

## MODIFICAÇÃO DE POLIURETANOS PELA RADIAÇÃO PARA A HEPARINIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

Eric Kinnosuke Maritns Ueda<sup>1</sup>, Álvaro Antônio Alencar de Queiroz<sup>2</sup>, Olga Zazuco Higa<sup>1</sup>, Marina Junko Siotsu Maizato<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - CNEN / SP

<sup>2</sup> Escola Federal de Engenharia de Itajubá - EFEI - MG

<sup>3</sup> Instituto do Coração - INCOR

Travessa R no.400 Cidade Universitária, CEP 05508 -900, Cx. Postal 11049 (Pinheiros)

Fone : (011) 816 9230 - Fax : (011) 816 9232

## RESUMO

A heparina é conhecida pela sua propriedade anticoagulante e sua imobilização em superfícies poliméricas é a abordagem para aumentar a antitrombogenicidade de biomateriais. No propósito de heparinizar filmes de poliuretanos foi inicialmente investigado sua modificação via enxertia induzida por radiação ionizante. A enxertia do poliuretano com N-isopropil acrilamida (NIPAAm) e ácido acrílico (AA) foi realizada pelo método da irradiação simultânea em uma fonte de <sup>60</sup>Co. Filmes de poliuretano de grau médico foram colocados em ampolas de vidro em uma solução do monômero / solvente a diversas concentrações (10-50% v/v) com doses totais de 1.8-14.43 kGy e taxas de dose de 0.093-1.573 kGy/h. Os poliuretanos enxertados foram caracterizados físico-quimicamente (espectrometria no IV, medida de ângulo de contato, hidrofiliabilidade) em seus vários níveis de enxertia. O acoplamento da heparina foi efetuado por ligação química e por adsorção física nas superfícies enxertadas.

Descritores : Enxertia, heparinização

## ABSTRACT

The heparin is known by its anticoagulant property and its immobilization on polymeric surfaces is an approach for the prevention of thrombogenicity of biomaterials. On the purpose of heparinization, the modification of polyurethanes films by radiation grafting was studied. The polyurethane surface modification with N-isopropyl acrylamide (NIPAAm) and acrylic acid (AA) was carried out by the simultaneous irradiation method on a <sup>60</sup>Co source. Medical grade polyurethane films were placed in glass ampoules with a monomer / solvent solution on several concentrations (10 - 50 % v/v). After bubbling N<sub>2</sub>, the ampoules were sealed and irradiated with dose rates in the range of 0.093 to 1.573 kGy / h and total doses ranging from 1.8 to 14.53 kGy. The grafted films were characterized physico-chemically (IR spectroscopy, contact angle measurements and water sorption). The heparin coupling was carried out by chemical bound and physical adsorption on the grafted surfaces.

key words : Grafting, heparinization

## INTRODUÇÃO

A característica superficial das células do endotélio vascular, assim como os fatores que estas mesmas células expressam são responsáveis pela hemocompatibilidade do tecido endotelial vascular<sup>(1)</sup>. Tendo em vista essas duas principais propriedades, podemos aplicá-las na obtenção de superfícies poliméricas com um baixo grau de trombogenicidade. A modificação de superfícies de matrizes poliméricas por enxertia induzida por radiação ionizante associada a imobilização de macromoléculas pode render superfícies com maior hemocompatibilidade do que o uso de apenas uma das abordagens<sup>(2)</sup>.

A imobilização de heparina tanto adsorvida, ionicamente, como ligada covalentemente a diversos biomateriais tem tido resultados com vários graus de efetividade<sup>(3)</sup>. No presente trabalho foram estudados

os parâmetros de enxertia, a caracterização físico-química das superfícies poliméricas, e a correlação entre o grau de modificação das superfícies e a eficiência da imobilização de heparina.

## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Filmes de poliuretano (PU) com dimensões de aproximadamente 2 x 2 cm e 0,1 mm de espessura cedidos pelo INCOR foram lavados com água destilada, deionizada e detergente neutro sonificada. Após enxaguados com água destilada foram secos sob vácuo a temperatura ambiente até peso constante. Os monômeros NIPAAm (KODAK) e ac. acrílico (AA) (Down, Chemical Co) foram utilizados sem purificação.

Os demais reagentes de grau analítico foram utilizados como recebidos.

### Enxertia<sup>(4)</sup>

Os filmes de PU foram transferidos para ampolas de vidro contendo uma solução de monômeros / solvente (NIPPA<sub>m</sub> / MeOH, AA / H<sub>2</sub>O ou AA / MeOH) a diversas concentrações ( 10 - 50 % v/v). Após deaeração com N<sub>2</sub> por 3 minutos (90 ml / min.), as ampolas foram seladas e irradiadas em uma fonte de <sup>60</sup>Co (fonte panorâmica, atividade de 2.000 Ci) em taxas de dose e dose de irradiação, de 0,09392 a 1,573 k Gy / h e 1,8 a 14,43 k Gy respectivamente.

Após a irradiação os filmes foram retirados das ampolas, extraído-se o homopolímero e monômero residuais com uma solução de água destilada / metanol (1:1).

Após o processo de extração, os filmes foram secos sob vácuo até atingirem peso constante.

O percentual de enxertia foi calculado por método gravimétrico segundo a expressão (A) :

$$E\% = [(P_0 - P_1) : P_1] \times 100 \quad (A)$$

Onde P<sub>0</sub> representa a massa do filme não enxertado e P<sub>1</sub> representa a massa do filme enxertado.

### Sorção de água

A hidrofiliabilidade foi avaliada pela sorção de água nos polímeros .

Os filmes foram acondicionados em tubos contendo água destilada e deionizada por 24 horas a 25°C . O excesso de água foi extraído com papel de filtro de modo análogo para cada filme.

O percentual de sorção de água (H%) foi calculado gravimetricamente por:

$$H\% = [(M_0 - M_1) : M_1] \times 100 \quad (B)$$

Onde M<sub>0</sub> representa a massa do filme antes da sorção de água e M<sub>1</sub> representa a massa do filme depois da sorção de água .

### Ângulo de contato

A molhabilidade dos filmes foi determinada por medidas de ângulo de contato, tendo sido utilizada a técnica de projeção horizontal de uma microgota de água na superfície polimérica.

Os filmes foram acondicionados em um ambiente com umidade relativa de 80 - 90%, e depois de ambientados foram fixados no suporte de um projetor. Uma gota de água destilada e deionizada (10 µl) foi colocada sobre a superfície com a ajuda de uma micropipeta e cada medida foi realizada em média de 5 leituras.

### Imobilização de albumina sérica bovina

Filmes enxertados com ácido acrílico foram ativados segundo o método de Fischer<sup>(5)</sup>.

Os filmes ativados foram colocados numa solução de BSA de concentração 1mg / ml. O acoplamento foi quantificado pelo método de Bradford<sup>(6)</sup>.

### Imobilização de heparina<sup>(11)</sup>

Foi utilizada heparina sódica ( Liquevine<sup>®</sup>) partindo-se de uma solução padrão de 50 mg/mL . A quantificação foi feita segundo o método modificado descrito por Smith e colabs<sup>(7)</sup>.

No ensaio onde imobilizamos heparina por adsorção, utilizamos filmes de PU enxertados com NIPAA<sub>m</sub> . Os filmes foram segmentados em dimensões de aproximadamente 2 x 1 cm e colocados em soluções de heparina contendo 40 e 60 mg de heparina por 18 horas. Após este período, foi quantificada a heparina livre em cada solução.

No ensaio de imobilização covalente foi utilizado PU-g-AA com grau de enxertia 11,7%. O filme foi tratado segundo o método de Fisher<sup>(7)</sup> . O filme ativado foi colocado *overnight* em uma solução contendo 40 mg de heparina O acoplamento foi avaliado pela quantidade de heparina livre como descrito na adsorção de heparina .

### Espectroscopia no infravermelho

Os copolímeros de enxerto foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho , utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 1310 .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Enxertia

O efeito da concentração do monômero está representada na figura 1 onde é mostrada que a concentração ótima de AA é de 40% .

A razão para a diminuição do E% para concentrações de AA superiores a 40% v/v pode ser atribuída a baixa solubilidade do monômero poli (ácido acrílico) enxertado na superfície do polímero, o que limitaria o acesso do monômero aos radicais criados na matriz polimérica<sup>(8)</sup>.

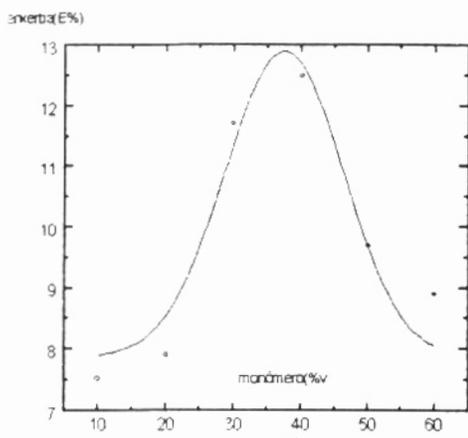


Figura 1: efeito da concentração de AA, na enxertia do PU. Dose de irradiação: 2,8KGy; taxa de dose: 0,54KGy/h; solvente: H<sub>2</sub>O; inibidor: CuSO<sub>4</sub> 0,5%.

A figura 3 mostra a dependência entre o grau de enxertia e a dose de irradiação do AA em filmes de PU.

O percentual de enxertia aumentou com a dose de irradiação e isto pode ser devido ao fato de que a superfície da matriz possui uma alta densidade de radicais. O intervalo de dose estudado compreende a fase inicial do processo de enxertia. Doses mais altas levariam a uma saturação na densidade de radicais formados na matriz polimérica, resultando numa saturação nos graus de enxertia<sup>(8)</sup>.

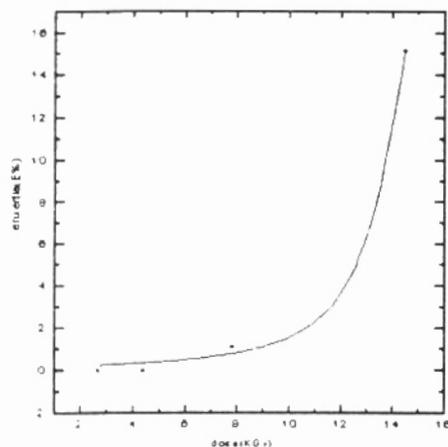


Figura 3: influência na dose de irradiação na enxertia de NIPAAm sobre o PU, solvente: MeOH 30% (v/v).

### Ângulo de contato

Tabela I: Valores de ângulo de contato das superfícies enxertadas.

MATERIAL	GRAU(°)	E%
PU	85 ± 8	0
Silicone de grau médico	103 ± 3	0
PU-g-NIPAAm	61 ± 7	6,5
PU-g-NIPAAm	53 ± 8	15,14
PU-g-AA	45 ± 3	7,9
PU-g-AA	44 ± 3	11,7

### Sorção de água

As figuras 4 e 5 mostram a influência do grau de enxertia na sorção de água nos copolímeros de PU-g-AA e PU-g-NIPAAm respectivamente.

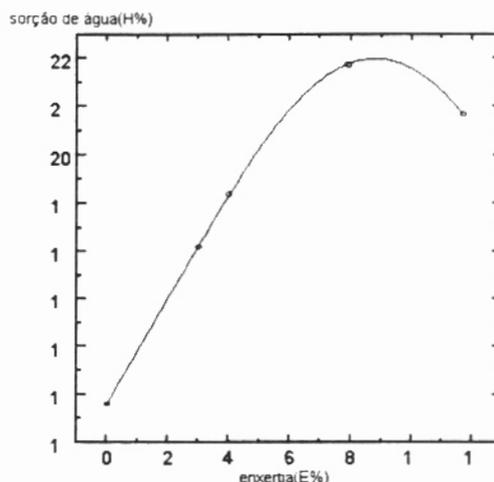


Figura 4: Influência do grau de enxertia (E%) na sorção de água para os copolímeros de PU-g-AA.

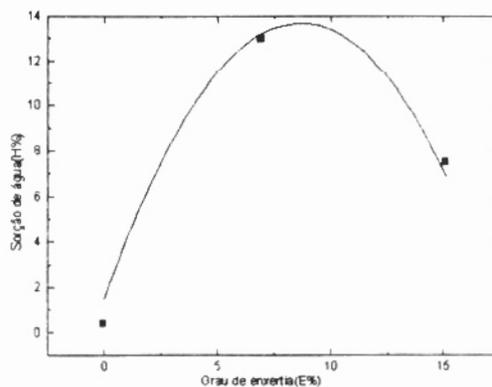


Figura 5: Influência do grau de enxertia na sorção de água nos copolímeros de PU-g-NIPAAm.

A hidrofiliicidade das superfícies é aumentada com o nível de enxertia do PU comprovada pelo aumento do grau de molhabilidade e sorção de água nas amostras (Tabela I e figuras 4 e 5).

## Espectroscopia no infravermelho

As cadeias de PNIPAAm e PAA enxertadas nas matrizes poliméricas de PU foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho, destacando-se as bandas do estiramento dos grupamentos NH ( $3300\text{ cm}^{-1}$ ) e CH ( $2900\text{ cm}^{-1}$ ) e os estiramentos C=O e deformações NH ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ) no PU (E%=0). A enxertia de NIPAAm promove um aumento e alargamento das bandas de  $3300\text{ cm}^{-1}$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$ .

## Imobilização de heparina

Através da figura 6 podemos visualizar como o grau de enxertia pode influenciar no coeficiente de imobilização de heparina nas superfícies poliméricas modificadas.

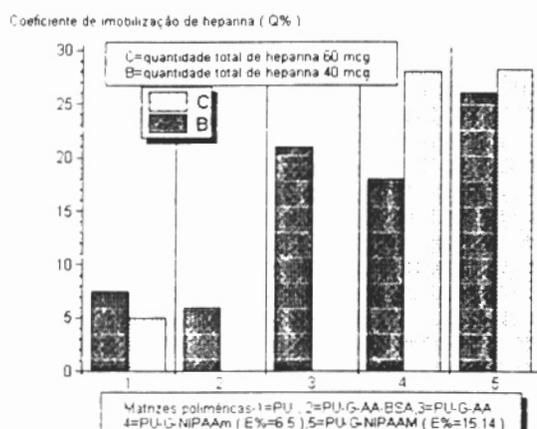


Figura 6 Imobilização da heparina nas superfícies poliméricas.

Utilizando-se duas concentrações diferentes de heparina (40 e 60 mcg) verificamos que as superfícies de PU enxertadas adsorveram maior quantidade de heparina (figura 6, coluna 4 e 5) comparativamente as superfícies não enxertadas e ativadas com BSA (figura 6, colunas 1 e 2).

O rendimento de imobilização covalente foi semelhante ao observado com as imobilizações por adsorção (figura 6, colunas 3, 4 e 5).

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

## BIBLIOGRAFIA

1. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Pathologic Basis of Disease, 5<sup>th</sup> edition. P. 100-101, W. B. Saunders Co., 1994.
2. LABARRE, M.; JOSEFOWICZ, M.; Properties of heparin-poly(methylmethacrylate) copolymers II. *J. Biomed Mater. Res.*, 11:283-295, 1977.
3. HEYMAN, P. W.; CHO, C. S.; McREA, J. C.; OLSEN, D. B.; KIM, S. W. Heparinized polyurethanes: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Biomed Mater. Res.*, 19:419-436, 1985.

4. JANSEN, B.; ELLINGHORST, G. Modification of polyurethane for biomedical application by radiation induced grafting, *J. Biomed Mater. Res.* 19: 1085-1099, 1985.

5. ROYALS, E. E., Advanced organic chemistry, p. 600 Prentice Hall, U.S.A. 1956.

6. BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 - 254, 1976.

7. SMITH, P. K.; MALLIA, A. K.; HERMANSON, G. T. Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized preparation. *Anal. Biochem.*, 109: 466 - 473, 1980.

8. RABIE, A.; ODIAN, G., Kinetics of diffusion - free radiation graft polymerization of styrene on to polyethylene. *J. Polym. Sci.*, 15: 469 - 488, 1977.