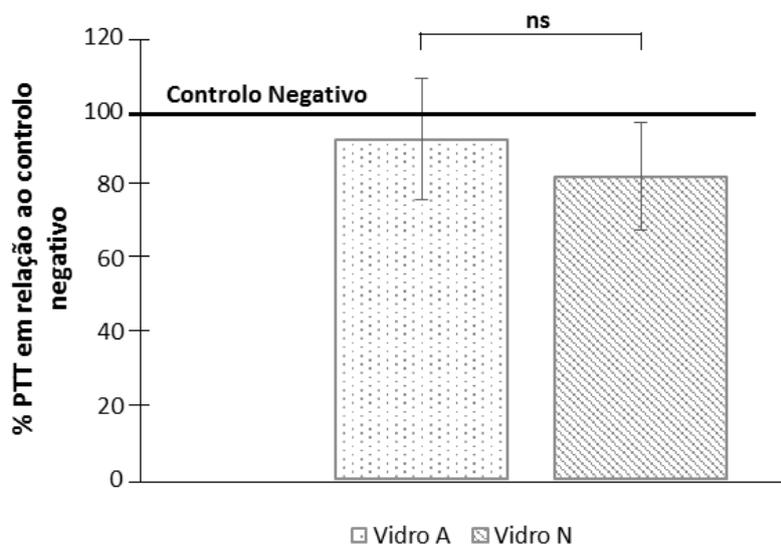
#### **Tempo de Tromboplastina Parcial (PTT)**

De modo a garantir reprodutibilidade dos tempos obtidos, estudou-se o efeito de alguns parâmetros relacionados com aspetos práticos da aplicação deste ensaio a uma superfície. Assim, de forma a perceber a influência da lavagem das lâminas de vidro (controlo positivo) no PTT de plasma sanguíneo em contacto com estas superfícies, determinou-se o valor do PTT de plasma sanguíneo em contacto com lâminas de vidro lavadas dias antes da realização do ensaio, e em lâminas de vidro lavadas momentos antes do ensaio.

---

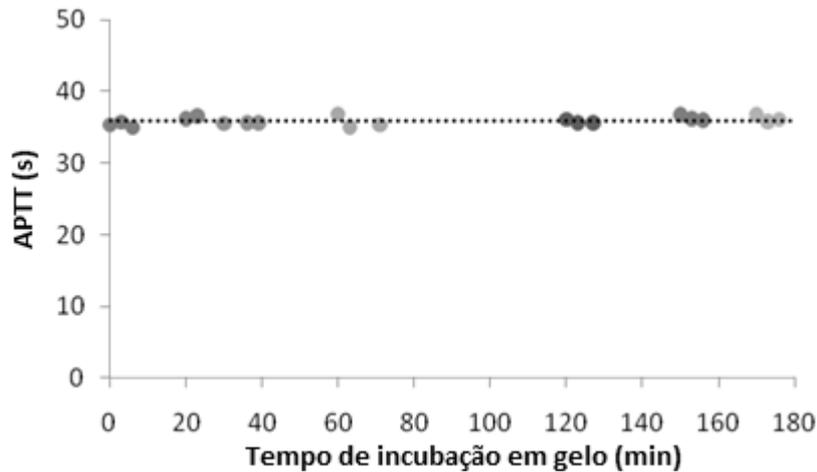
<sup>4</sup> Solução contendo ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogénio a 30%, na proporção de 5:1 (NOTA: Esta solução reage violentamente com a maior parte das substâncias orgânicas, pelo que deve ser utilizada com cuidados extremos).

As lâminas de vidro foram lavadas como descrito na secção 2.3.1 e foram ensaiadas em simultâneo com um controlo negativo (plasma sanguíneo em contacto com um *ependorf*). Após o contacto entre o plasma sanguíneo e as superfícies (lâminas de vidro lavadas dias antes do ensaio, lâminas de vidro lavadas momentos antes do ensaio e o controlo negativo), determinou-se o PTT das várias amostras de plasma recolhidas. Os resultados obtidos mostram que as lâminas de vidro lavadas momentos antes do ensaio apresentavam um valor médio do PTT inferior ao das lâminas de vidro lavadas dias antes do ensaio do PTT, o que implica a ocorrência de maior ativação do plasma, ainda que a diferença não tivesse significado estatístico (Fig. 20). Ainda assim, optou-se por usar sempre lâminas de vidro lavadas no próprio dia do ensaio.



**Figura 20** - Representação gráfica da percentagem do PTT, expresso em relação ao controlo negativo, da lâmina de vidro lavada dias antes do ensaio PTT (Vidro A) e da lâmina de vidro lavada momentos antes do ensaio PTT (Vidro N). ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem do PTT em relação ao controlo negativo; a linha horizontal representa o controlo negativo (plasma sanguíneo em contacto com um *ependorf*); ns - Diferença "não significativa" ( $p = 0,4704$ ) na comparação entre as lâminas de vidro (teste  $t$  de Student).

Após o contacto entre o plasma sanguíneo e a superfície, tem de se recolher 5 amostras de 75 µL do plasma que esteve em contacto com a superfície, de modo a obter informação sobre a reprodutibilidade da determinação do PTT em si e para se obter um valor de PTT médio para cada superfície. Como só pode ser determinado um PTT de cada vez, dado o coagulómetro usado só possuir um canal, houve necessidade de garantir que as amostras não sofriam alteração enquanto aguardavam pela determinação do PTT, pelo que foram imediatamente colocadas em gelo, um procedimento habitual em ensaios deste tipo (van Oeveren *et al.*, 2002). No entanto, como cada superfície foi ensaiada em simultâneo com um controlo negativo e com um controlo positivo, o tempo que decorria entre a determinação do PTT da primeira amostra de plasma recolhido da primeira superfície e a última amostra de plasma recolhida da última superfície era de cerca de 2 h. Assim, como o tempo de contacto com o gelo das diferentes amostras era muito diferente, houve necessidade de verificar se o tempo em gelo afetava o valor do PTT. Para isso, estudou-se o efeito do tempo em gelo no APTT (tempo de tromboplastina parcial ativado, em que a via intrínseca é deliberadamente ativada com um ativador exógeno, o caulino) de plasma que nunca tinha estado em contacto com nenhuma superfície. Os resultados obtidos mostram que, durante o intervalo de tempo de incubação em gelo estudado (cerca de 3 h), não houve variação significativa no APTT, tendo-se obtido um valor médio de  $35,9 \pm 0,3$  s (média  $\pm$  desvio padrão), abaixo do valor do desvio padrão aceite para a reprodutibilidade do APTT (Fig. 21) (Hillman *et al.*, 1982).



**Figura 21** – Representação da variação do APTT de plasma sanguíneo humano em função do tempo de incubação em gelo. A linha horizontal tracejada representa o valor médio do APTT, em segundos, para o conjunto de pontos representados ( $35,9 \pm 0,3$  s). Cada conjunto de três pontos próximos diz respeito a um conjunto de 3 ensaios.

Assim, concluiu-se que o tempo de incubação em gelo não tem efeito significativo na determinação da coagulação do plasma pela via intrínseca.

### **PTT das SAMs de UDT e de MUA**

Uma vez que não é possível ensaiar as três réplicas da SAM no mesmo dia, dado se ter usado um coagulómetro de um só canal, e de modo a levar em conta a variabilidade nos lotes de plasma usados, a alteração do plasma com o tempo de armazenamento e possível variabilidade nas características da superfície do vidro, para cada réplica da SAM, determinou-se o valor do PTT em paralelo com o de um controlo positivo (lâmina de vidro) e de um controlo negativo (plasma contido num *ependorf*), incubados em simultâneo com a SAM e processados em paralelo com a SAM na determinação do PTT. O vidro é conhecido como sendo um material fortemente trombogénico (Leininger *et al.*, 1996), que ativa por contacto a cascata da coagulação, pelo que foi tomado como controlo positivo, indicando-nos o valor do PTT que será de esperar para

uma superfície que ativa a coagulação pela via intrínseca; no limite oposto, uma superfície que não ativa a coagulação pela via intrínseca apresentará um PTT próximo do de plasma que nunca esteve em contacto com nenhuma superfície (para além das do saco de recolha do sangue e de um *ependorf*). Assim, como o sangue se altera assim que sai do sistema circulatório, os valores do PTT de cada réplica da SAM têm de ser comparados com controlos ensaiados em simultâneo com a SAM. Por esse motivo, o PTT foi expresso sob a forma de percentagem em relação ao controlo positivo de cada SAM (%PTT), sendo o PTT médio de cada SAM dado pela média entre os valores de %PTT de cada réplica da SAM, tomando o valor de %PTT do vidro igual a 100%. Os resultados obtidos encontram-se na Tab. 2, onde também se encontram os resultados da caracterização das superfícies por goniometria de ângulos de contacto.

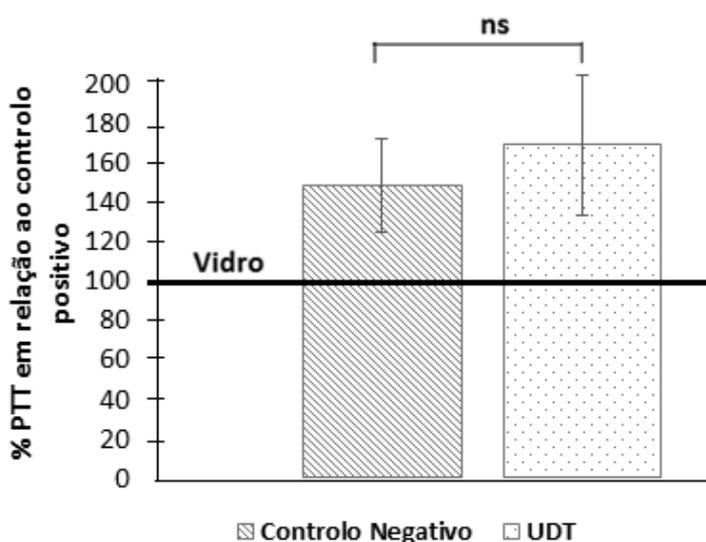
**Tabela 2.** Valor médio do ângulo de contacto estático da água ( $\theta_s$ ), da tensão de adesão da água ( $\tau_a$ ), do PTT e da percentagem do PTT (expressa em relação ao controlo positivo) para as SAMs de UDT e MUA e para os respetivos controlos positivo e negativo (vidro e *ependorf*, respetivamente) ( $n = 3$ , valor médio  $\pm$  desvio padrão).

Superfície	$\theta_s$ (°)	$\tau_a$ (mN m <sup>-1</sup> )	PTT (s)	PTT (%)
<b>UDT</b>	105,8 $\pm$ 0,6	-19,9 $\pm$ 0,8	482,5 $\pm$ 118,3	168,3 $\pm$ 35,2
Controlo (+)	23,8 $\pm$ 3,3	67,5 $\pm$ 1,4	289,7 $\pm$ 41,2	100
Controlo (-)	-*	-*	440,3 $\pm$ 70,5	147,8 $\pm$ 23,3
<b>MUA</b>	17,3 $\pm$ 3,9	69,5 $\pm$ 1,6	189,1 $\pm$ 23,5	51,9 $\pm$ 9,4
Controlo (+)	25,0 $\pm$ 1,8	65,9 $\pm$ 1,8	370,4 $\pm$ 50,2	100
Controlo (-)	-*	-*	612,8 $\pm$ 140,5	156,0 $\pm$ 40,1

<sup>ns</sup> Diferença estatisticamente "não significativa" ( $p > 0,05$ ; teste  $t$  de Student); \*\*\* diferença estatisticamente "extremamente significativa" ( $p < 0,0001$  SAM UDT e vidro; teste  $t$  de Student) \*\* diferença estatisticamente "muito significativa" ( $p = 0,0048$  SAM MUA e vidro;  $p = 0,0067$  SAM MUA e *ependorf*;  $p = 0,036$  SAM MUA e vidro teste  $t$  de Student). \* diferença estatisticamente "significativa" ( $p = 0,0119$  SAM MUA e *ependorf*, teste  $t$  de Student).

\* Não se determinou o valor do ângulo de contacto estático da água e a respetiva tensão de adesão da face interna de um *ependorf*.

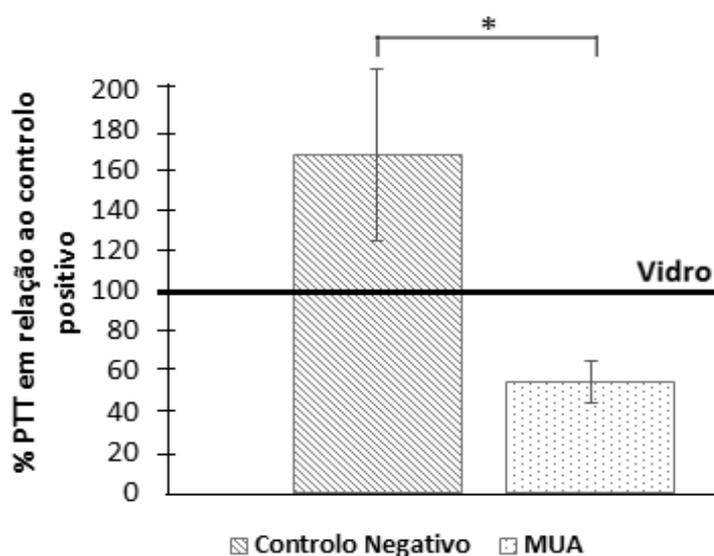
Na análise dos valores do PTT (s) e da percentagem do PTT, expresso em relação ao controlo positivo (Tab. 2), verifica-se que a SAM de UDT induz uma coagulação do plasma sanguíneo pela via intrínseca mais lenta do que o vidro. Relativamente ao controlo negativo (*ependorf*), a SAM de UDT possui características semelhantes em termos de ativação da via intrínseca mas, ainda assim, apresenta tempos de coagulação do plasma superiores ao controlo negativo (Fig. 22).



**Figura 22** – Representação da variação da percentagem do PTT, expresso em relação ao controlo positivo (vidro), do controlo negativo e da SAM de UDT ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem do PTT em relação ao controlo positivo; a linha horizontal representa a percentagem do PTT do controlo positivo (vidro)); ns - Diferença estatisticamente "não significativa" ( $p = 0.4476$ ) entre o controlo negativo e a SAM de UDT (teste  $t$  de Student).

Assim sendo, verifica-se que os resultados experimentais estão de acordo com o conhecimento atual de que superfícies hidrofóbicas não ativam fortemente a coagulação (Vogler, 1998).

Analisando os valores do PTT (s) e da percentagem do PTT, expressos em relação ao controlo positivo, da SAM de MUA (Tab. 2) conclui-se que a SAM de MUA acelera mais a coagulação do plasma sanguíneo pela via intrínseca do que o vidro. Em relação ao controlo negativo (plasma em contacto com o *eppendorf*), a SAM de MUA apresenta um PTT muito inferior ao do controlo negativo (Fig. 23).



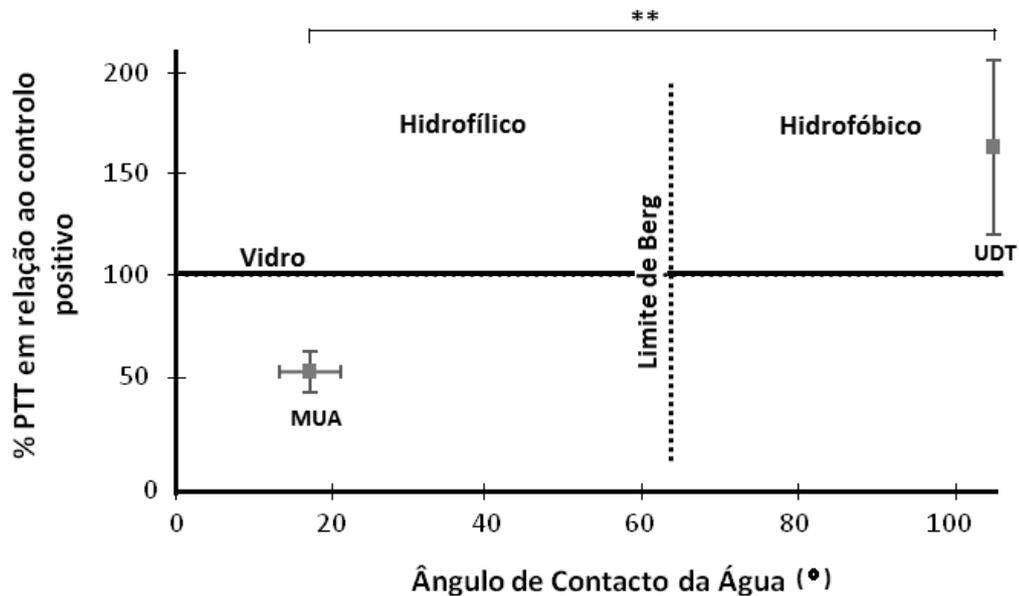
**Figura 23** – Representação da variação da percentagem do PTT, expresso em relação ao controlo positivo, do controlo negativo e da SAM do MUA ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem do PTT em relação ao controlo positivo; a linha horizontal representa a percentagem do PTT do controlo positivo (vidro)); \* Diferença estatisticamente "significativa" ( $p = 0.0119$ ) entre o controlo negativo e a SAM do MUA (teste  $t$  de Student).

Os resultados obtidos estão de acordo com o conhecimento atual de que as superfícies hidrofílicas ativam fortemente a coagulação (Vogler, 1998).

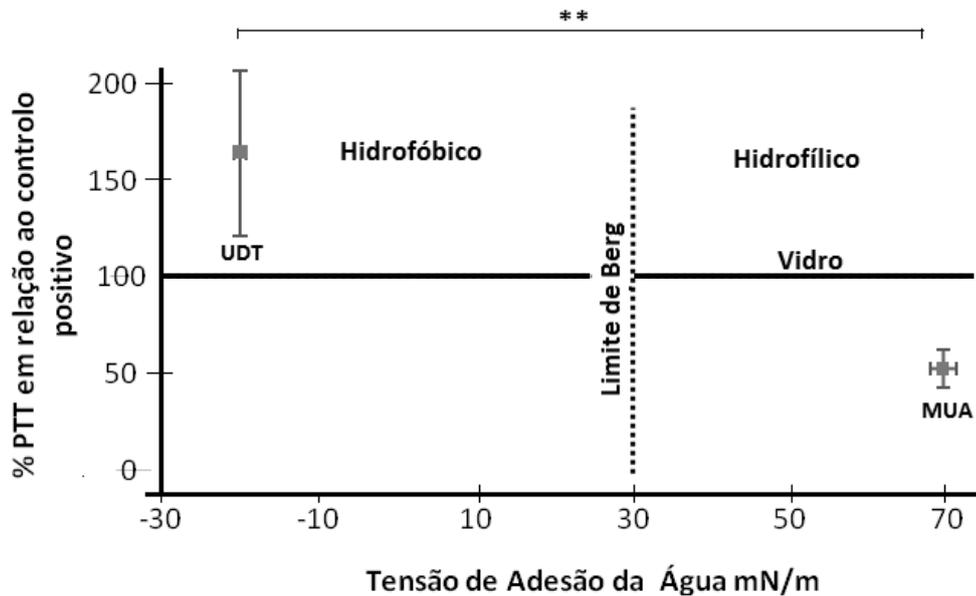
## **Comparação do PTT da SAM de UDT e do PTT da SAM de MUA**

Na análise dos valores da percentagem do PTT, expressos em relação ao controlo positivo (lâmina de vidro), verifica-se que a SAM de UDT acelera menos a coagulação pela via intrínseca do que o controlo positivo e a SAM de MUA, i.e., a SAM de UDT, hidrofóbica e apolar, ativa menos a coagulação pela via intrínseca do que a SAM de MUA, hidrofílica e polar (com carga elétrica negativa), e do que o vidro (Fig. 24). O valor da tensão de adesão da água reflete o modo como as moléculas de água interagem com a superfície, bem como a estrutura tridimensional (3D) da água próximo da superfície. A tensão de adesão da água da SAM de MUA é muito superior à tensão de adesão da água na SAM de UDT, que possui um valor negativo (Fig. 25), indicando que as moléculas de água interfacial interagem fortemente com a superfície da SAM de MUA, através de ligações de hidrogénio, formando-se uma camada de água de hidratação interfacial estável, com uma estrutura 3D colapsada, e fortemente aderente à superfície, que deverá resultar numa menor adsorção de proteínas (Vogler, 1998). Na SAM de UDT, as moléculas de água não interagem fortemente com a superfície, formando uma estrutura 3D bem definida, ficando a superfície disponível para interagir com outras moléculas, pelo que adsorve proteínas em grande extensão (Vogler, 1998). Conclui-se assim, que a superfície hidrofílica e polar (com carga elétrica negativa), representada pela SAM de MUA, ativa mais fortemente a coagulação do plasma sanguíneo pela via intrínseca do que a superfície com características hidrofóbicas, representada pela SAM de UDT. O grau de estruturação das moléculas de água junto às superfícies, ao influenciar a maior/menor adsorção de proteínas à superfície, influencia a maior/menor ativação da coagulação. Nas superfícies hidrofílicas, as moléculas de água interagem fortemente com a superfície, através de ligações de hidrogénio, pelo que as proteínas não conseguem remover a camada de água de hidratação interfacial, de forma a interagirem diretamente com a

superfície, adsorvendo em menor quantidade. É sabido que as superfícies hidrofílicas, que adsorvem baixas quantidades de proteínas do plasma, ativam mais fortemente a coagulação (Vogler, 1998). Ao invés, nas superfícies hidrofóbicas, em que as proteínas do plasma adsorvem em maior quantidade, a ativação da coagulação é mais reduzida (Vogler, 1998). O ensaio do PTT da UDT apresentou uma grande variabilidade, para a qual não se conseguiu estabelecer uma causa.



**Figura 24** – Representação gráfica da variação da percentagem do PTT, expresso em relação ao controle positivo (vidro), em função do ângulo de contacto estático de água das SAMs de UDT e de MUA ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem do PTT em relação ao controle positivo (vidro); barras de erro horizontais representam o desvio padrão do ângulo de contacto estático da água; a linha horizontal representa o controle positivo e a linha vertical tracejada o Limite de Berg ( $\theta = 65^\circ$ )). \*\* Diferença estatisticamente “muito significativa” ( $p = 0.0052$ ) entre a SAM de UDT e a SAM de MUA (teste  $t$  de Student). As barras de erro horizontais da SAM de UDT são menores do que o marcador de ponto.



**Figura 25** – Representação gráfica da variação da porcentagem do PTT, expresso em relação ao controle positivo (vidro), em função da tensão de adesão da água da SAM de UDT e do MUA ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da porcentagem do PTT em relação ao controle positivo (vidro); barras de erro horizontais representam o desvio padrão da tensão de adesão da água; a linha horizontal representa o controle positivo e a linha vertical tracejada, o Limite de Berg para  $\theta = 65^\circ$ ). \*\* Diferença estatisticamente " muito significativa" ( $p = 0.0052$ ) entre a SAM de UDT e a SAM do MUA (teste  $t$  de Student). As barras de erro horizontais da SAM de UDT são menores do que o marcador de ponto.

### Tempo de Protrombina (PT)

O tempo de protrombina corresponde ao tempo de coagulação do plasma sanguíneo que contactou, durante um certo período de tempo, com uma superfície (SAM ou controle positivo), que poderá afetar a ativação da via extrínseca da cascata da coagulação, na presença do reagente PT (extrato de cérebro de coelho com tampão desconhecido, estabilizadores desconhecidos e cloreto de cálcio).

## PT da SAM de UDT e de MUA

Tal como feito na determinação do PTT (secção 2.3.1.) determinou-se o PT para cada réplica das SAMs de UDT e MUA em paralelo com uma réplica do controlo positivo (suspensão de caulino) e do controlo negativo (plasma diluído com PBS em contacto com um *eppendorf*), incubados em paralelo com a SAM e processados da mesma forma para a determinação do PT. O caulino é um ativador por contacto da cascata da coagulação, pelo que foi utilizado como controlo positivo, indicando-nos o valor do PT que será de esperar para uma superfície que ativa a coagulação pela via extrínseca. Neste ensaio, não foi possível utilizar lâminas de vidro como controlo positivo porque o PT com elas obtido não se distinguia do valor do controlo negativo (plasma diluído com PBS em contacto com o *eppendorf*). O PT foi expresso, tal como no caso do PTT, como percentagem em relação a cada controlo positivo (%PT), sendo o PT médio de cada SAM dado pela média entre os valores da %PT de cada réplica da SAM, tomando o valor da %PT do controlo positivo (suspensão de caulino) igual a 100% (Tab. 3).

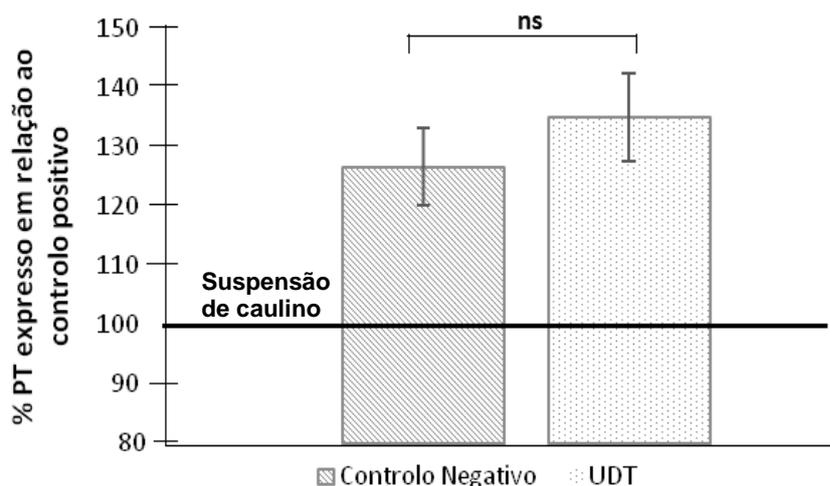
**Tabela 3.** Valor médio do ângulo de contacto estático da água ( $\theta_s$ ), da tensão de adesão da água ( $\tau_a$ ), do PT e da percentagem do PT (expressa em relação ao controlo positivo) para as SAMs de UDT e MUA e para os respetivos controlos positivo e negativo (suspensão de caulino e *ependorf*, respetivamente) ( $n = 3$ , valor médio  $\pm$  desvio padrão).

Superfície	$\theta_s$ (°)	$\tau_a$ (mN m <sup>-1</sup> )	PT (s)	PT (%)
<b>UDT</b>	106,6 $\pm$ 2,1	-20,6 $\pm$ 2,5	20,0 $\pm$ 1,0	135,1 $\pm$ 7,4
Controlo (+)	-*	-*	ns $\left[ \begin{array}{l} 14,8 \pm 0,2 \\ 18,7 \pm 0,9 \end{array} \right]$	ns $\left[ \begin{array}{l} 100 \\ 126,8 \pm 6,6 \end{array} \right]$
Controlo (-)	-*	-*		
<b>MUA</b>	18,5 $\pm$ 1,6	68,7 $\pm$ 0,7	18,4 $\pm$ 0,5	119,0 $\pm$ 3,2
Controlo (+)	-*	-*	* $\left[ \begin{array}{l} 15,5 \pm 0,2 \\ 17,3 \pm 0,2 \end{array} \right]$	* $\left[ \begin{array}{l} 100 \\ 111,7 \pm 2,5 \end{array} \right]$
Controlo (-)	-*	-*		

<sup>ns</sup> Diferença estatisticamente "não significativa" ( $p > 0,05$ ; teste  $t$  de Student); <sup>\*\*\*</sup> diferença estatisticamente "extremamente significativa" ( $p = 0,0009$ ; teste  $t$  de Student) SAM UDT e controlo positivo, ( $p = 0,0007$ ; teste  $t$  de Student) SAM MUA e controlo positivo \* diferença estatisticamente "significativa" ( $p = 0,0241$ ;  $p = 0,0357$ ; teste  $t$  de Student) SAM MUA e controlo negativo.

\* Não se determinou o valor do ângulo de contacto estático da água e, a respetiva tensão de adesão da face interna de um *ependorf* e da suspensão de caulino por não ser possível fazê-lo.

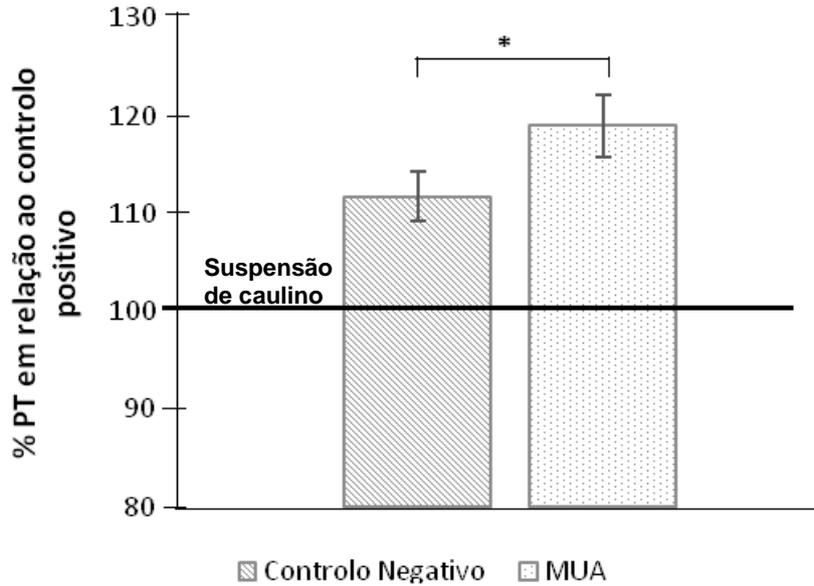
Pela análise dos valores do PT (s) e da percentagem do PT, expressos em relação ao controlo positivo, verifica-se que a SAM de UDT acelera menos a coagulação do plasma pela via extrínseca do que o controlo positivo (suspensão de caulino) (Tab. 3). Verificou-se ainda que o PT da SAM de UDT não apresenta diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo (Fig. 26), sendo por isso uma superfície não ativadora da coagulação do plasma pela via extrínseca (Fig. 26).



**Figura 26** – Representação gráfica da variação da percentagem do PT, expresso em relação ao controlo positivo, do controlo negativo e da SAM de UDT ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem do PT em relação ao controlo positivo (caulino); a linha horizontal representa o controlo positivo). ns - Diferença estatisticamente “não significativa” ( $p = 0,2207$ ) entre o controlo negativo e a SAM de UDT (teste  $t$  de Student).

Assim, conclui-se que a superfície hidrofóbica não ativou a via extrínseca da coagulação, estando os resultados em concordância com o conhecimento atual, de que as superfícies hidrofóbicas não ativam fortemente a coagulação (Vogler, 1998).

Analisando os valores do PT (s) e da percentagem do PT, expressos em relação ao controlo positivo para a SAM de MUA (Tab. 3), verifica-se que esta superfície acelera menos a coagulação do plasma pela via extrínseca do que o controlo positivo (suspensão de caulino). Além disso, a SAM de MUA apresenta um PT superior ao do controlo negativo, indicando que ativa menos a coagulação pela via intrínseca do que plasma que não contactou qualquer superfície (Fig. 27).

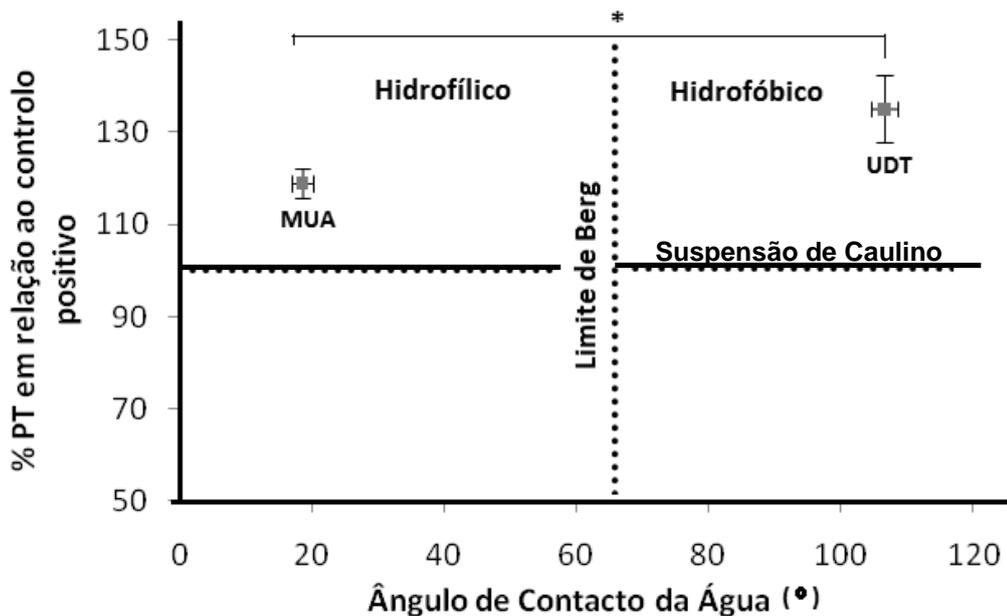


**Figura 27** – Representação gráfica da variação da percentagem do PT, expresso em relação ao controlo positivo, do controlo negativo e da SAM de MUA ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem do PT em relação ao controlo positivo (caulino); a linha horizontal representa o controlo positivo). \* - Diferença estatisticamente "significativa" ( $p = 0.0357$ ) entre o controlo negativo e a SAM do MUA (teste  $t$  de Student).

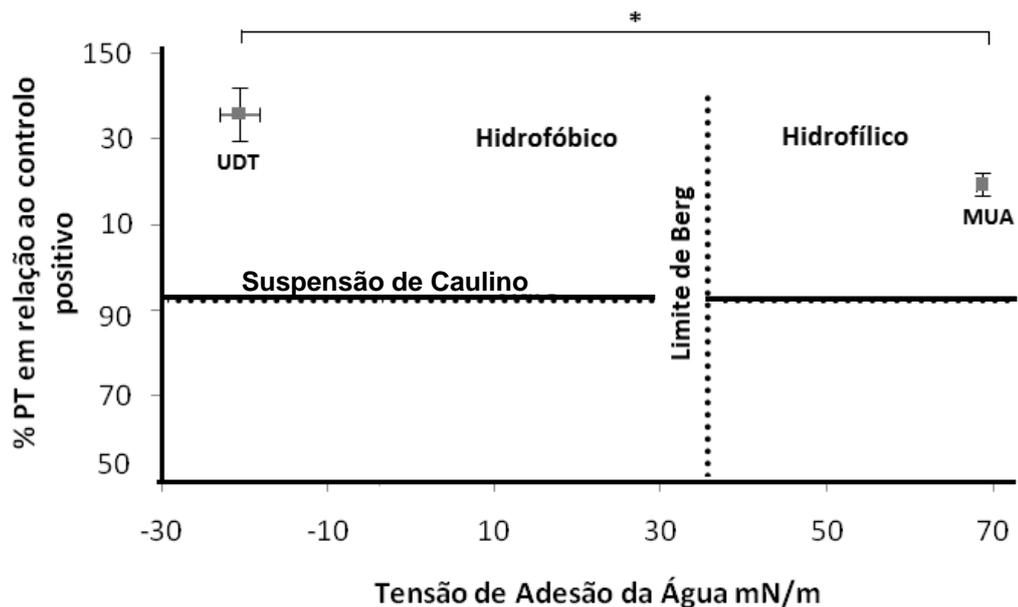
Assim, conclui-se que a superfície hidrofílica e polar (com carga elétrica negativa), representada pela SAM de MUA, também não ativa fortemente a via extrínseca da coagulação. Esperar-se-ia que as superfícies hidrofílicas ativassem fortemente a coagulação (Vogler, 1998). Estes resultados indicam que essa activação não deverá ocorrer pela via extrínseca.

## Comparação do PT da SAM de UDT e de MUA

Pela análise dos resultados do PT, verifica-se que a SAM de UDT (hidrofóbica e apolar) acelera menos a ativação da via extrínseca da cascata da coagulação do plasma do que a SAM de MUA (hidrofílica e com carga elétrica negativa; Fig. 28 e 29). Nesta via de ativação, o papel da adsorção de proteínas não deverá ser tão importante como no caso da ativação pela via intrínseca, onde existe a ativação por contacto. Ainda assim, a adsorção de proteínas envolvidas na via extrínseca pode alterar-lhes a sua concentração em solução e a sua atividade.



**Figura 28** – Representação gráfica da variação da percentagem do PT, expresso em relação ao controlo positivo, em função do ângulo de contacto estático da água da SAM de UDT e de MUA ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem do PT em relação ao controlo positivo (caulino); barras de erro horizontais representam o desvio padrão do ângulo de contacto da água; a linha horizontal representa o controlo positivo e a linha vertical tracejada o Limite de Berg para  $\theta = 65^\circ$ ). \*Diferença estatisticamente "significativa" ( $p = 0.0258$ ) entre a SAM de UDT e de MUA (teste  $t$  de Student).



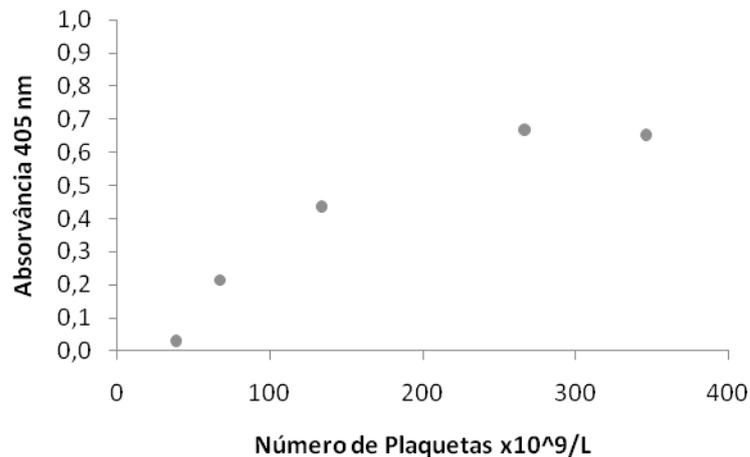
**Figura 29** – Representação gráfica da variação da porcentagem do PT, expresso em relação ao controle positivo, em função da tensão de adesão da água da SAM de UDT e de MUA ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da porcentagem do PT em relação ao controle positivo (caulino); barras de erro horizontais representam o desvio padrão da tensão de adesão da água; a linha horizontal representa o controle positivo e a linha vertical tracejada o Limite de Berg para  $\theta = 65^\circ$ ). \*Diferença estatisticamente "significativa" ( $p = 0.0258$ ) entre a SAM de UDT e de MUA (teste  $t$  de Student). As barras de erro horizontais da SAM de MUA são menores do que o marcador de ponto.

### 3.2.2. Adesão de Plaquetas

A adesão de plaquetas às SAMs foi estudada utilizando o ensaio da fosfatase ácida (Bellavite *et al.*, 1994). A superfície das SAMs contactou com plasma rico em plaquetas (PRP), sendo posteriormente quantificada a quantidade de *p*-nitrofenol resultante da atividade da fosfatase ácida presente nas plaquetas aderentes ao substrato, por leitura da absorvância a 405 nm.

### Curva de Calibração

Constatou-se a existência de uma relação linear entre absorvância medida a 405 nm, resultado da atividade da fosfatase ácida de plaquetas em suspensão, e o número de plaquetas no intervalo  $38 \times 10^9$  e  $134 \times 10^9$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , desviando-se da linearidade para valores superiores (Fig. 30).



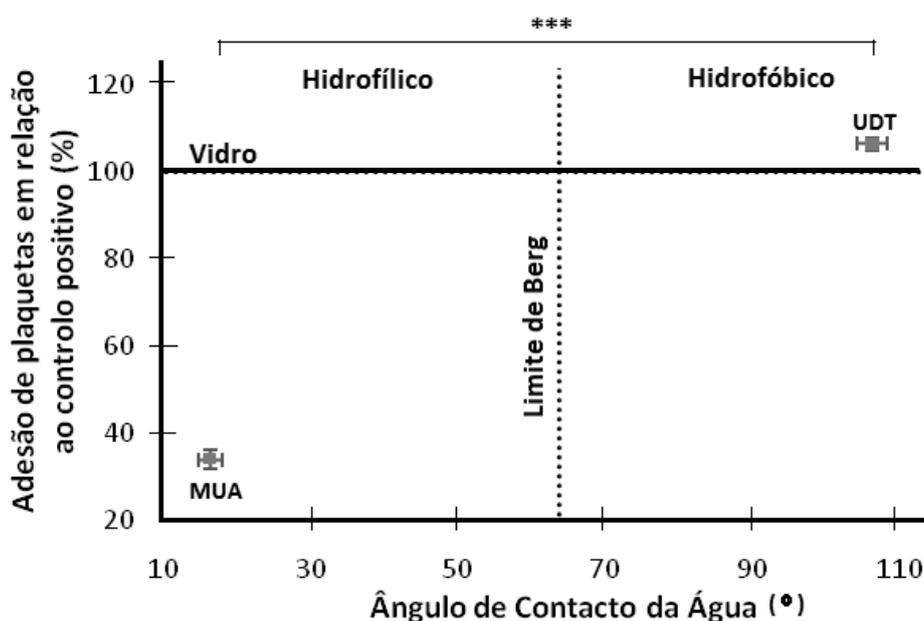
**Figura 30** – Representação gráfica da atividade da fosfatase ácida a 405 nm em função do número de plaquetas em suspensão.

Foram identificados, durante a contagem, quantidades vestigiais de eritrócitos e leucócitos sendo, por isso, o contributo da fosfatase ácida destas células desprezável.

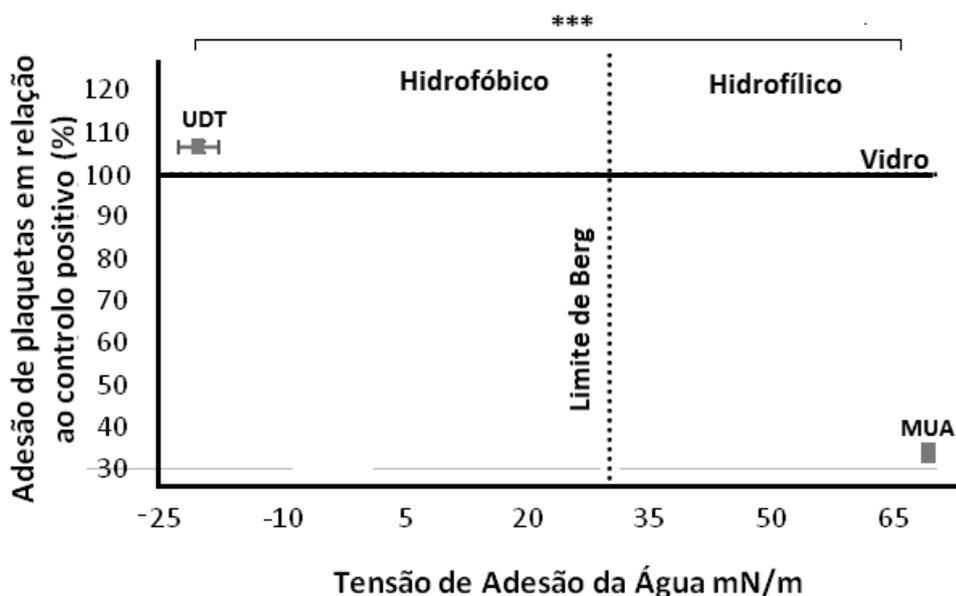
### Adesão de Plaquetas na SAM de UDT e de MUA

A quantidade de plaquetas aderentes a cada réplica da SAM de UDT e de MUA foi determinada em simultâneo com o respetivo controlo positivo (lâmina de vidro) e negativo (face interna de um saco de recolha de sangue), incubados em paralelo com a respetiva SAM e processados igualmente para o ensaio da fosfatase ácida. O vidro é conhecido como um material onde ocorre uma grande adesão de plaquetas (Mohammad *et al.*, 1974). Ao invés, a superfície

interna dos sacos de recolha de sangue não induz a adesão de plaquetas. Os valores da quantidade de plaquetas aderentes à superfície de cada réplica das SAMs tem de ser comparados levando em conta o envelhecimento do PRP, pelo que a quantidade de plaquetas aderentes à superfície foi expressa sob a forma de percentagem em relação a um controlo positivo processado em simultâneo. Definiu-se a percentagem de adesão de plaquetas a uma superfície como a média entre os valores da percentagem de plaquetas aderentes a cada réplica da SAM em relação às aderentes ao vidro, tomando o valor da percentagem da adesão de plaquetas do vidro como 100%. Analisando os resultados obtidos (Figs. 31 e 32), verifica-se que a percentagem de plaquetas aderentes à SAM de UDT (hidrofóbica, apolar) é superior, quando comparada à SAM de MUA (hidrofílica, polar com carga elétrica negativa).

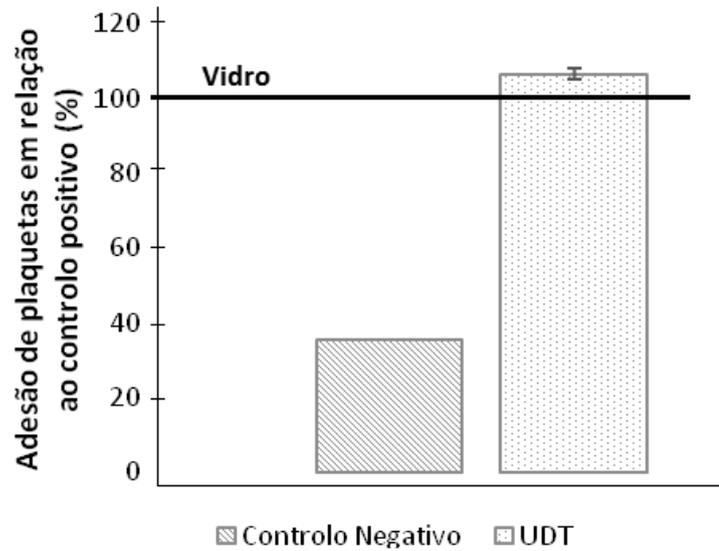


**Figura 31** – Representação da variação da percentagem de plaquetas aderentes à superfície, em relação ao controlo positivo, em função do ângulo de contacto da água da SAM de UDT e de MUA ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem de plaquetas aderentes à superfície em relação ao controlo positivo (vidro); as barras de erro horizontais são referentes ao desvio padrão do ângulo de contacto da água; a linha horizontal representa a percentagem de plaquetas aderentes ao vidro e a vertical o Limite de Berg). \*\*\* Diferença estatisticamente “extremamente significativa” ( $p < 0.0001$ ) entre a SAM de UDT e a SAM de MUA (teste  $t$  de Student). As barras de erro verticais da SAM de UDT são menores do que o marcador de ponto.



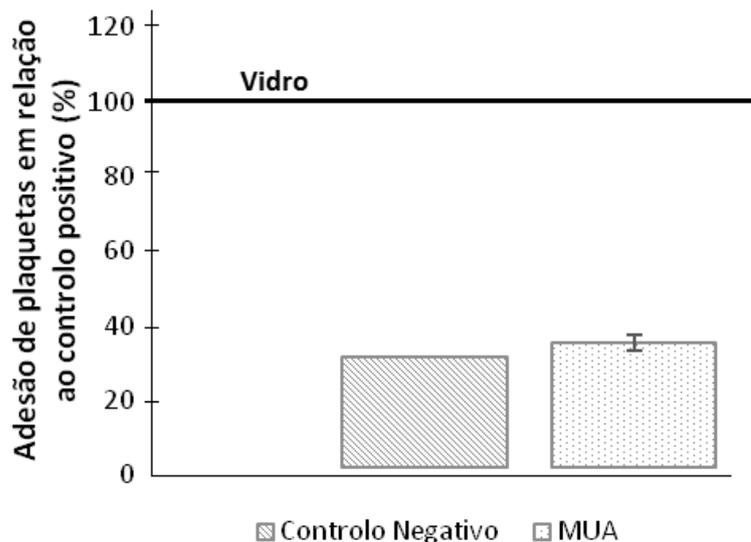
**Figura 32** – Representação da variação da percentagem de plaquetas aderentes à superfície, em relação ao controlo positivo, em função da tensão de adesão da água da SAM de UDT e de MUA ( $n = 3$ ; barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem de plaquetas aderentes à superfície em relação ao controlo positivo (vidro); as barras de erro horizontais são referentes ao desvio padrão da tensão de adesão da água; a linha horizontal representa a percentagem de plaquetas aderentes ao vidro e a vertical o Limite de Berg). \*\*\* Diferença estatisticamente “extremamente significativa” ( $p < 0.0001$ ) entre a SAM de UDT e a SAM de MUA (teste  $t$  de Student). As barras de erro horizontais verticais da SAM de MUA são iguais ao marcador de ponto; as barras de erro verticais da SAM de UDT são iguais ao marcador de ponto.

Comparativamente ao controlo positivo (lâmina de vidro), a SAM de UDT possui características idênticas, apesar do número de plaquetas aderentes à superfície da SAM de UDT ser ligeiramente superior ao do vidro. Relativamente ao controlo negativo, a adesão de plaquetas na face interna do saco de recolha de sangue é muito inferior quando comparado à SAM de UDT (Fig. 33).



**Figura 33** – Representação gráfica da variação da percentagem de plaquetas aderentes à superfície, em relação ao controlo positivo, do controlo negativo e da SAM de UDT. As barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem de plaquetas aderentes à superfície em relação ao controlo positivo ( $n = 3$ ). A linha horizontal representa a percentagem de plaquetas aderentes ao vidro.

A SAM de MUA e o controlo negativo (face interna do saco de recolha de sangue) possuem características semelhantes quanto à quantidade de plaquetas aderentes, apesar de na SAM de MUA a adesão de plaquetas ser ligeiramente superior. Quanto ao controlo positivo, a adesão de plaquetas é muito superior quando comparada à SAM de MUA (Fig. 34).



**Figura 34** – Representação gráfica da variação da percentagem de plaquetas aderentes à superfície, em relação ao controle positivo, do controle negativo e da SAM de MUA. As barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da percentagem de plaquetas aderentes à superfície em relação ao controle positivo ( $n = 3$ ). A linha horizontal representa a percentagem de plaquetas aderentes ao vidro.

O valor da tensão de adesão da água reflete a estrutura das moléculas de água próximo da superfície e, conseqüentemente, o tipo de interação. Como visto anteriormente, verifica-se que o valor da tensão de adesão da água da SAM de MUA é muito superior ao da SAM de UDT (Fig. 32). Na superfície da SAM de UDT (hidrofóbica), as moléculas de água não se encontram fortemente ligadas à superfície (estrutura 3D bem definida), pelo que as proteínas do plasma conseguem remover a camada de água e interagir diretamente com os grupos químicos da superfície. A camada de proteínas adsorvidas à superfície favorece a adesão celular (Vogler, 1998), nomeadamente, a adesão de plaquetas, que é mediada por proteínas adsorvidas. Na superfície da SAM de MUA (hidrofílica), as moléculas de água interagem fortemente com a superfície, formando uma camada de água interfacial fortemente ligada à superfície, não permitindo que as proteínas interajam com a superfície. Desta forma, como adsorção de proteínas é baixa, a adesão celular não é favorecida (Vogler, 1998).

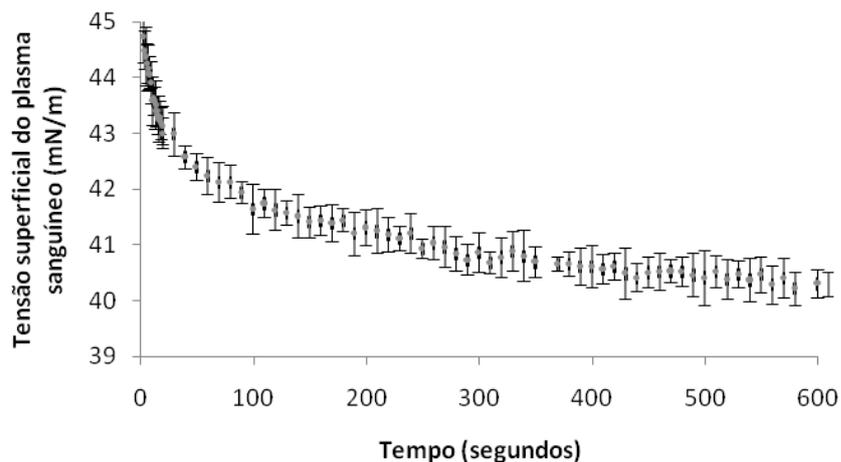
A adsorção de proteínas a uma superfície relaciona-se com a adesão celular, uma vez que a camada de proteínas adsorvidas à superfície, permite adesão celular através de proteínas transmembranares (Wittmer *et al.*, 2005). Assim sendo, a adsorção de proteínas é elevada em superfícies hidrofóbicas, promovendo a adesão celular, e é reduzida em superfícies hidrofílicas, sendo a adesão celular reduzida (Vogler, 1998). Conclui-se assim que, na superfície hidrofóbica e apolar (SAM de UDT), há uma grande adesão de plaquetas à superfície. Ao invés, na superfície hidrofílica e polar com carga elétrica negativa (SAM de MUA), a adesão de plaquetas à superfície é muito baixa. Os resultados obtidos estão de acordo com o conhecimento atual de que a adesão de plaquetas é superior nas superfícies hidrofóbicas (Sperling *et al.*, 2005).

### **3.2.3. Adsorção de Proteínas**

Neste trabalho, estudou-se a cinética da variação temporal do ângulo de contacto estático e da tensão superficial da água e do plasma sanguíneo. Este estudo permite avaliar o efeito de uma superfície sobre a adsorção de proteínas, uma vez que alterações na tensão interfacial plasma-superfície relativamente ao sistema superfície-água são uma consequência direta da quantidade de proteína adsorvida à superfície. No caso de ocorrer adsorção de proteínas do plasma às monocamadas, o valor da tensão interfacial plasma-superfície é menor do que a tensão interfacial água-superfície (Voigt *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1993).

## Determinação da Tensão Superficial do Plasma Sanguíneo Humano

A tensão superficial do plasma sanguíneo humano foi determinada a partir da curva cinética da tensão superficial do plasma, obtida para gotas pendentes de plasma. O valor médio da tensão superficial do plasma obtido foi de  $44,7 \pm 0,5$  mN/m ( $n = 5$ ) a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  (média do valor da tensão superficial do plasma para  $t = 0$  s; Fig. 35).



**Figura 35** – Representação gráfica de uma curva da variação da tensão superficial do plasma sanguíneo humano a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão da tensão superficial do plasma ( $n = 5$ ).

A diminuição da tensão superficial do plasma sanguíneo ao longo do tempo que se verifica ocorre devido à migração das proteínas do plasma para a superfície da gota, isto é, ocorre adsorção das proteínas do plasma à superfície da gota (Miller *et al.*, 1993).

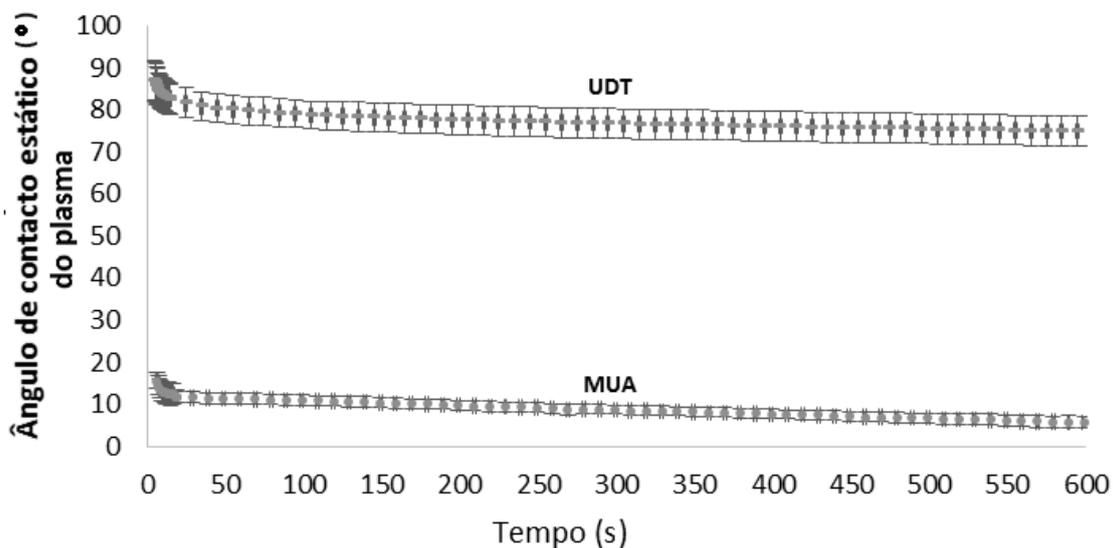
## Adsorção de Proteínas na SAM de UDT e de MUA

A SAM de UDT e de MUA permitem estudar o efeito da hidrofobicidade/hidrofilicidade e da polaridade na adsorção de proteínas do plasma. Na Tabela 4 e na Figura 36 encontram-se representados os resultados

obtidos, definindo-se o valor médio do ângulo de contacto estático do plasma sanguíneo como o valor médio obtido por regressão linear para o intervalo de tempo entre os 300 e 600 s a partir da curva cinética do ângulo de contacto estático do plasma para  $t = 600$  s.

**Tabela 4.** Valores médios do ângulo de contacto estático da água e do plasma sobre a SAM de UDT e de MUA ( $\theta_s$ ) (valor médio  $\pm$  desvio padrão;  $n = 5$ ), e os respetivos valores do trabalho de adesão (mN/m) (valor médio;  $n = 5$ ).

Superfície	$\theta_s$ (H <sub>2</sub> O) (°)	$W_A$ (H <sub>2</sub> O) (mN m <sup>-1</sup> )	$\theta_s$ (Plasma) (°)	$W_A$ (Plasma) (mN m <sup>-1</sup> )
<b>UDT</b>	106,2 $\pm$ 1,1	52,1	74,9 $\pm$ 3,5	56,4
<b>MUA</b>	16,5 $\pm$ 0,4	141,6	5,7 $\pm$ 1,4	89,3



**Figura 36** – Representação gráfica da cinética do ângulo de contacto estático do plasma na SAM de UDT e de MUA. ( $n = 5$ ; as barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão do ângulo de contacto estático do plasma). As barras de erro verticais são referentes ao desvio padrão do ângulo de contacto estático do plasma ( $n = 5$ ).

As tensões interfaciais plasma/UDT, água/UDT, plasma/MUA e água/MUA foram calculadas a partir das curvas cinéticas do ângulo de contacto estático e das tensões superficiais do plasma (44,7 mN/m; pág. 82) e da água (72,3 mN/m)<sup>5</sup> por combinação da equação de Young com a equação de estado de Neumann (ver secção 1.3.1). A Tabela 5 resume os parâmetros obtidos a partir dos estudos cinéticos da tensão superficial da água e do plasma para a SAM de UDT e de MUA.

**Tabela 5.** Valores da tensão superficial da SAM de UDT e de MUA ( $\gamma_{sv}$ ), da tensão interfacial da água e do plasma em contacto com a SAM de UDT e de MUA ( $\gamma_{sl}$ ) e tensão superficial do plasma ( $\gamma_{lv}$ ).

Superfície/ Líquido	Água		Plasma Sanguíneo	
	$\gamma_{sv}$ (mN/m)	$\gamma_{sl}$ (mN/m)	$\gamma_{sv}$ (mN/m)	$\gamma_{sl}$ (mN/m)
<b>UDT</b>	9,4	29,6	17,8	6,1
<b>MUA</b>	69,3	0,03	42,5	0,0003

O valor obtido da tensão superficial da SAM de MUA, quando em contacto com a água, é concordante com o valor encontrado na literatura (70,9 mN/m), apesar de neste trabalho ter sido calculado não pela “equação de estado” mas por uma outra teoria (Ahn *et al.*, 2003). Relativamente ao valor obtido da tensão superficial da SAM de UDT, quando em contacto com a água não é concordante com o valor encontrado na literatura (22,2 mN/m), ainda que

<sup>5</sup> A tensão superficial da água a 23 °C foi calculada a partir da equação  $\gamma_{lv} = 72,8 - 0,17 (T - 20 \text{ } ^\circ\text{C})$ , onde  $T$  é a temperatura em °C (Agathopoulos e Nikolopoulos, 1995).

este se refira a uma SAM com os mesmos grupos terminais, mas com um comprimento de cadeia superior (Ahn *et al.*, 2003). Pela análise dos resultados obtidos (Tab. 5), verifica-se que o valor da tensão interfacial plasma/UDT é muito inferior ao valor da tensão interfacial água/UDT, pelo que se pode concluir que ocorreu adsorção de proteínas do plasma à superfície (Miller *et al.*, 1993). O valor da tensão interfacial plasma/MUA é inferior ao valor da tensão interfacial água/MUA, o que significa que também ocorreu adsorção de proteínas do plasma à SAM de MUA. Verifica-se que a adsorção de proteínas é maior na SAM de UDT do que na SAM de MUA, uma vez que a diferença entre a tensão interfacial água/SAM e plasma/SAM é superior na SAM de UDT.

O trabalho de adesão foi calculado pela equação de Dupré (Equação 4) (secção 1.3.1). A vantagem do uso do trabalho de adesão reside no facto de que este parâmetro pode ser medido em qualquer instante, quer o sistema esteja em equilíbrio ou não (Sousa *et al.*, 2004). A comparação entre o trabalho de adesão água/MUA e plasma/MUA permite compreender a influência da adsorção de proteínas na interface sólido-líquido (Sousa *et al.*, 2004). Analisando os resultados obtidos, verifica-se que o trabalho de adesão do plasma em contacto com a SAM de UDT (Tab. 4) é semelhante, ainda que ligeiramente superior, ao trabalho de adesão da água em contacto com a mesma superfície, e ambos são bastante inferiores aos valores obtidos para a SAM de MUA. Uma vez que a SAM de UDT possui uma superfície hidrofóbica, devido à exposição dos grupos metilo, esta não interage favoravelmente com as moléculas de água devido ao seu carácter hidrofóbico, pelo que as forças de interação entre as moléculas de água e a superfície da SAM de UDT são menores. Como as proteínas podem possuir domínios hidrofóbicos à superfície, é possível estabelecerem interações com a superfície de UDT. O aumento do trabalho de adesão do plasma em contacto com a SAM de UDT, em relação à água em contacto com a mesma monocamada, é uma medida qualitativa da

adsorção de proteínas. O trabalho de adesão da água em contacto com a SAM de MUA é superior ao trabalho de adesão do plasma em contacto com a mesma SAM, o que significa que é necessário aplicar uma força maior para separar a água da SAM de MUA, do que aquela que seria necessário aplicar ao sistema plasma/MUA, ou seja, as forças de interação entre as moléculas de água e a superfície são maiores do que entre o plasma e a superfície. A deposição de uma camada de proteínas entre a SAM do MUA e o plasma, resultado da adsorção de proteínas do plasma à superfície, explica a diminuição no trabalho de adesão entre o plasma e a superfície em relação ao trabalho de adesão entre a água e a superfície. O trabalho de adesão do plasma em contacto com a SAM de MUA é superior ao trabalho de adesão do plasma em contacto com a SAM de UDT (Tab. 4). Estes resultados podem ser explicados por uma maior adsorção de proteínas do plasma à monocamada com características hidrofóbicas. Da adsorção de proteínas resulta uma camada proteica entre a superfície e o plasma, sendo que quanto maior for a camada de proteínas depositadas à superfície, menor é o número de locais disponíveis para a água do plasma interagir com a superfície, sendo que a força necessária para separar o plasma da superfície é tanto menor quanto maior a camada de proteínas depositadas. Estes resultados vão ao encontro de estudos anteriores, em que a adsorção de proteínas é superior em superfícies hidrofóbicas comparativamente às hidrofílicas (Krishnan *et al.*, 2006).

A adsorção de proteínas à superfície das SAMs tem um papel fundamental no que diz respeito à adesão celular e na ativação da coagulação (Grunkmeier *et al.*, 2000; Luchtman-Jones e Broze, 1995; Vogler, 1998). Na SAM de UDT, hidrofóbica e apolar, verifica-se que há uma maior adsorção das proteínas do plasma. Nas superfícies hidrofóbicas, as moléculas de água não interagem fortemente com a superfície (estrutura em rede 3D bem definida), pelo que as proteínas do plasma conseguem remover a camada de água de

hidratação interfacial, interagindo através de domínios hidrofóbicos diretamente com os grupos terminais da superfície. Uma vez depositada uma camada de proteínas sobre a superfície, esta funciona como elo de ligação para a adesão celular (Vogler, 1998). A maior adesão de plaquetas a esta superfície é explicada pela grande adsorção de proteínas do plasma, nomeadamente de proteínas específicas nesta interação, como a fibronectina, o fibrinogénio e o vWF (Grunkmeier *et al.*, 2000). A SAM de UDT, não ativa fortemente a via extrínseca e intrínseca (ativada por contacto) da coagulação. Estes resultados implicam que a ativação por contacto não é significativa nesta superfície, o que poderá dever-se ao facto do FXII, o complexo HMWK-FXI e o complexo HMWK-PK (envolvidos na ativação da via intrínseca) não adsorverem em grandes quantidades à superfície ou, se adsorverem mantêm a sua conformação nativa. Na SAM de MUA, hidrofílica e polar (com carga elétrica negativa), verifica-se que a adsorção de proteínas à superfície é reduzida. Nas superfícies hidrofílicas, as moléculas de água interagem fortemente com a superfície (estrutura em rede 3D colapsada), por ligações de hidrogénio, impedindo as proteínas do plasma de interagirem com a superfície (Vogler, 1998). Verifica-se que na SAM de MUA, a adesão de plaquetas é reduzida, podendo este resultado ser explicado pela baixa adsorção de proteínas à superfície, nomeadamente do fibrinogénio, da fibronectina e do vWF. No entanto, a SAM de MUA ativa fortemente a via intrínseca (ativada por contacto) da coagulação, podendo ser este resultado explicado, apesar da baixa adsorção, de um modo geral, de proteínas do plasma, pela grande adsorção do FXII, do complexo HMWK-FXI e do complexo HMWK-PK à superfície, envolvidos na ativação da via intrínseca (Luchtman-Jones e Broze, 1995). A via extrínseca da coagulação também é ativada pela SAM de MUA, não tão fortemente como a via intrínseca, ou seja, apesar da reduzida adsorção de proteínas do plasma à superfície, deverá ocorrer a adsorção do TF, responsável pela ativação da via extrínseca da coagulação. Assim sendo, perante os resultados obtidos, podemos

sugerir que a adsorção de proteínas na SAM de MUA será mais específica para um determinado tipo de proteínas, nomeadamente do FXII e do TF, enquanto que a SAM de UDT apresentará uma maior afinidade para o fibrinogénio, fibronectina e vWF (Rodrigues *et al.*, 2006).

#### 4. CONCLUSÃO

No presente trabalho estudou-se o efeito da hidrofiliicidade/hidrofobicidade e da carga elétrica de diferentes SAMs de alcanotióis sobre ouro na coagulação do plasma sanguíneo, na adesão de plaquetas e na adsorção de proteínas. Para tal, utilizaram-se superfícies-modelo, que consistiram na superfície de SAMs de 1-undecanotiol, UDT (hidrofóbica e apolar) e do ácido 11-mercapto-1-undecanoico, MUA (hidrofílica e com carga elétrica negativa). A SAM de UDT induziu menos a ativação da via intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação quando comparada com a SAM de MUA. Desta forma, podemos concluir que a superfície hidrofílica e com carga elétrica negativa (SAM de MUA), ativa mais fortemente a coagulação do plasma sanguíneo, pelas vias intrínseca e extrínseca, ao invés da superfície hidrofóbica, e apolar, que não ativa fortemente a coagulação. Relativamente à adesão de plaquetas nas superfícies, verificou-se que na SAM com características hidrofóbicas, apolar, as plaquetas aderiram em maior quantidade, quando comparadas à SAM hidrofílica, com carga elétrica negativa. Nos estudos de adsorção de proteínas à superfície das diferentes SAMs, verificou-se que, em ambas as SAMs (UDT e MUA), ocorreu adsorção de proteínas do plasma dado que o valor da tensão interfacial plasma-SAM ( $\gamma_{SL}$ ) é inferior ao valor da tensão interfacial água-SAM. O trabalho de adesão do plasma sanguíneo em contacto com a SAM de MUA foi superior ao trabalho de adesão do plasma em contacto com a SAM de UDT. Estes resultados podem ser explicados por uma maior adsorção de proteínas do plasma à superfície da SAM com características hidrofóbicas e, apolar, uma vez que quando as proteínas adsorvem à superfície, formando uma camada proteica entre a superfície e o plasma, sendo que quanto maior for a camada de proteínas depositadas à superfície, menos locais há disponíveis para que o plasma interaja com a superfície, sendo que a força

necessária para separar o plasma da superfície é tanto menor, quanto maior for a camada de proteínas depositadas. Estes resultados vão ao encontro de estudos anteriores, em que a adsorção de proteínas é maior em superfícies hidrofóbicas do que em superfícies hidrofílicas (Krishnan *et al.*, 2006).

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Abdelsalam, M.E., Bartlett, P.N., Kelf, T. & Baumberg, J. Wetting of regularly structured gold surfaces. *Langmuir* **21**, 1753-1757 (2005).
- Adam, F., Guillin, M.C. & Jandrot-Perrus, M. Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2959-2970 (2003).
- Adamson, A.W. & Gast, A.P. Physical chemistry of surfaces. 6nd Edition. Wiley, New York. 1997
- Agathopoulos, S. & Nikolopoulos, P. Wettability and interfacial interactions in bioceramic – body – liquid systems. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 421-429 (1995).
- Ahn, H-S., Cuong, P.D., Park, S., Kim, Y-W. & Lim, J-C. Effect of molecular structure of self-assembled monolayers on their tribological behaviors in nano- and microscales. *Wear* **255**, 819-825 (2003).
- Andrade, J.D. & Hlady, V. Protein adsorption and materials biocompatibility – a tutorial review and suggested hypotheses. *Adv. Polym. Sci.* **79**, 1-63 (1986).
- Arnold, R., Azzam, W., Terfort, A. & Woll, C. Preparation, modification, and crystallinity of aliphatic and aromatic carboxylic acid terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* **18**, 3980-3992 (2002).
- Bain, C.D., Evall, J. & Whitesides, G.M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold - variation in the head group, tail group, and solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7155-7164 (1989a).
- Bain, C.D., Troughton, E.B, Tao, Y.J. & Evall, J. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 321-335 (1989b).

- Bain, C.D. & Whitesides, G.M. Modeling organic-surfaces with self-assembled monolayers. *Angew. Chem-Ger. Edit.* **28**, 506-512 (1989).
- Barbosa, J.N., Martins, M.C.L, Freitas, S.C., Gonçalves, I.C., Águas, A.P & Barbosa, M.A. Adhesion of human leukocytes on mixtures of hydroxyl- and methyl- terminated self-assembled monolayers: Effect of blood protein adsorption. *J. Biomed. Mater. Res.* **93A**, 12-19 (2009).
- Barth, J.V., Brune, H. & Ertl, G. Scanning tunneling microscopy observations on the reconstructed Au (111) surface: Atomic structure, long-range superstructure, rotational domains and surface defects. *Phys. Rev.* **42B**, 9307-9318 (1990).
- Bellavite, P., Andrioli, G., Guzzo, P., Arigliano, P., Chirumbolo, S., Manzato, F. & Santonastaso, C. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal. Biochem.* **216**, 444-450 (1994).
- Berg, J.M., Eriksson, L.G.T., Claesson, P.M. & Borge, K.G.N. Three-component langmuir-blodgett films with a controllable degree of polarity. *Langmuir* **10**, 1225 -1234 (1994).
- Bennett, M.K. & Zisman, W.A. Confirmation of spontaneous spreading by water on pure gold. *J. Phys. Chem.* **74**, 2309-2312 (1970).
- acharya, S., Datta, A., Berg, J.M. & Gangopadhyay, S. studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength. *J. Microelectromech. S.* **14**, 590-597 (2005).
- Bigelow, W.C., Pickett, D.L. & Zisman, W.A. Oleophobic monolayers: films adsorberd from solution in non-polar liquids. *J. Colloid. Sci.* **1**, 513-538 (1946).

- Bradford, H.N., Pixley, R.A. & Colman, R.W. Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* **275**, 22756-22763 (2000).
- Camerer, E., Kolsto, A.B. & Prydz, H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb. Res.* **81**, 1-41 (1996).
- Cassie, A.B.D. Contact angle. *Discuss. Faraday Soc.* **3**, 11-16 (1948).
- Chen, H., Chen, J., Aoki, K. & Nishiumi, T. Electrochemically instantaneous reduction of conducting polyaniline-coated latex particles dispersed in acidic solution. *Electrochim. Acta.* **53**, 7100-7106 (2008).
- Chen, X., Wang, J., Paszti, Z., Wang, F., Schrauben, J.N. & Tarabara, V.V. Ordered adsorption of coagulation factor XII on negatively charged polymer surfaces probed by sum frequency generation vibrational spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 65-72 (2007).
- Cheung, A.K. Complement activation as index of hemodialysis membrane biocompatibility - the choice of methods and assays. *Nephrol. Dial. Transpl.* **9**, 96-103 (1994).
- Colman, R.W., Marder, J.V., Clomes, A.W., George, J.N. & Goldhaber, S.Z. Cook, J.J. & Niewiarowski, S. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Mechanisms of platelet aggregation. 5th Edition. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins 508-523 (1994).
- Cornelius, R.M., Shankar, S.P., Brash, J.L. & Babensee, J.E. Immunoblot analysis of proteins associated with self-assembled monolayers surfaces of defined chemistries. *J. Biomed. Mater. Res.* **98A**, 7-18 (2011).
- Decker, E.L., Frank, B., Suo, Y. & Garoff, S. Physics of contact angle measurements. *Colloid Surface* **156**, 177-189 (1999).
- Esmon, C.T. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Sci.* **235**, 1348-1352 (1987).

- Evans-Nguyen, KM., Tolles, LR., Gorkun, OV., Lord, ST. & Schoenfisch, MH. Interactions of thrombin with fibrinogen adsorbed on methyl-, hydroxyl-, amine, and carboxyl-terminated self-assembled monolayers. *Biochemistry*. **44**, 1561-1568 (2005).
- Folkers, J.P., Laibinis, P.E & Whitesides, G.M. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold: comparisons of monolayers containing mixtures of short-and long-chain constituents with CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub>OH terminal groups. *Langmuir* **8**, 1330-1341 (1992).
- Frank, R.D., Dresbach, H., Thelen, H. & Sieberth, H-G. Glutardialdehyde induce fluorescence technique (GIFT): A new method for the imaging of platelet adhesion on biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 374-381 (2000).
- Freire, R.S., Pessoa, C.A. & Kubota, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Quím. Nova* **26**, 381-389 (2003).
- García\_Raya, D., Madueño, R., Sevilla, J.M., Blázquez, M. & Pineda, T. Electrochemical characterization of a 1,8-octanedithiol self-assembled monolayer (ODT-SAM) on Au (111) single crystal electrode. *Electrochim. Acta.* **53**, 8026-8033 (2008).
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J. & Osborne, B.A. Kuby Immunology. 4th Edition. New York: W. H. Freeman and Company (2000).
- Gooding, J.J., Mearns, F., Yang, W. & Liu, J. Self-assembled monolayers in the 21<sup>st</sup> century: recent advances and applications. *Electroanal.* **15**, 81-93 (2003).
- Goodman, S.L. Sheep, pig and human platelet-materials interaction with model cardiovascular biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 240-259 (1999).

- Gorbett, M.B. & Sefton, M.V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factor, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* **24**, 5681-5703 (2004).
- Gorbett, M.B., Yeo, E.L. & Sefton, M.V. Flow cytometric study of in vitro neutrophil activation by biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* **44**, 289-297 (1999).
- Gorham, J., Smith, B. & Fairbrother, D.H. Modification of alkanethiolate self-assembled monolayers by atomic hydrogen: influence of alkyl chain length. *J. Phys. Chem.* **111C**, 374-382 (2007).
- GraphPad QuickCalcs. Disponível em: [www.graphpad.com/quickcalcs/](http://www.graphpad.com/quickcalcs/) (consultado a 26 de Junho de 2015).
- Gronbeck, H., Curioni, A. & Andreoni, W. Thiols and disulfides on the Au (111) surface: The headgroup-gold interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3839-3842 (2000).
- Grunkemeier, J.M., Tsai, W.B., McFarland, C.D. & Horbett, T.A. The effect of adsorbed fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and vitronectin on the procoagulant state of adherent platelets. *Biomaterials* **21**, 2243-2252 (2000).
- Guo, Q. & Li, F. Self-assembled alkanethiol monolayers on gold surfaces: resolving the complex structure at the interface by STM. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 19074-19090 (2014).
- Heemskerk, J.W., Bevers, E.M. & Lindhout, T. Platelet activation and blood coagulation. *J. Thromb. Haemost.* **88**, 186-193 (2002).
- Hillman, C.R.L. & Lusher, J.M. Determining the sensitivity of coagulation screening reagents: a simplified method. *Lab. Med.* **13**, 162-165 (1982).
- Hoffman, M. & Monroe, D.M. Rethinking the coagulation cascade. *Curr. Hemat. Rep.* **4**, 391-396 (2005).

- Hylton, D.M., Shalaby, S.W. & Latour, R.A. Direct correlation between adsorption induced changes in protein structure and platelet adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* **73A**, 349-358 (2005).
- Ilesanmi, O.O. Pathological basis of symptoms and crises in sickle cell disorder: implications for counseling and psychotherapy. *Hematol. Rep.* **26**, 10-23 (2010)
- ISO 10993-4: 2009. Avaliação Biológica dos Dispositivos Médicos – Parte 4: Seleção de Ensaio para Interações com Sangue (2009).
- Kao, W.J., Hubbell, J.A. & Anderson, J.M. Protein-mediated macrophage adhesion and activation on biomaterials: a model for modulating cell behavior. *J. Mater. Sci-Mater. Med.* **10**, 601-605 (1999).
- Kazatchkine, M.D. & Carreno, M.P. Activation of the complement-system at the interface between blood and artificial surfaces. *Biomaterials* **9**, 30-35 (1998).
- Kim, H.J., Kwak, S., Kim, Y.S., Seo, B.I., Kim, E.R. & Lee, H. Adsorption kinetics of alkanethiols studied by quartz crystal microbalance. *Thin Solid Films* **329**, 191-194 (1998).
- Kirkpatrick, C.J., Krump-Konvalinkova, V., Unger, R.E., Bittinger, F., Otto, M. & Peters K. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomol. Eng.* **19**, 211-217 (2002).
- Kirschfink, M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* **38**, 51-67 (1997)
- Kozin, F. & Cochrane, C.G. The contact activation system of plasma – biochemistry and pathophysiology. Raven Press New York. **2**, 101-120 (1992).
- KSV CAM 101 Manual, KSV Instruments, Finland (2006).
- Kwok, D.Y. & Neumann, A.W. Contact angle interpretation in terms of solid surface tension. *Colloid Surface* **161A**, 31-48 (2000).

- Laibinis, P.E. & Whitesides, G.M.  $\omega$ -Terminated alkanethiolate monolayers on surface of copper, silver and gold have similar wettabilities. *J. Am. Chem. Sci.* **40**, 1-26 (1991).
- Langdell, R.D., Wagner, R.H. & Brinkhous, K.M. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests. *J. Lab. Clin. Med.* **41**, 637-647 (1953).
- Larrieu M.J. & Weiland, C. Utilisation de la céphaline dans les tests de coagulation. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **12**, 199-210 (1957).
- Leibner, E.S., Barnthip, N., Chen, W., Baumrucker, CR., Badding, JV. & Pishko, M. Superhydrophobic effect on the adsorption of human serum albumin. *Acta Biomater.* **5**, 1389-1398 (2009).
- Leininger, R.I., Epstein, M.M., Falb, R.D. & Grode, G.A. Preparation of non-thrombogenic plastic surfaces. *ASAIO J.* **12**, 151-154 (1966).
- Li, B. & Logan, B.E. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloid Surface* **36B**, 81-90 (2004).
- Li, F., Tang, L., Zhou, W. & Guo, Q. Adsorption site determination for Au-octanethiolate on Au (111). *Langmuir* **26**, 9484-9490 (2010).
- Lim, F. & Cooper, S.L. Effect of sulfonate incorporation on in-vitro leukocyte adhesion to polyurethanes. *Biomaterials* **16**, 457-466 (1995).
- Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. & Whitesides, G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **105**, 1103-1169 (2005).
- Luchtman-Jones, L. & Broze, G.J. The current status of coagulation. *Ann. Med.* **27**, 47-52 (1995).
- Mackman, N., Tilley, R.E. & Key, N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscl. Throm. Vas.* **27**, 1687-1693 (2007).

- Margel, S., Vogler, E.A., Firment, L., Watt, T., Haynie, S. & Sogah, D.Y. Peptide, protein and cellular interactions with self-assembled monolayer model surface. *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 1463-1476 (1993).
- Miller, R., Treppo, S., Voigt, A., Zingg, W. & Neumann, A.W. Contact angle kinetics of human albumin solutions at solid surfaces. *Colloid Surface* **69**, 203-208 (1993).
- Mohammad, S.F., Hardison, M.D., Glenn, C.H., Morton, B.D., Bolan, J.C. & Mason, R.G. Adhesion of human blood platelets to glass and polymer surfaces. *Haemostasis* **3**, 257-270 (1974).
- Morais, J.M., Papadimitrakopoulos, F. & Burgess, D.J. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* **12**, 188-196 (2010).
- Mrksich, M. & Whitesides, G.M. Patterning self-assembled monolayers using microcontact printing: a new technology for biosensor. *Trends Biotechnol.* **13**, 228-235 (1995).
- Mrksich, M. & Whitesides, G.M. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Ann. Rev. Bioph. Biom.* **25**, 55-78 (1996).
- Murphy, R.T., Foley, J.B., Crean, P. & Walsh, M.J. Reciprocal activation of leukocyte- endothelial adhesion molecules in acute coronary syndromes. *Int. J. Cardiol.* **90**, 247-252 (2003).
- Neame, P.B, Kelton, J.G, Walker, I.R., Stewart, L.O., Nossel, H.L. & Hirsch, J. Thrombocytopenia in septicemia: The role of disseminated intravascular coagulation. *Blood* **56**, 88-92 (1980).
- Nimeri, G., Ohman, L., Elwing, H., Wettero, J. & Bengtsson, T. The influence of plasma proteins and platelets on oxygen radical production and F-actin distribution in neutrophils adhering to polymer surfaces. *Biomaterials* **23**, 1785-1795 (2002).

- Nuzzo, R.G. & Allara, D.L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4481-4483 (1983).
- Nuzzo, R.G., Zegarski, B.R. & Dubois, L.H. Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold (111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 733-740 (1987).
- Teco, Germany. Operation Manual for Coatron M1 C1.20 (2008).
- Phillips, D.R., Charo I.F., Parise, L.V. & Fitzgerald L.A. The platelet membrane glycoprotein IIb - IIIa complex. *Blood* **71**, 831-843 (1988).
- Prime, K.L. & Whitesides, G.M. Self-assembled organic monolayers: Model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*. **252**, 1164-1166 (1991).
- Quick, A.J. Determination of prothrombin. *Jama-J. Am. Med. Assoc.* **112**, 2552-2561 (1939).
- Quick, A.J. The hemorrhagic diseases and the physiology of hemostasis. *Am. J. Med. Sci.* **205**, 432-441 (1942).
- Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J. & Lemons, J.E. Biomaterial sciences. 2nd Edition. Massachussets: Elsevier Academic Press (2004).
- Ratner, B.D. The catastrophe revisited: blood compatibility in the 21st Century. *Biomaterials* **28**, 5144-5147 (2007).
- Rauch, U. & Nemerson, Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 139-143 (2000).
- Ren, Y., Patel, K. & Craine, T. A review of antiplatelet drugs, coronary artery diseases and cardiopulmonary bypass. *J. Extra-Corp. Technol.* **42**, 103-113 (2010).
- Rodrigues, S.N., Gonçalves, I.C., Martins, M.C.L., Barbosa, M.A. & Ratner, B.D. Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed

- hydroxyl-/ methyl-terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials* **27**, 5357-5367 (2006).
- Sanchez, J., Lundquist, P.B., Elgue, G., Larsson, R. & Olsson, P. Measuring the degree of plasma contact activation induced by artificial materials. *Thromb. Res.* **105**, 407-412 (2002).
  - Schmidbauer, S., Nerlich, C., Weimer, T., Kronthaler, U., Metzner, H. & Schulte, S. Prevention of thrombotic events by Factor XIIa inhibitors. *Hämostaseologie* **29**, 22-31 (2009).
  - Schulman, G., Hakim, R., Arias, R., Silverberg, M., Kaplan, AP. & Arbeit, L. Bradykinin generation by dialysis membranes: possible role in anaphylactic reaction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 1563-1569 (1993).
  - Schwartz, D.K. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52**, 107-137 (2001).
  - Sefton, M.V. Material-induced tissue factor expression but not CD11b up regulation depends on the presence of platelets. *J. Biomed. Mater. Res.* **67A**, 792-800 (2003).
  - Sellborn, A., Andersson, M., Fant, C., Gretzer, C. & Elwing, H. Methods for research on immune complement activation on modified sensor surfaces. *Colloid Surface* **27B**, 295-301 (2003).
  - Shen, Y., Romo, G.M., Dong, J-F., Schade, A., McIntire, L.V., Kenny, D., Whisstock, J.C. Berndt, M.C., López, J.A. & Andrews, R.K. Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein (GP) Ib $\alpha$  for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP Ib-IX-V complex. *Blood* **95**, 903-910 (2000).
  - Singh, B. K. & Hillier, A.C. Surface plasmon resonance imaging of biomolecular interactions on a grating-based sensor array. *Anal. Chem.* **78**, 2009-2018 (2006).

- Sivaraman, B. & Latou, R.A. The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen. *Biomaterials* **31**, 832-839 (2010).
- Smith, T. The hydrophilic nature of a clean gold surface. *J. Colloid Interf. Sci.* **75**, 51-55 (1980).
- Sousa, S.R., Moradas-Ferreira, P., Saramago, B., Viseu Melo, L. & Barbosa, M.A. Human serum albumin adsorption on TiO<sub>2</sub> from single protein solutions and from plasma. *Langmuir* **20**, 9745-9754 (2004).
- Sperling, C., Maitz, M.F., Talkenberger, S., Gouzy, M.F., Groth, T. & Werner, C. In vitro blood reactivity to hydroxylated and non-hydroxylated polymer surfaces. *Biomaterials* **28**, 3617-3625 (2007).
- Sperling, C., Schweiss, R., Streller, U. & Werner, C. In vitro hemocompatibility of self-assembled monolayers displaying various functional groups. *Biomaterials* **26**, 6547-6557 (2005).
- Tegoulia, V.A. & Cooper, S.L. Leukocyte adhesion on model surfaces under flow: Effects of surface chemistry, protein adsorption, and shear rate. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 291-301 (2000).
- Tidwell, C.D., Ertel, S.I., Ratner, B.D., Tarasevich, B.J., Atre, S. & Allara, D.L. Endothelial cell growth and protein adsorption on terminally functionalized, self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Langmuir* **13**, 3404-3413 (1997).
- Triplett, D.A., Harms, C.S. & Koeple, J.A. The effect of heparin on the activated partial thromboplastin time. *Am. J. Clin. Pathol.* **70**, 556-559 (1978).
- Ulman, A. An introduction to ultrathin organic films from Langmuir-Blodgett to self-assembly. 1st Edition. Academic Press, New York 279-292 (1991).

- Ulman, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533-1554 (1996).
- Ulman, A., Evans, S.D., Shidman, Y., Sharma, R. & Eilers, J.E. Mixed alkanethiol monolayers on gold surface: wetting and stability studies. *Adv. Colloid Interfac.* **39**, 175-224 (1992).
- Ulrich, H.J., Stumm, W. & Cosovic, B. Adsorption of aliphatic fatty acids on aquatic interfaces. Comparison between two model surfaces: the mercury electrode and  $\delta - \text{Al}_2\text{O}_3$  colloids. *Environ. Sci. Technol.* **22**, 37-44 (1988).
- van Oeveren, W., Haan, J., Lagerman, P. & Schoen, P. Comparison of coagulation activity tests in vitro for selected biomaterials. *Artif. Organs* **26**, 506-511 (2002).
- van Oss, C.J. & Giese, R.F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays and Clay Minerals* **43**, 474-477 (1995).
- Vansant, E. F.; Van der Voort, P.; Vrancken, K. C. Characterization and Modification of the Silica Surface; Elsevier: Amsterdam, 1995.
- VassarStats: Statistical Computation Web Site. Disponível em: [vassarstats.net/anova1u.html](http://vassarstats.net/anova1u.html) (26 de Junho de 2015).
- Vericat, C., Vela, M.E. & Salvarezza, R.C. Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au (111): surface structures, defects and dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 3258-3268 (2005).
- Vericat, C., Vela, M.E., Benitez, G., Carro, P. & Salvarezza, R.C. Self-assembled monolayers of thiol and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1805-1834 (2010).
- Vogler, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv. Colloid Interfac.* **74**, 69-117 (1998).
- Voigt, A., Thiel, O., Williams, D., Policova, Z., Zingg, W. & Neumann, A.W. Axisymmetric drop shape analysis (ADSA) applied to protein solutions. *Colloid Surface* **58**, 315-326 (1991).

- Wagner, R. & Yourke, A, Alkaline and acid phosphatases in white blood cells and blood platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 174-183 (1955).
- Wang, H., Chen, S., Lingyan Li & Jiang, S. Improved method for the preparation of carboxylic acid and amine terminated self-assembled monolayers of alkanethiolates. *Langmuir* **21**, 2633-2636 (2005).
- Werner, C., Maitz, M.F. & Sperling C. Current strategies towards hemocompatible coatings. *J. Mater. Chem.* **17**, 3376-3384 (2007).
- Williams, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941-2953 (2008).
- Wittmer, C.R. & Van Tassel, P.R. Probing adsorbed fibronectin layer structure by kinetic analysis of monoclonal antibody binding. *Colloid Surface* **41B**, 103-109 (2005).
- Wittstock, G. & Schuhmann, W. Formation and imaging of microscopic enzymatically active spots on an alkanethiolate-covered gold electrode by scanning electrochemical microscopy. *Anal. Chem.* **69**, 5059-5066 (1997).
- Wu, Z., Zhang, X., Zhang, X., Li, G., Sun, J., Zhang, Y., Li, M. & Hu, J. Nanobubbles influence on BSA adsorption on mica surface. *Surf. Interface Anal.* **38**, 990-995 (2006).
- Xu, S., Cruchon-Dupeyrat, S.J.N., Garno, J.C., Lui, G-Y., Jennings, G.K., Young, T-H. & Laibinis, P.E. In situ studies of thiol self-assemble on gold from solution using at force microscopy. *J. Chem. Phys.* **108**, 5002-5012 (1998).
- Yun, J.K., Defife, K., Colton, E., Stack, S., Azeez, A. & Cahalan, L. Human monocyte-macrophage adhesion and cytokine production on surface modified poly(tetrafluoroethylene hexafluoropropylene) polymers with and without protein preadsorption. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 257- 268 (1995).

- Yung, L.Y.L., Colman, R.W. & Cooper, S.L. The effect of high molecular weight kininogen on neutrophil adhesion to polymer surfaces. *Immunopharmacology* **43**, 281-286 (1999).
- Yung, L.Y.L., Lim, F., Khan, M.M.H., Kunapuli, S.P., Rick, L. & Colman, R.W. High molecular- weight kininogen preadsorbed to glass surface markedly reduces neutrophil adhesion. *Biomaterials* **21**, 405-414 (2000).
- Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R.K. & Ley, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* **21**, 99-111 (2007).
- Zhang, X., Lhuissier, H., Sun, C. & Lohse, D. Surface nanobubbles nucleate microdroplets. *Phys. Rev. Lett.* **112**, 144503-144507 (2014).
- Zhuo, R., Siedlecki, C.A. & Vogler, E.A. Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biomaterials* **27**, 4325-4332 (2006).