



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**OBTENÇÃO DE SUPERFÍCIES HEMOCOMPATÍVEIS POR
MEIO DA MODIFICAÇÃO DE MATERIAIS POLIMÉRICOS
PELA RADIAÇÃO IONIZANTE**

ARLETE TAVARES ALMEIDA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Olga Zazuco Higa

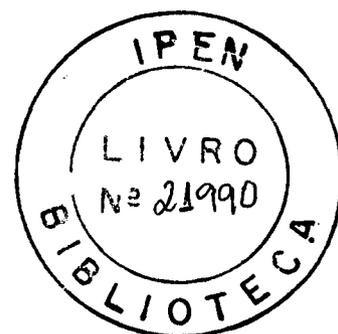
São Paulo
2000

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**OBTENÇÃO DE SUPERFÍCIES HEMOCOMPATÍVEIS POR
MEIO DA MODIFICAÇÃO DE MATERIAIS POLIMÉRICOS
PELA RADIAÇÃO IONIZANTE**

ARLETE TAVARES ALMEIDA



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:
Dra. Olga Zazuco Higa

SÃO PAULO

2000

A ciência é a procura da verdade, não é um jogo no qual uma pessoa tenta derrubar seus oponentes, prejudicar outras pessoas...

Linus Pauling

Aos meus pais, Angelina e Percílio, cuja dedicação me possibilitou vencer mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

- Dra. Olga Zazuco Higa e Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiróz pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança em mim depositada.
- Às instalações do IPEN/CNEN-SP sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.
- Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.
- Eng.º Carlos Gaia da Silveira e Eng.ª Elizabeth S. Ribeiro Somessari (IPEN) pelas irradiações.
- Dr. Eddy Segura Pino e Eng.º Manoel Nunes Mori pelos ensaios de tração.
- Dr. Luis Filipe Carvalho P. de Lima pelos ensaios de análise dinâmico-mecânica.
- À Diretoria de Materiais do IPEN/CNEN-SP pela possibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.
- Dr. Yoshio Kawano (IQ/USP) pelas sugestões.
- À amiga Sizue Ota Rogero (Cietec - IPEN/CNEN-SP) pelos ensaios de biocompatibilidade e apoio nos momentos difíceis.
- Dr. Hugo Collantes pelo auxílio na interpretação dos resultados dos planejamentos fatoriais e Dra. Selma L. Guedes pelo incentivo à realização dos mesmos.
- Dra. Flávia Martellini pelas sugestões e análise de microscopia óptica.
- Edgard Camboim Nascimento pelo total apoio, carinho e compreensão que muito me auxiliaram na superação dos momentos mais difíceis.
- Aos amigos Helena, Vera Lúcia, Andrea, Márcio, Junqueira, Luís Lobo e Valda pelo apoio e momentos de alegria vividos durante a minha permanência no IPEN.
- A tantos outros que de um modo ou de outro me apoiaram no desenvolvimento deste trabalho.

OBTENÇÃO DE SUPERFÍCIES HEMOCOMPATÍVEIS POR MEIO DA MODIFICAÇÃO DE MATERIAIS POLIMÉRICOS PELA RADIAÇÃO IONIZANTE

Arlete Tavares Almeida

RESUMO

Polímeros sintéticos formam atualmente a mais diversa classe de biomateriais, com uma grande demanda na obtenção de materiais compatíveis com o sangue. O objetivo deste trabalho foi melhorar a propriedade de hemocompatibilidade das superfícies de polidimetilsiloxano (PDMS) e poli(tereftalato de etileno) (PET), ambos polímeros já muito utilizados na confecção de suprimentos médicos, por meio da modificação com poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA), um hidrogel sintético que vem sendo utilizado desde 1960 como um material com propriedades biocompatíveis. O método escolhido foi a polimerização induzida por radiação gama proveniente de fonte de ^{60}Co , que permite a obtenção de materiais com alto grau de pureza. O monitoramento das condições experimentais (concentração da solução monomérica, dose e taxa de dose de radiação) foi realizado por meio de planejamentos fatoriais. O estudo concluiu que a modificação do PDMS com PHEMA depende fortemente da dose de radiação e concentração da solução monomérica, enquanto que a modificação da matriz de PET sofre influência de todos estes parâmetros. Os materiais obtidos neste trabalho foram caracterizados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e medida da variação da hidrofobicidade. Ensaio mecânicos mostraram que a variação do módulo de Young (E) pode estar diretamente relacionado tanto à quantidade de cadeias de PHEMA presentes na matriz quanto às características físico-químicas da matriz polimérica. Visando aumentar a hemocompatibilidade, foi realizada sobre a matriz de PDMS modificada, a imobilização química do soro de albumina humana, que passivando esta superfície pôde prevenir a formação de trombos. Superfícies modificadas com 12 a 83% em massa de cadeias de PHEMA imobilizaram cerca de 0,35mg de albumina por mg de copolímero. A hemocompatibilidade foi avaliada por testes *in vitro* que compreenderam o estudo de adesão de plaquetas, cinética de coagulação sanguínea e atividade hemolítica. A modificação das matrizes com PHEMA contribuiu para a melhora da tromborresistência, tendo sido mais significativa nos filmes de PET.

**OBTAINMENT OF HEMOCOMPATIBLE SURFACES BY THE
MODIFICATION OF POLYMERIC MATERIALS BY
IONIZING RADIATION**

Arlete Tavares Almeida

ABSTRACT

Synthetic polymers constitute by far the most diverse class of biomaterials, and there has been an increased demand for materials compatible with blood. The main objective of this work was the improvement of the surface hemocompatibility of polydimethylsiloxane (PDMS) and poly(ethylene terephthalate) (PET), both polymers widely used in medical supplies. The purpose was achieved by gamma radiation induced grafting of (2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA), a synthetic hydrogel known by its biocompatible properties since 1960. The chosen method was the mutual irradiation grafting in a ^{60}Co source, which allows the attainment of material of high purity. The management of experimental conditions, such as monomer concentration, dose rate and radiation dose was carried out by factorial design. For PDMS it was showed that the grafting level depends on dose rate and monomer concentration. For the PET all the parameters showed a statistically significance in the grafting process. The copolymers were characterized by scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FTIR) and hydrophilicity measurement. The mechanical assays showed that Young modulus values (E) can be related to amount of PHEMA chains present in the matrix, besides its physical characteristics. In order to increase the hemocompatibility of the PDMS modified surface, it was performed the chemical immobilization of human serum albumin, for the surface passivation and prevention of thrombi formation. Copolymers with grafting yield of 12 to 83% immobilized 0.35mg of albumin per mg of copolymer. The hemocompatibility was evaluated by *in vitro* tests of platelet adhesion, coagulation kinetics and hemolytic activity. The PHEMA grafting onto the polymers contributed for the improvement of their thromboresistence, being more significant for the PET films.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	viii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES GERAIS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1 – Biomateriais	06
2.2 – Polímeros como biomateriais	07
2.3- Hidrogéis	09
2.4 – Preparação de biomateriais	11
2.4.1 – Enxertia iniciada por radiação ionizante: método da irradiação simultânea	12
2.5 – Biocompatibilidade	15
2.5.1 – Citotoxicidade	15
2.5.2 - Hemocompatibilidade – Coagulação sanguínea e interações entre sangue e materiais	16
2.5.2.1 – Mecanismo da coagulação sanguínea	18
2.5.2.2 – Testes de hemocompatibilidade	20
2.6 – Caracterização de biomateriais	22
2.6.1 – Hidrofilicidade	23
2.6.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
2.6.3 – Espectroscopia no Infravermelho	24
2.6.4 – Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)	24
2.6.5 – Ensaio de Tração	25

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 – Materiais	28
3.1.1 – PDMS	28
3.1.2 – PET	28
3.1.3 – HEMA	28
3.2 – Metodologia	28
3.2.1 – Preparação das amostras	28
3.2.2 – Seleção do solvente	29
3.2.3 – Copolimerização – Método da irradiação simultânea	29
3.2.4 – Estudo das condições de enxertia via irradiação simultânea – Planejamentos fatoriais	32
3.2.5 – Homopolímero residual	32
3.2.6 – Hidrofilicidade	32
3.2.7 – Espectroscopia no Infravermelho	33
3.2.8 – Microscopia Óptica	33
3.2.9 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
3.2.10 – Análise Mecânica	34
3.2.11 – Imobilização da albumina humana	34
3.2.12 - Teste de citotoxicidade	35
3.2.13 – Teste de hemocompatibilidade pela adesão de plaquetas	36
3.2.14 - Teste de hemocompatibilidade pela atividade hemolítica	38
3.2.15 - Teste de hemocompatibilidade pela formação de trombos (cinética de coagulação)	39
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 – Obtenção dos copolímeros de enxerto PET-g-PHEMA e PDMS-g-PHEMA	41
4.1.1 – Estudo da Difusão do Monômero na Matriz – Escolha do Solvente	41
4.1.2 – Adição de Inibidor de Homopolimerização	44
4.1.3 – Planejamentos fatoriais	45
4.1.3.1 – Análise do Planejamento Fatorial 2 ³ : PDMS-g-PHEMA (1º estudo)	46
4.1.3.2 – Análise do Planejamento Fatorial 2 ³ : PDMS-g-PHEMA (2º estudo)	48
4.1.3.3 – Análise do Planejamento Fatorial 2 ³ : PET-g-PHEMA (1º estudo)	56
4.1.3.4 – Análise do Planejamento Fatorial 2 ³ : PET-g-PHEMA (2º estudo)	58

4.2 – Caracterização Físico-Química dos copolímeros PET-g-PHEMA e PDMS-g-PHEMA	60
4.2.1 – Espectroscopia no Infravermelho	60
4.2.2 – Hidrofilicidade dos Copolímeros	65
4.2.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
4.2.4 – Microscopia Óptica	67
4.2.5 – Propriedades Mecânicas	67
4.3 – Avaliação da Biocompatibilidade	69
4.3.1 – Testes de Hemocompatibilidade	70
4.3.1.1 – Imobilização da Albumina Humana (HA)	70
4.3.1.2 – Ação Hemolítica em Sangue Total	73
4.3.1.3 – Adesão Plaquetária	74
4.3.1.4 – Cinética de Coagulação	79
4.3.2 – Teste de Citotoxicidade	82
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	85
CAPÍTULO 6 – APÊNDICE	89
6.1 - Cálculos utilizados no estudo do planejamento fatorial	90
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

θ	Ângulo de contato
δ_E	Erro padrão do efeito
ΔG_m	Energia livre da mistura
ΔH_m	Entalpia da mistura
δ_i	Parâmetro de solubilidade (i = 1: solvente; i = 2: polímero)
ΔS_m	Entropia da mistura
ACD	Anticoagulante (solução aquosa de Ácido cítrico, Citrato trissódico e Dextrose)
CHO	Células de ovário de Hamster chinês
CON	Concentração da solução monomérica
D	Dose de radiação
DMA	Análise dinâmico-mecânica
E	Módulo de Young (módulo de elasticidade) (MPa)
E	Constante de atração molar
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
FTIR-ATR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e acessório de reflectância total atenuada

G_R	Rendimento radiolítico
HA	Albumina humana
HDPE	Polietileno de alta densidade
$IC_{(50\%)}$	Índice de citotoxicidade
MEM-SFB	Meio mínimo de Eagle – Soro fetal bovino
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MQ_{ep}	Média quadrática devido ao erro puro
MQ_{faj}	Média quadrática devido à falta de ajuste do modelo
MQ_R	Média quadrática da regressão
MQ_r	Média quadrática dos resíduos
PBS	Tampão fosfato-salina
PDMS	Polidimetilsiloxano
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PHEMA	Poli(metacrilato de 2-hidroxietila)
SQ_{ep}	Soma quadrática devido ao erro puro
SQ_R	Soma quadrática da regressão
SQ_r	Soma quadrática dos resíduos
SQ_T	Soma quadrática da soma total
TD	Taxa de dose de radiação
$V(b)$	Variância do parâmetro b

CAPÍTULO 1



Pierre Renoir

INTRODUÇÃO

Graças ao esforço conjunto de pesquisadores de diferentes áreas (químicos e bioquímicos, engenheiros, físicos, biólogos, médicos, entre outros) a ciência dos biomateriais vem contribuindo significativamente para o avanço da medicina moderna, proporcionando não só melhores condições de vida mas também o aumento da sobrevivência de pacientes. Nos últimos anos esta área vem apresentando um progresso contínuo no que diz respeito a obtenção de novos biomateriais, fruto de estudos para aquisição de conhecimentos sobre interações entre biomateriais e diferentes tecidos biológicos, sistemas liberadores de drogas, próteses, enxertos ósseos e cardiovasculares, além de dispositivos ortopédicos e cardiovasculares.

Os materiais utilizados na confecção de biomateriais variam de acordo com a aplicação, sendo desde polímeros até materiais cerâmicos e metálicos. Dentre estes materiais, os polímeros têm merecido grande destaque pois além de serem disponíveis com variadas composições e propriedades físico-químicas, são de custo relativamente baixo e passíveis de modificação química e física, permitindo assim a obtenção de dispositivos com diferentes e complexas formas geométricas.

Hoje, um dos maiores desafios da ciência dos biomateriais é a obtenção de biomateriais poliméricos hemocompatíveis. Quando o biomaterial entra em contato com o sangue, reações bioquímicas que induzem mudanças nas funções fisiológicas do sangue são iniciadas acionando o sistema de coagulação sanguínea, com subsequente formação de trombos na superfície do biomaterial. Este é um fenômeno extremamente complexo, pois até hoje os pesquisadores envolvidos neste estudo não concluíram exatamente quais os parâmetros físico-químicos que regem as interações entre a superfície do biomaterial e o sangue.

Nesta linha de pesquisa, alguns cientistas vem obtendo sucesso no emprego de hidrogéis poliméricos sintéticos [RATNER e col. 1975; RUCINSKA e col., 1984; OTSUHATA, 1985; KHORASANI, 1999]. Os hidrogéis são polímeros altamente hidrofílicos que possuem uma capacidade de absorver elevada quantidade de água sem no

entanto se dissolve neste solvente. Outra importante característica dos hidrogéis é a sua excelente biocompatibilidade.

O uso destes hidrogéis é limitado devido a sua baixa resistência mecânica. Os cientistas contornaram tal problema adotando a enxertia destes hidrogéis em matrizes poliméricas com propriedades mecânicas mais adequadas. Os métodos utilizados para a obtenção destes copolímeros de enxerto vão desde o uso de iniciadores químicos até o emprego de radiação ionizante. Uma das vantagens de se preparar biomateriais poliméricos via radiação ionizante sobre outros métodos convencionais é a sua habilidade em modificar macromoléculas em condições mais amenas, sem a necessidade de adição de qualquer tipo de aditivo, o que, sob o ponto de vista da ciência dos biomateriais é muito importante, pois permite a obtenção de materiais com maior pureza. Outras vantagens do método é a potencialidade de obtenção do biomaterial com simultânea esterilização, além do fato de não ter seu emprego limitado pela geometria da superfície a ser modificada [CHAPIRO, 1995].

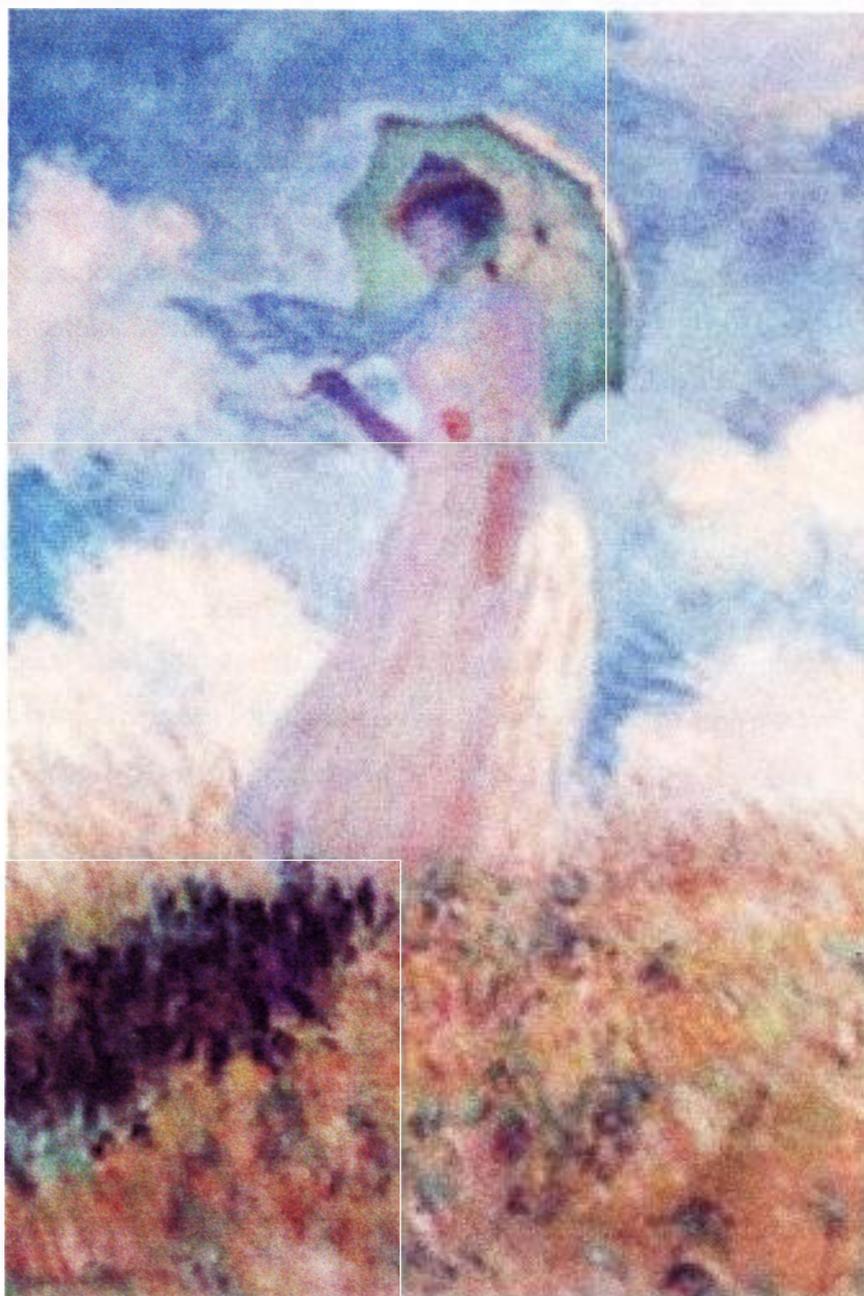
As condições de enxertia consideradas neste trabalho foram *dose e taxa de dose de radiação e concentração do monômero*. Estes parâmetros foram monitorados por meio de planejamento fatorial 2^3 . Esta técnica é muito empregada em situações onde há a necessidade de se observar a influência dos fatores envolvidos na resposta final de um sistema. Além da possibilidade do estudo simultâneo da influência dos fatores (variáveis) envolvidos no sistema, a técnica oferece também a vantagem da não necessidade da realização de muitos ensaios experimentais. Os planejamentos fatoriais vêm sendo empregados em muitas aplicações diferentes na área polimérica [ENGBERG e col., 1990; BAXLEY e col., 1991; DURO e col., 1993; PEAN e col., 1998].

Os vários trabalhos publicados vêm mostrando que mais do que a característica da hidrofilicidade, a superfície do copolímero de enxerto que apresenta uma estrutura formada por microdomínios hidrofílicos e hidrofóbicos, além da formação de uma superfície difusa, evidencia um caráter não trombogênico [IKADA e col., 1981; OTSUHATA, 1985; RATNER, 1986; WERNER e col., 1999]. Assim sendo, vários copolímeros de enxerto obtidos a partir de uma matriz hidrofóbica enxertada com um hidrogel hidrofílico vem sendo avaliados quanto ao caráter não trombogênico de sua superfície. Uma das

conclusões obtidas, é que nem sempre a combinação entre um hidrogel com excelente hemocompatibilidade e uma determinada matriz polimérica gera uma superfície hemocompatível. Outra forma encontrada para conferir um caráter não trombogênico a um polímero, é por meio da imobilização de uma proteína sérica sobre as superfícies dos copolímeros de enxerto [RATNER e col., 1975; KAMATH e PARK, 1994]. Esta imobilização ocorre quimicamente por meio dos grupos funcionais do hidrogel presentes na superfície do copolímero.

O objetivo deste trabalho foi, portanto, melhorar a característica da hemocompatibilidade de duas matrizes poliméricas, polidimetilsiloxana (PDMS) e poli(tereftalato de etileno) (PET), ambas já empregadas na confecção de artefatos médicos, a partir da modificação da superfície destes polímeros pela técnica da enxertia induzida por radiação gama do monômero metacrilato de 2-hidroxieta (HEMA), que forma um hidrogel hidrofílico, o poli(metacrilato de 2-hidroxieta) (PHEMA).

CAPÍTULO 2



Claude Monet

*Considerações Gerais e
Revisão Bibliográfica*

Neste capítulo são apresentadas as definições fundamentais utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, bem como o atual estado da arte no preparo de biomateriais poliméricos hemocompatíveis. São apresentados conceitos relativos aos hidrogéis em geral e principalmente ao hidrogel de poli(metacrilato de 2-hidroxietila) e seus copolímeros derivados. São citados também aspectos gerais pertinentes às matrizes de polidimetilsiloxana (PDMS) e poli (tereftalato de etileno) (PET). Ao final, são apresentados aspectos relacionados à avaliação da biocompatibilidade de materiais para a aplicação em questão, assim como os métodos utilizados na caracterização físico-química dos materiais.

2.1 - BIOMATERIAIS

A ciência dos biomateriais, mais do que um campo que congrega diferentes pesquisadores com diferentes formações acadêmicas, é a ciência responsável pela maioria das inovações tecnológicas que hoje conhecemos nas áreas biomédicas e na biotecnologia.

O termo biomaterial reúne um grande número de diferentes produtos, os quais todos por definição tem como objetivo o uso em contato com organismos vivos. Em 1987 foi realizada uma reunião com vários pesquisadores da área visando a definição do termo biomaterial. Por ocasião da *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, realizada na Inglaterra em março de 1986, foi definido que :

Um biomaterial é todo material não vivo usado em um artefato médico, visando a interação com sistemas biológicos.

Outro conceito adotado como consenso na referida reunião foi para o termo biocompatibilidade:

Biocompatibilidade é a capacidade de um material em induzir no hospedeiro uma resposta adequada a uma aplicação específica.

Tal como ilustra a tabela 1, muitos são os tipos de materiais utilizados na confecção de artefatos médicos. A escolha do tipo do material está intimamente ligada ao tipo de aplicação: uma prótese óssea exige um material com boa estabilidade e resistência mecânica, enquanto que uma lente de contato exige um material maleável e hidrofílico.

Tabela 1. Exemplos de aplicações médicas de materiais sintéticos e materiais naturais modificados.

Aplicação	Tipos de materiais	Referência Bibliográfica
Sistema esquelético		
Placa óssea para fixação da fratura	Aço inoxidável, liga Co-Cr	ELLERBE e col. 1995
Cimento ósseo	Poli(metacrilato de metila)	KHANG e col. 1996
Reparo de defeitos ósseos	Hidroxiapatita	ORR e col. 1992
Implante dentário para fixação de dentes	Titânio, alumina, fosfato de cálcio	NAGY e col. 1999
Sistema cardiovascular		
Próteses de vasos sanguíneos	Dacron [®] , Teflon [®] , poliuretana	ZDRAHALA, 1996 ^a
Válvula coronária	Tecido reprocessado, aço inoxidável, carbono	1996 ^b LOPEZLOPEZ, 1991
Cateter	Borracha de sílica, Teflon [®] , poliuretana	
Órgãos		
Coração artificial	Poliuretana	IMACHI, 1997
Reparo de pele	Compósito sílica-colágeno	IKADA, 1991
Rim artificial (hemodializador)	Celulose, poliácridonitrila	SAKAI, 1997
Sensores		
Lentes intraoculares	Poli (metacrilato de metila), borracha de sílica, hidrogel	KIRKHAM e col. 1991
Lentes de contato	Sílica-acrilato, hidrogel	LEE e col. 1996

2.2 - POLÍMEROS COMO BIOMATERIAIS

Enquanto cerâmicas e metais possuem tipicamente as propriedades mecânicas semelhantes aos tecidos mineralizados (tais como ossos e dentes), somente polímeros e seus compósitos possuem propriedades mecânicas correspondentes a dos tecidos moles [RATNER, 1996].

Polímeros são macromoléculas que consistem de um número de pequenas unidades de repetição (*meros*). Suas propriedades físico-químicas permitem aplicações biomédicas variadas, desde segmentos gastrointestinais (PVC, nylon) até próteses faciais (acrílico, PVC e poliuretana), suturas biodegradáveis (poliuretanas) e vasos sanguíneos (PVC, poliéster), tal como ilustra a tabela 1.

Neste trabalho foram estudadas duas matrizes poliméricas já amplamente utilizadas em aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade: polidimetilsiloxana (PDMS) e poli(tereftalato de etileno) (PET). Como ambas as matrizes apresentam problemas quando usadas como biomateriais a longo termo, nosso objetivo foi, por meio da modificação com metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) via radiação ionizante, melhorar suas propriedades hemocompatíveis e torná-las propícias para o uso a longo termo.

Os polímeros de silicona, com destaque para o PDMS, têm sido muito utilizados em implantes biomédicos devido a sua excepcional bioestabilidade, capacidade de ser sintetizado numa forma extremamente pura, além de exibir alta permeabilidade ao oxigênio. Dentre suas aplicações podem-se citar: lentes de contato, cateteres, válvulas para o coração, implantes oftalmológicos, etc. Um problema apresentado pelos polímeros de polidimetilsiloxona é a sua forte interação com lipídeos, o que pode causar perda de propriedades mecânicas e descoloração [RATNER, 1989]. A melhoria da hemocompatibilidade em tubos de silicona modificados com N'-vinil pirrolidona (testes *in vivo*) foi investigada por CHAPIRO e col. (1981). CÍFKOVA e col. (1990) observaram que o copolímero de silicona e PHEMA apresentaram boa biocompatibilidade em implantes com duração de seis meses. HSIUE e col. (1992 e 1996) e LEE e col. (1996) estudaram a enxertia do PHEMA em borracha de silicona por meio da enxertia induzida por plasma para a obtenção de córneas artificiais e concluíram que esta modificação acarretou no aumento do crescimento de células epiteliais.

O PET é um dos polímeros que apresentam maior resistência química e mecânica. Devido às suas propriedades específicas, fibras de PET têm sido empregadas em muitas aplicações práticas na manufatura de vários artefatos para implantes. A maior razão para o sucesso de fibras de PET no meio cirúrgico é o fato de que estes implantes causam uma reação muito mais suave com o tecido em organismos vivos, quando comparado com

outros materiais conhecidos [BUCHENŠKA, 1997]. A necessidade de se obter materiais compatíveis com o sangue tem induzido um aumento no interesse de se obter copolímeros de PET a partir da enxertia de monômeros hidrofílicos em sua superfície. Apesar de bons resultados terem sido obtidos na enxertia de fibras de PET com ácido acrílico [DUDLEY e col., 1976], este copolímero ainda não tem seu uso em grande escala. A modificação de matrizes de PET pela introdução de cadeias hidrofílicas, tem trazido bons resultados na aplicação dos copolímeros como biomateriais poliméricos. KULIK e col.(1993) descrevem em seu trabalho a imobilização de tripsina em filmes de PET modificados com poli(ácido acrílico) (PAAc). A imobilização ocorre por meio da ligação covalente formada entre o grupo amino da enzima e o grupo carboxila do PAAc via tratamento com uma carbodiimida solúvel em água. SUGIYAMA e col. (1998) modificaram filmes de PET com poli(metacrilato de 2-glucosiloxietila) (PGEMA) via polimerização por descarga de plasma. Os filmes modificados mostraram menor adsorção de proteínas séricas do que os filmes não modificados. ZHU e col. (1999) modificaram fibras de PET pela introdução de cadeias de poli(metacrilato de N,N-dimetilaminoetilamina) (PDAM) por meio de radiação ultravioleta. Estas fibras modificadas foram posteriormente utilizadas como suporte para a imobilização de moléculas de DNA. SHTANKO e col. (1999) prepararam membranas termossensíveis de PET modificadas pela introdução de cadeias de poli(metil vinil piridina) (PMVP) via radiação gama proveniente de uma fonte de ^{60}Co .

2.3 - HIDROGÉIS

Hidrogéis são polímeros que apresentam uma estrutura constituída por uma rede tridimensional, formada por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes denominadas reticulações. A principal característica destes hidrogéis é a sua capacidade de absorver grandes quantidades de água (ultrapassando em até 90% em massa do polímero) sem no entanto se dissolver. Esta hidrofílicidade é decorrente da presença de grupos solubilizantes em água, tais como $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}$ e $-\text{SO}_3\text{H}$. O hidrogel é inerte aos processos biológicos, mostra resistência a degradação, é permeável a metabólitos, não é absorvido pelo corpo e pode ser preparado numa grande variedade de formas [KUDELA apud MALMONGE, 1997].

Os géis poliméricos são produzidos pela simples reação de um ou mais monômeros ou por associação de ligações tais como ligações hidrogênio e fortes interações de van der Waals entre as cadeias. A presença de água entre as cadeias poliméricas conduzem à diminuição das forças de interação intermoleculares, exercendo assim um efeito plastificante que altera o comportamento mecânico do polímero. Quando totalmente secos, os hidrogéis geralmente apresentam-se rígidos e frágeis, mas a medida que a quantidade de água no interior da estrutura polimérica se eleva, o polímero tende a um comportamento elastomérico [MALMONGE, 1997].

Hoje em dia uma variedade de hidrogéis são utilizados em diferentes aplicações biomédicas. Em 1989, ROSIAK e col. desenvolveram curativos para tratamento de queimaduras constituídos por poli(vinil pirrolidona) (PVP) (US Pat. 4,871,490). DYBEK e col. (1992) desenvolveram um material utilizado em aplicações odontológicas composto de poli (álcool vinílico) (PVA) e gelatina via radiação ionizante. GIUSTI e col. (1993) também desenvolveram um material híbrido composto por PVA e colágeno usado como um copolímero injetável para reparar defeitos em cirurgias plásticas. Lentes intraoculares, usualmente usadas em tratamento de catarata, geralmente são compostas por poli (metacrilato de metila) (PMMA), como KIRKHAM e col. (1991) descrevem em seu trabalho. Este material também é utilizado como cimento ósseo em cirurgias ortopédicas, tal como ilustra o trabalho de MANN e BHASHYAM (1999).

Poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA), um dos hidrogéis mais utilizados, foi introduzido como um material para aplicação biológica por WITCHERLE e LIM (1960). A estrutura do PHEMA possui um conteúdo de água similar ao encontrado em tecidos vivos.

Desde sua primeira aplicação, o PHEMA tem sido utilizado em diferentes aplicações biomédicas: oftalmologia [REFOJO, 1971], cirurgia plástica [KLIMENT e col., 1968], sistemas liberadores de fármacos [VERONESE e col., 1991], entre outras. Outra aplicação do PHEMA é na obtenção de materiais com propriedades hemocompatíveis, na qual entre outros, podem-se citar os trabalhos de GUPTA e col. (1990) e ANELLI e col. (1995).

2.4 - PREPARAÇÃO DE BIOMATERIAIS

A falta de resistência mecânica dos hidrogéis poliméricos acaba por limitar seu uso em diferentes aplicações biomédicas. Porém, é possível a obtenção de um novo material, que apresente tanto a resistência mecânica apropriada quanto caráter hidrofílico. Este material que pode ser obtido a partir da enxertia do hidrogel em uma matriz polimérica com maior resistência mecânica, são os chamados copolímeros de enxerto [ARRANZ e CHAVES, 1989].

A produção de biomateriais poliméricos enfrenta um grande número de desafios com respeito à estrutura física e química do produto final, o qual deve satisfazer alguns critérios, tais como, propriedades ópticas apropriadas à sua aplicação, resistência ao ambiente biológico, taxa de degradação do material etc. Sabe-se que nenhum método usado até hoje é versátil o suficiente para produzir um material para tantos diferentes usos. Dentre os métodos conhecidos, o uso da radiação ionizante para obtenção de biomateriais poliméricos vem merecendo grande destaque nos últimos anos. Os trabalhos de CARENZA (1992), CHAPIRO (1995), ROSIAK e col. (1995), KABANOV (1998) e SHTANKO e col. (1999) traçam um panorama geral a respeito do uso da radiação ionizante na obtenção de biomateriais poliméricos.

A principal vantagem de se preparar biomateriais poliméricos via radiação ionizante sobre outros métodos convencionais é a sua habilidade em modificar macromoléculas em condições mais amenas, dispensando o uso de aquecimento e/ou controle de temperatura e adição de catalisadores químicos. Sob o ponto de vista da ciência dos biomateriais esta é uma propriedade muito interessante, pois permite a obtenção de materiais com maior pureza. O método também apresenta como vantagens o fato de possibilitar a modificação de materiais pré-existentes com formas geométricas já definidas, além de possuir um potencial de esterilização simultâneo.

Dois diferentes métodos de enxertia via irradiação são usados na produção de biomateriais poliméricos [CHAPIRO, 1962]:

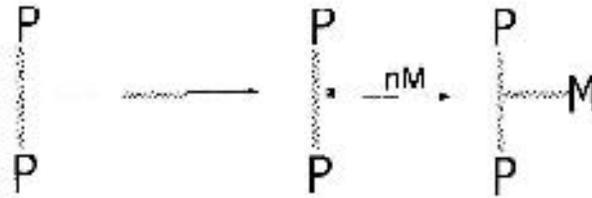
1. *Método da irradiação simultânea (ou método direto)* ⇒ o polímero é irradiado em presença do monômero ou de uma solução monomérica.
2. *Método da peroxidação induzida por radiação (ou método indireto)* ⇒ o polímero é irradiado na ausência do monômero e na presença de ar. Depois de criados os sítios ativos, somente então a matriz polimérica é colocada em contato com o monômero.

No segundo método mencionado deve-se tomar cuidados extremos para total eliminação de resíduos de peróxidos, os quais podem apresentar efeitos deletérios (quebra da cadeia principal, por exemplo).

2.4.1 - Enxertia iniciada por radiação ionizante: método da irradiação simultânea

Uma variedade de procedimentos foram desenvolvidos para modificar as propriedades de uma matriz polimérica por meio de copolimerização usando iniciação via radiação ionizante. As técnicas de enxertia têm como base a habilidade da radiação ionizante formar um sítio ativo na cadeia polimérica. Tais sítios ativos são usualmente radicais livres e a grande parte de reações de enxertia por radiação ocorrem via mecanismo de radicais livres. [GARNETT, 1979]

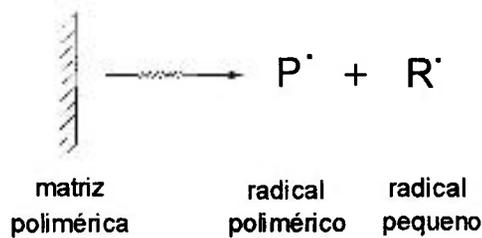
No presente trabalho, os copolímeros de PDMS-g-PHEMA e PET-g-PHEMA foram obtidos via enxertia por radiação gama pelo método simultâneo. Neste método, uma superfície polimérica é colocada em contato com o monômero M (que pode se apresentar sob a forma líquida, vapor ou ainda diluído em um dado solvente) e ambos são irradiados simultaneamente [STANNETT, 1990]. A irradiação leva à formação de sítios ativos na cadeia polimérica da superfície do substrato e/ou no monômero M, resultando assim na copolimerização por enxertia:



O mecanismo da copolimerização via radiação ionizante é dividido em três etapas [WILSON, 1979], a saber:

1ª etapa) Iniciação

A matriz polimérica quando exposta à radiação ionizante produz as espécies iniciadoras da reação:



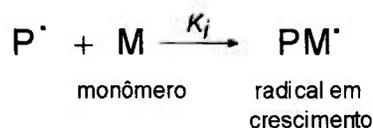
A velocidade de formação dos radicais P^\cdot e R^\cdot depende somente da intensidade da radiação (I), onde k é uma constante de velocidade.

$$R \propto I$$

$$R = k.I$$

Equação 1

O radical P^\cdot induz a reação de propagação:

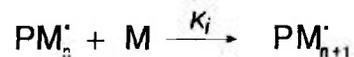


A velocidade de iniciação da reação de enxertia é:

$$R_i = k_i.[P].[M] \quad \text{Equação 2}$$

onde k_i é uma constante para a iniciação da reação de enxertia.

2ª etapa) Propagação



Neste caso, a velocidade de propagação (R_p) depende somente da concentração de radicais livres e do monômero. Logo,

$$R_p = k_p.[PM_n^\bullet].[M] \quad \text{Equação 3}$$

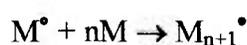
3ª etapa) Terminação

Se dois macrorradicais se combinam então a reação é terminada e o copolímero de enxerto é formado. A velocidade de terminação (R_t) depende somente do quadrado da concentração de radicais:

$$R_t = 2k_t.[PM_n^\bullet]^2 \quad \text{Equação 4}$$

Deste modo, a velocidade da reação de terminação aumenta mais rapidamente que a reação de propagação quando a concentração de radicais é aumentada.

Uma vez que o monômero M está sendo irradiado simultaneamente durante o processo de enxertia, inevitavelmente se formam cadeias do homopolímero (pM) resultantes da reação envolvendo radicais M^\bullet . Tais homopolímeros geralmente necessitam ser removidos por exaustiva extração com solvente adequado, separando-se assim o copolímero desejado:



Além da dose de irradiação, taxa de dose e concentração do monômero, o solvente utilizado também é fator determinante no grau de enxertia. O processo da enxertia é afetado pela difusão das moléculas do monômero e do solvente dentro da matriz polimérica, e para obter-se um alto nível de enxertia, o monômero deve atingir o maior número possível dos radicais gerados na matriz polimérica [IMRE & ODIAN, 1979].

2.5 - BIOCAMPATIBILIDADE

A biocompatibilidade é um dos principais requisitos dos biomateriais. O termo biocompatibilidade envolve dois fenômenos associados na mesma situação: o implante do material não pode ser afetado pelo meio fisiológico (corrosão, degradação) e os tecidos locais e remotos não podem sofrer danos pela presença do material (necroses, reações celulares, infecções pela ação de bactérias) [RATNER, 1996].

Os ensaios *in vitro* são normalmente efetuados como testes iniciais na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade de um material. A avaliação *in vitro* possibilita a obtenção de um resultado rápido e barato de uma interação biológica, além de minimizar o uso de animais em pesquisa [RATNER, 1996].

Segundo a ISO 10.993 (partes 4 e 5), a utilização de qualquer material ou artefato com pretensão de uso em humanos requer um programa estruturado de avaliação. A seleção e interpretação apropriada dos testes de avaliação biológica requer um entendimento do raciocínio básico dos vários testes. Segundo a própria ISO, entre os testes *in vitro* de biocompatibilidade que devem ser realizados estão os de citotoxicidade e hemocompatibilidade.

2.5.1 - CITOTOXICIDADE

O teste de **citotoxicidade** possibilita a triagem de materiais na fase inicial de testes de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações biomédicas. O teste de citotoxicidade faz uso de técnicas *in vitro* para identificar efeitos adversos que os materiais ou dispositivos médicos possam acarretar às células, de maneira que os tornam

impróprios para uso como biomateriais. Os testes *in vitro* utilizam cultura celular, envolvendo técnicas que determinam a lise das células (ou morte celular), a inibição de crescimento celular e outros efeitos causados nas células pelos artefatos, materiais e/ou seus extratos. Portanto, para ser aprovado em um teste de citotoxicidade *in vitro*, um material não deve causar a morte das células nem afetar suas funções celulares.

Os testes para avaliação da citotoxicidade se dividem em duas categorias: teste por contato direto e teste por contato indireto. Atualmente têm sido realizados testes de citotoxicidade com extratos dos materiais (teste indireto) biocerâmicos, metálicos e biopolímeros, com avaliação quantitativa, calculando-se o Índice de Citotoxicidade ($IC_{(50\%)}$). Este índice indica a concentração do extrato do material em teste que suprime em 50% a formação de colônias nas placas de cultura.

2.5.2 - HEMOCOMPATIBILIDADE - COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA E INTERAÇÕES ENTRE SANGUE E MATERIAIS

Ao entrar em contato com o sangue, o material sintético provoca a aparição de fenômenos complexos que podem ocasionar a destruição de glóbulos vermelhos, desnaturação de proteínas e formação de coágulos sangüíneos. Dentre estes, a formação de trombos é o mais importante pois sua presença pode provocar um corte súbito na distribuição do sangue aos órgãos vitais [WILLIAMS, 1987].

As interações sangue-superfície do material polimérico são governadas por diversos fatores: textura da superfície, efeitos eletrostáticos, energia livre interfacial mínima, relação fases polar-apolar, entre outros [ARRANZ e CHAVES, 1989].

A fim de se compreender como estes fatores governam a trombogenicidade do material, é interessante antes examinar alguns aspectos do sangue e sua composição.

O sangue é uma *suspensão de células* (essencialmente eritrócitos, leucócitos e plaquetas) em uma solução aquosa denominada *plasma*, a qual contém diferentes proteínas, lipoproteínas e glicoproteínas. Com relação às proteínas do plasma, três famílias,

imunoglobulina, albumina e proteínas da coagulação, estão diretamente associadas ao processo de formação de trombos [BEUGELING, 1979].

Os eritrócitos ou células vermelhas são os mais numerosos. Eles têm uma vida média de 105 a 120 dias e se tornam mais frágeis conforme envelhecem. O principal efeito resultante da interação do material com o sangue é o envelhecimento precoce destas células. As células brancas encontram-se em menor número, e ao contrário das células vermelhas e plaquetas não estão confinadas no sangue, sendo liberadas somente no tecido onde elas desempenham certas funções específicas [WILLIAMS, 1987].

Dentre os elementos celulares, as plaquetas são as únicas que realmente desempenham papel importante no processo de coagulação. Quando não ativadas, estas células se apresentam em forma de disco e com diâmetro de aproximadamente 2 a 3 μm . Possuem uma complexa membrana celular a qual contém numerosos receptores para interações com proteínas chaves contidas no plasma. Estas células possuem em seu interior uma série de grânulos (mitocôndrias, grânulos densos, grânulos α , entre outros) e uma variedade de proteínas as quais controlam a habilidade de agregação e interação das plaquetas com outras estruturas [HANSON e RATNER, 1996]. A figura 1 ilustra uma plaqueta e seus principais componentes.

Quando ativadas, as plaquetas sofrem significantes alterações tanto funcional quanto bioquímica e estrutural. Esta ativação provocada pela adesão celular à superfície artificial leva à agregação de plaquetas e conseqüente formação de trombos sanguíneos.

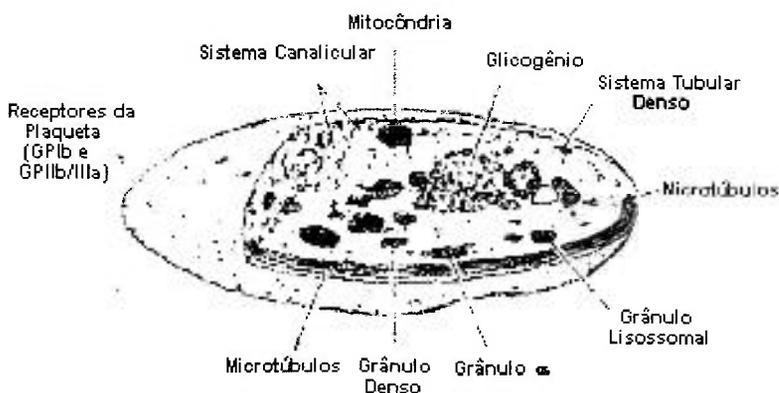


Figura 1. Estrutura de uma plaqueta

2.5.2.1 - Mecanismo da coagulação sangüínea

Em pessoas saudáveis, o sangue flui pelo do sistema vascular e não coagula, desde que não haja danificação dos vasos sangüíneos. Caso contrário, o sangue apresenta a capacidade de formar trombos, fazendo com que o sangramento seja interrompido. Essa coagulação ocorre de uma forma muito complexa.

O coágulo é derivado da formação de uma massa de plaquetas e fibrina, que é depositada de modo conveniente a impedir o fluxo sangüíneo. Dois eventos estão envolvidos neste processo, sendo que o primeiro envolve componentes celulares e o segundo as proteínas do plasma [WILLIAMS, 1987]:

1. a destruição da integridade do endotélio faz com que seja iniciada uma seqüência de eventos os quais permitem que plaquetas, antes não aderentes ao tecido endotelial, tornem-se aderentes à superfície danificada resultando na interação plaqueta-colágeno. Este contato com o colágeno faz com que a membrana da plaqueta sofra uma série de modificações. A plaqueta agora ativada libera um número de diferentes substâncias, principalmente difosfato de adenosina (ADP), gerando agregação de plaquetas e finalmente a formação de uma massa de plaquetas;
2. o segundo evento que ocorre é a chamada *cascata de coagulação*, uma seqüência de reações bioquímicas que envolvem as proteínas do sangue e levam à formação do trombo. As proteínas da coagulação sangüínea são uma série de enzimas que agem seqüencialmente, sendo o evento final a polimerização do monômero fibrinogêneo (solúvel) em fibrina (insolúvel), uma macromolécula biológica de estrutura entrecruzada.

Como esquematizado na figura 2, o processo de coagulação sangüínea pode ocorrer tanto via mecanismos extrínseco ou intrínseco. O mecanismo extrínseco é acionado por fatores derivados de tecidos, enquanto que o mecanismo intrínseco é acionado pelo contato da superfície do material estranho com o meio biológico. Os dois mecanismos convergem para uma via comum a qual conduz à conversão do fator X a Xa e depois disso seguem

com conversão da protrombina a trombina, a qual catalisa a polimerização do fibrinogênio produzindo assim a fibrina [WILLIAMS, 1987].

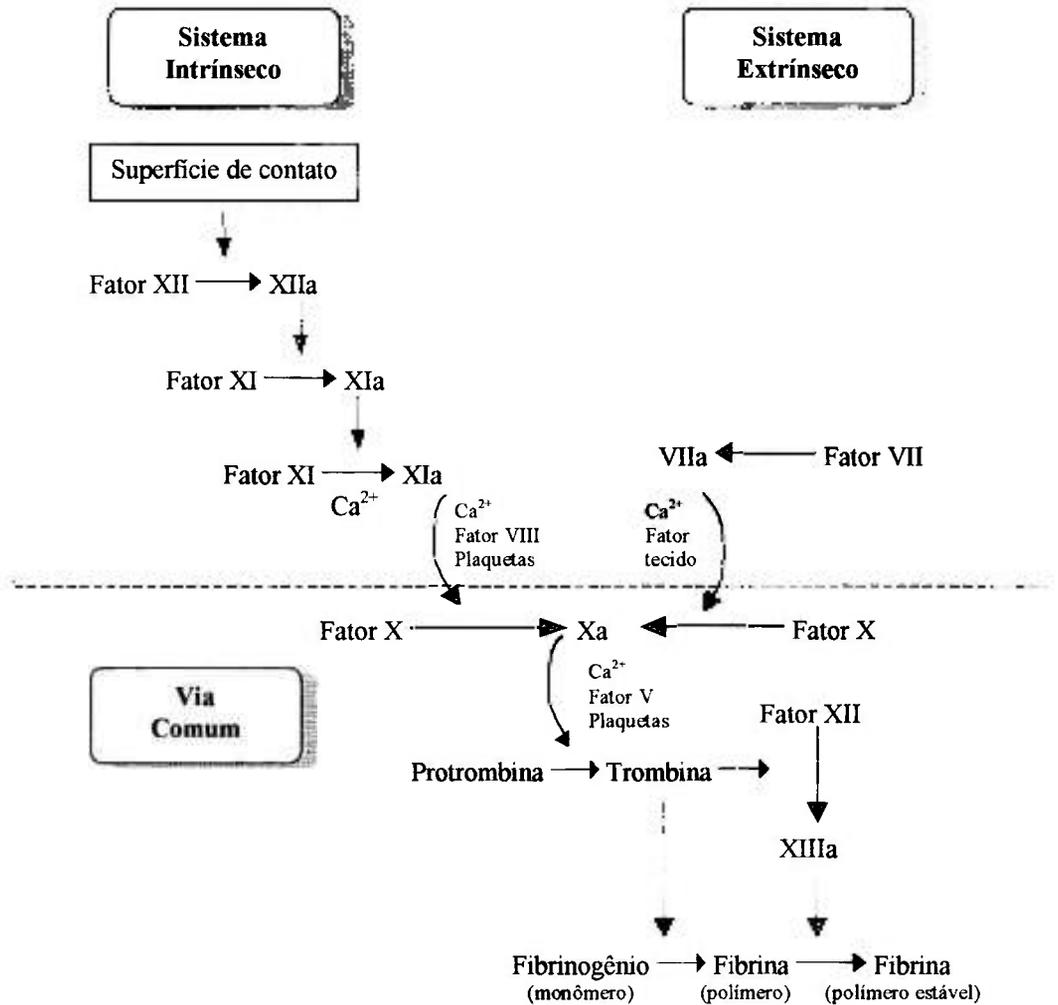


Figura 2. Mecanismo de coagulação sanguínea

Dois importantes aspectos da interação de materiais estranhos com sangue são adesão plaquetária e coagulação sanguínea. Estes processos são dependentes das propriedades superficiais do material. Quando o material é exposto ao sangue, o primeiro evento que ocorre é a adsorção de proteínas do sangue na superfície do material. Como consequência, a superfície do material é alterada e eventos subsequentes serão determinados por tal modificação. Neste caso, a formação de trombos superficiais segue o

mecanismo intrínseco (figura 2). Contudo, o processo de coagulação intrínseca pode ser iniciado tanto pela superfície com plaquetas agregadas ou por ativação do Fator XII pelo material estranho. Portanto, um material candidato a tromborresistente deve reduzir tanto a adesão plaquetária quanto a ativação por contato do Fator XII. A figura 3 ilustra um resumo esquemático dos fenômenos que ocorrem durante o contato do sangue com a superfície do material estranho [BEUGELING e col., 1979].

Por outro lado, o organismo possui sistemas biológicos que controlam a formação de trombos. Dessa forma, as células do endotélio possuem e/ou são capazes de produzir inibidores apropriados que dificultam a formação de trombos, ao passo que o sistema fibrinolítico do plasma gera determinadas enzimas que catalisam uma série de reações que conduzem à destruição da fibrina.

2.5.2.2 - Testes de hemocompatibilidade

Os testes de hemocompatibilidade avaliam efeitos no sangue ou componentes do sangue pelo contato de artefatos ou materiais com o sangue. Testes específicos de hemocompatibilidade podem também ser planejados para simular a geometria, condições de contato e fluxo dinâmico do artefato durante aplicações clínicas. Alguns testes *in vitro* recomendados pela ISO 10.993-4 foram utilizados neste trabalho para avaliação da hemocompatibilidade das superfícies obtidas, a saber:

- *Contagem das plaquetas aderidas*: a adesão celular sangüínea é uma medida da hemocompatibilidade de um material: quanto menor o número de células aderidas na superfície, maior a hemocompatibilidade do material testado. Um dos métodos recomendados é a contagem direta de plaquetas aderidas à superfície. Após contato com sangue ou plasma rico em plaquetas, a superfície do material é lavada e as plaquetas aderidas são fixadas; em seguida a superfície é submetida à análise de microscopia eletrônica de varredura e o número de plaquetas aderidas é determinado.

MATERIAL + SANGUE

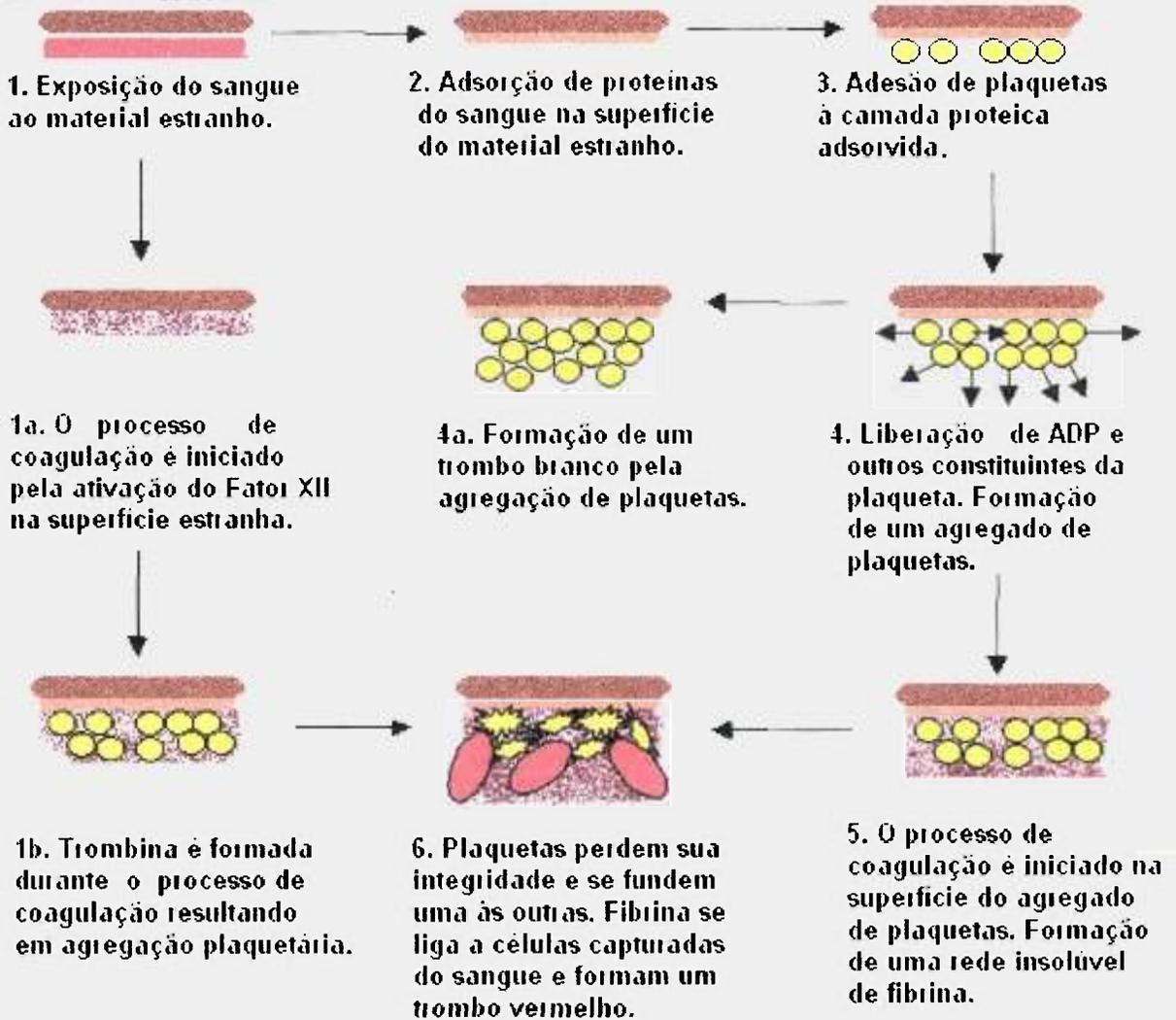


Figura 3. Esquema do mecanismo de coagulação ativado pela interação sangue-superfície do material estranho. (Adaptado de BEUGELING, 1979)

- *Hemólise*: Os testes de hemólise determinam o grau de lise das células vermelhas do sangue e a liberação da hemoglobina causada pelos artefatos, materiais e/ou seus extratos *in vitro*. É um importante teste de triagem onde é refletida a fragilidade da membrana da célula vermelha sangüínea em contato com o material [NAKAMURA, 1993].

- *Formação de trombos (coágulos)*: A cinética de formação de trombos sobre uma superfície polimérica avalia o tempo em que um material promove o processo de coagulação sangüínea, resultando na formação de trombos (compostos de fibrina e plaquetas aderidas). Tempos curtos ou excessivamente prolongados de coagulação, sugerem que o material ou está ativando ou desativando o sistema de coagulação, o que serve como evidência da incompatibilidade sangüínea.

2.6 - CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS

As propriedades físico-químicas inerentes a biomateriais utilizados em implantes influenciam ou mesmo controlam a dinâmica da interface formada entre o material e o tecido vivo durante o tempo em que o material permanece em contato com o ambiente biológico. Estas propriedades deveriam ser avaliadas antes de qualquer aplicação biomédica e deveria ser avaliada também a possibilidade de alterações nesta superfície com o decorrer do tempo do implante [RATNER, 1996].

Uma superfície é descrita por muitos parâmetros. Por mais parâmetros que sejam avaliados, sempre será obtida apenas uma pequena parcela sobre as informações que caracterizam a superfície em questão. Infelizmente, ainda não se tem conhecimento sobre quais os parâmetros de maior importância que serviriam de base para a compreensão das respostas biológicas frente à presença da superfície do biomaterial [RATNER, 1996]. Muitos pesquisadores se concentram no estudo da morfologia da superfície, capacidade de inchar em água, mobilidade das cadeias, composição química, cristalinidade, entre outras. Uma vez que se desconheça quais destes fatores é o de maior importância, cada um deles vem sendo avaliado de forma independente.

A seguir, uma pequena exposição é feita acerca das técnicas utilizadas para a medida de alguns dos parâmetros físico-químicos considerados neste trabalho.

2.6.1 - HIDROFILICIDADE

Muitos são os trabalhos que relatam a correlação entre a biocompatibilidade e a energia da superfície, a qual está diretamente ligada à hidrofiliicidade (capacidade de absorver água) do material [IKADA e col., 1981; OTSUHATA e col., 1985; KHORASANI e col., 1999].

A hidrofiliicidade do material pode ser avaliada pela medida do ângulo de contato (θ). Tal como ilustra a figura 4, sua medida pode ser realizada em qualquer laboratório de uma maneira fácil e barata, fornecendo assim informações prévias sobre possíveis interações que poderão ocorrer entre material e ambiente biológico.

A equação 5 descreve o balanço da força entre a tensão superficial líquido-vapor (γ_{lv}) de uma gota de um líquido qualquer e a tensão interfacial entre o sólido e a gota (γ_{sl}), manifestada através do valor de θ , é usada para caracterizar a energia da superfície (γ_{sv}).

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cdot \cos(\theta) \quad \text{Equação 5}$$

Sendo assim, quanto menor o valor de θ , maior o valor de γ_{sv} e maior será a hidrofiliicidade do material, sugerindo assim maior biocompatibilidade.

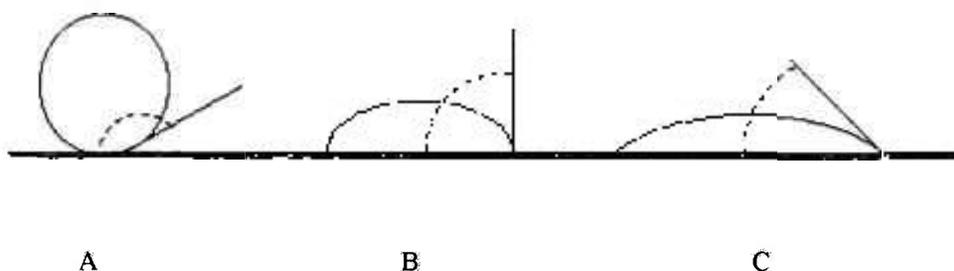


Figura 4. Medida do ângulo de contato de 3 superfícies: A) hidrofóbica; B) hidrofílica; C) muito hidrofílica.

2.6.2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

No contato direto da superfície com o sangue, a formação ou não de trombos, pode ser verificada pela adesão plaquetária e pelo estudo cinético da coagulação. Este fenômeno pode ser seguido gravimetricamente ou pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), pela qual se observa a adsorção, ativação e agregação de plaquetas. Muitos trabalhos citam o uso desta técnica no estudo da hemocompatibilidade de materiais por meio da observação das plaquetas aderidas à superfície [OTSUHATA e col., 1985; KHORASANI e col., 1999; PARK e col., 1999].

2.6.3 - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) permite a identificação das estruturas que foram inseridas na superfície e no interior da matriz polimérica pela copolimerização, confirmando assim a sua modificação. Isto se dá mediante a comparação dos espectros da matriz polimérica antes e depois da enxertia. Com o auxílio do acessório de Transmissão de Reflectância Atenuada (ATR), pode-se identificar os grupos funcionais presentes somente na superfície polimérica, sem no entanto avaliar as mudanças que ocorreram no interior da matriz. Trabalhos como os de HSIUE e col. (1992 e 1994) e LEE e col. (1996) demonstraram o uso desta técnica na caracterização de copolímeros de enxerto.

2.6.4 - ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA (DMA)

Propriedades dinâmico-mecânicas são determinadas por meio de vários instrumentos medindo a resposta (deformação) de polímeros a aplicação de forças periódicas. O módulo dinâmico, módulo de carga e o amortecimento mecânico ou fricção interna expressam tais propriedades [MURAYAMA, 1990].

DMA é o termo mais freqüentemente aplicado à técnica na qual o módulo dinâmico de uma substância é medido por meio da ação de uma carga oscilatória. Esta medida é realizada tanto em função da temperatura e freqüência a qual a substância está sujeita,

quanto em função de um programa de controle de temperatura [FLYNN, 1990]. Por meio da deformação de um material durante a aplicação das tensões oscilatórias, obtém-se dois módulos:

□ **E'** - **módulo de armazenamento**: energia armazenada temporariamente e recuperada no final de cada ciclo que está relacionada com a elasticidade do material.

□ **E''** - **módulo de perda**: energia que é mecanicamente perdida e convertida na forma de calor.

Quanto maiores os valores de E' e E'', menor a deformação que o material sofre quando submetido a uma tensão [MURAYAMA, 1990]. Um exemplo de aplicação desta técnica na caracterização de biomateriais está descrito no trabalho de PARK e col. (1999).

2.6.5 - ENSAIO DE TRAÇÃO

O estudo das propriedades mecânicas de filmes poliméricos pode ser realizado por meio de ensaios de tração, onde uma carga crescente é aplicada a uma das extremidades do corpo de prova, com a outra mantida fixa, até que o corpo de prova sofra rompimento, como ilustrado na figura 5.

A resistência à tração é determinada alongando-se um corpo de prova de dimensões uniformes. A tensão (σ) é a força aplicada (F) dividida pela área da seção transversal (A):

$$\sigma = F / A \quad \text{Equação 6}$$

A deformação (ϵ) é a variação da diferença de comprimento final-inicial (Δl) do corpo de prova dividido pelo comprimento inicial (equação 7):

$$\epsilon = \Delta l / l \quad \text{Equação 7}$$

O módulo de Young (ou módulo de elasticidade) (E) é a razão entre σ e ϵ :

$$E = \sigma / \epsilon$$

Equação 8

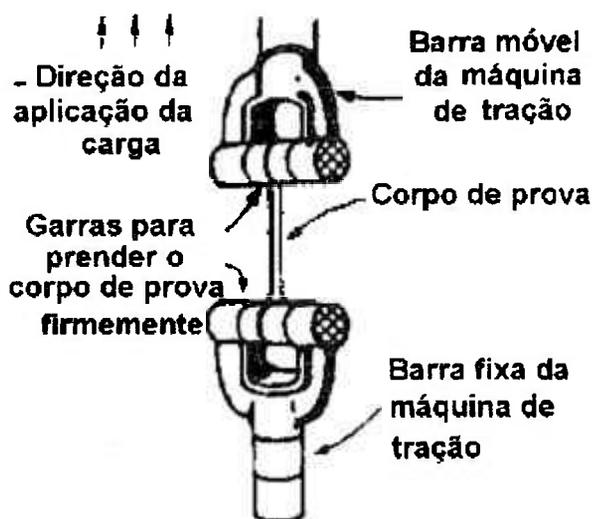
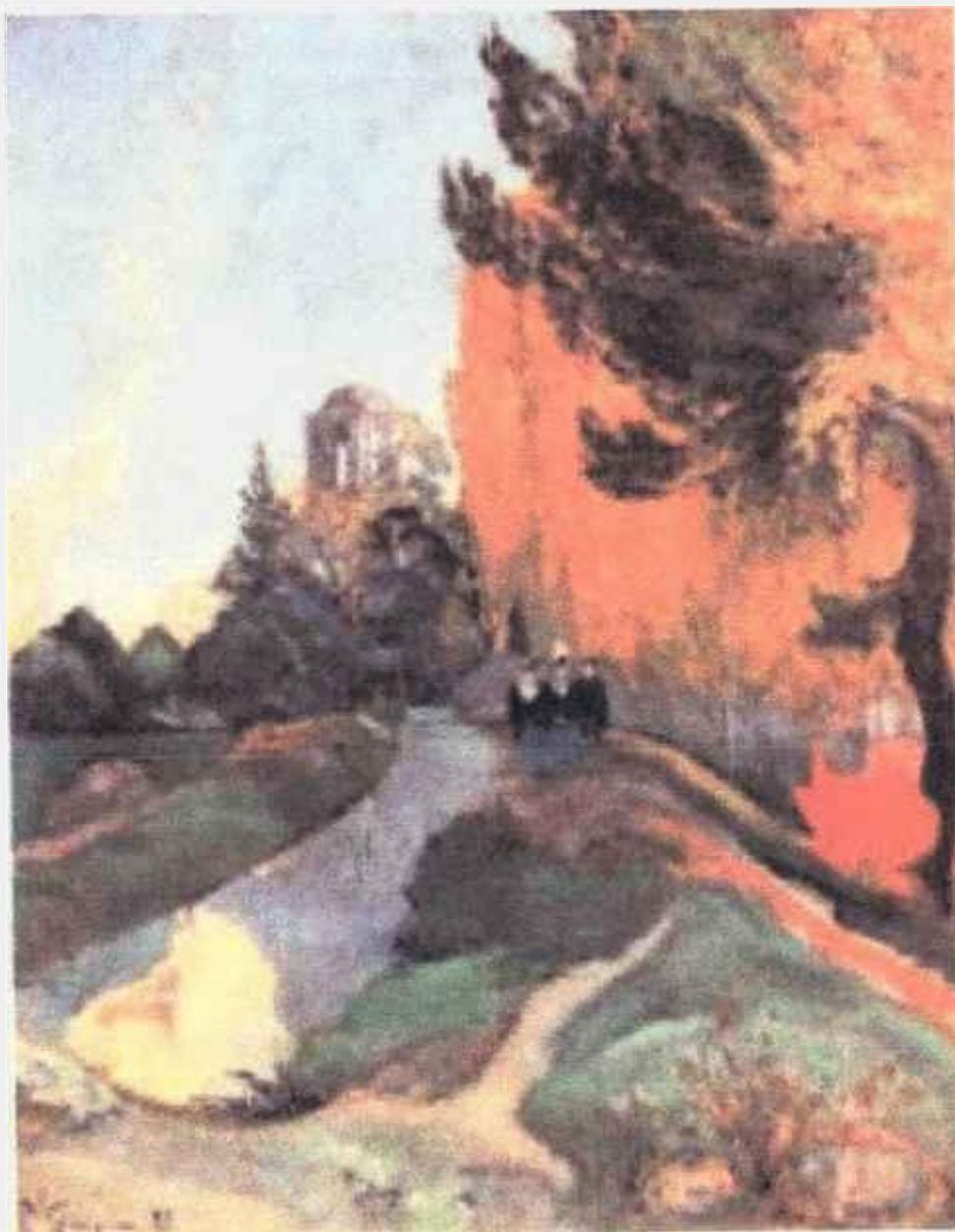


Figura 5. Ensaio de tração de filmes poliméricos

KODAMA (1997) descreve em seu trabalho o uso desta técnica na caracterização de filmes de PDMS irradiados em diferentes condições de radiação.

CAPÍTULO 3



Paul Gauguin

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - PDMS

Tubos de borracha de silicona (PDMS) de grau médico, com diâmetros interno e externo de 3 e 5mm, respectivamente, foram fornecidos por Perfitécnica Perfis Técnicos de Borracha Ltda. Os tubos foram cortados em amostras de aproximadamente 4cm de comprimento.

3.1.2 - PET

Filme de poli(tereftalato de etileno) (PET) com 12 μ m de espessura foi fornecido pela *Rhodia S.A.* As amostras utilizadas nos ensaios foram cortadas nas dimensões de 2cm x 4cm e 3 cm x 7 cm.

3.1.3 - HEMA

O monômero metacrilato de 2-hidroxi-etila (HEMA) foi fornecido pela *Aldrich Chemical Company, Inc.*, sendo utilizado nos ensaios sem prévia purificação.

3.2 - METODOLOGIA

3.2.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram previamente lavadas em solução aquosa de detergente (15% v/v) em tanque ultrassom durante 10 minutos. Em seguida foram enxaguadas em água

destilada e imersas em acetona por 10 minutos. As amostras foram deixadas sob vácuo em dessecador durante 48 horas para secagem.

3.2.2 - SELEÇÃO DO SOLVENTE

Foram observados os percentuais de intumescimento ($S_{(\%)}$) dos substratos poliméricos em diferentes solventes. Para a medida do $S_{(\%)}$, os polímeros foram imersos nos solventes em tubos de vidro com tampa, de forma a manter o líquido em equilíbrio com o seu vapor. Os filmes e os tubos foram pesados em intervalos de tempo regulares, após extração do excesso de líquido nas superfícies com o auxílio de papel de filtro. As pesagens foram repetidas até a indicação de um peso constante. Os solventes utilizados foram: água, clorofórmio, acetona, benzeno, metanol, etanol, acetato de etila e diclorometano. O valor de $S_{(\%)}$ foi calculado segundo a equação 9:

$$S(\%) = \left(\frac{m_I - m}{m} \right) \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Sendo m e m_I as massas do polímero seco e intumescido, respectivamente.

3.2.3 COPOLIMERIZAÇÃO – MÉTODO DA IRRADIAÇÃO SIMULTÂNEA

O método utilizado para a obtenção dos copolímeros de enxerto foi a de **irradiação simultânea** (ou direta) utilizando uma fonte de ^{60}Co . Este método consiste na exposição à radiação da superfície polimérica em presença do monômero e do solvente [CHAPIRO, 1979]. A solução monomérica juntamente com o substrato polimérico previamente pesado são colocados em uma ampola de vidro esquematizada na figura 6. A ampola foi colocada em uma linha de alto vácuo ilustrada na figura 7 e desgaseificada 3 a 4 vezes pela técnica de congelamento e descongelamento alternados, sendo fechada sob vácuo de aproximadamente 10^{-4} mmHg. A figura 8 mostra a fonte de ^{60}Co utilizada nos experimentos. A figura 9 ilustra a superfície da bancada da fonte de ^{60}Co sobre a qual permanecem as amostras que são irradiadas. As divisões desta superfície se referem às diferentes distâncias da fonte que determinam as diferentes taxas de dose do irradiador. As doses e taxas de dose usadas na obtenção dos copolímeros de enxerto foram estabelecidas segundo um planejamento fatorial 2^3 .

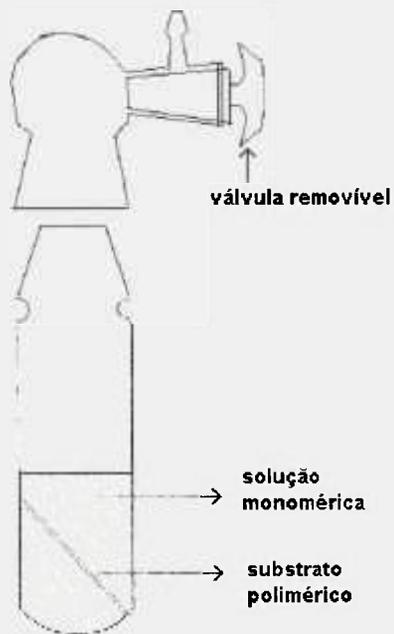


Figura 6. Ampola usada na obtenção dos copolímeros PDMS-g-PHEMA e PET-g-PHEMA. Método da irradiação simultânea.



Figura 7. Linha de alto vácuo

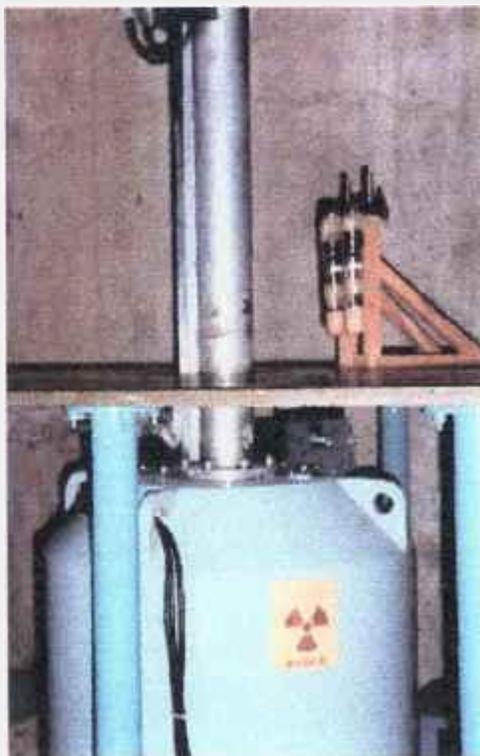


Figura 8. Fonte panorâmica de ^{60}Co



Figura 9. Posicionamento das amostras na fonte de ^{60}Co – seleção das taxas de dose de radiação.

3.2.4 - ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE ENXERTIA VIA IRRADIAÇÃO SIMULTÂNEA – PLANEJAMENTOS FATORIAIS

Foram estudadas diferentes condições experimentais (solvente, dose e taxa de dose de radiação, concentração do monômero, além do uso de inibidor de homopolimerização) para obtenção dos copolímeros de enxerto PET-g-PHEMA e PDMS-g-PHEMA com percentuais de enxertia e propriedades físico-químicas satisfatórias para a aplicação destas superfícies como biomateriais. Para tal, fez-se uso da técnica de *planejamentos fatoriais*. Como já dito, estes planejamentos são amplamente utilizados em experimentos onde o objetivo é se analisar vários fatores de interesse com o menor número possível de experimentos [NETO e col., 1993].

3.2.5 - HOMOPOLÍMERO RESIDUAL

Após irradiação, os filmes de PET e os tubos de PDMS foram levados a refluxo em metanol em um extrator Soxhlet durante um tempo mínimo de 24 horas para total remoção do homopolímero residual. As amostras foram secas em dessecador a temperatura ambiente (25°C) até atingirem peso constante. A percentagem de enxertia foi determinada pela diferença de massa das amostras antes e após a irradiação, depois da extração do homopolímero residual.

3.2.6 - HIDROFILICIDADE

Os tubos e filmes de PDMS e seus respectivos copolímeros de massa conhecida foram deixados durante 24 horas imersos em água destilada. Após rápida secagem, o conteúdo de água no hidrogel em equilíbrio foi determinado gravimetricamente.

Para os filmes de PET e seus respectivos copolímeros foi realizada a medida do **ângulo de contato** (θ) por meio da técnica da projeção horizontal de uma microgota de água na superfície do filme polimérico, conforme ilustra a figura 10. Os substratos poliméricos modificados e não-modificados foram condicionados a uma umidade relativa de 80 – 90% sendo em seguida fixados no suporte do projetor para a medida de θ . Com o

auxílio de uma micropipeta, uma gota de água destilada foi colocada sobre a superfície da amostra polimérica.

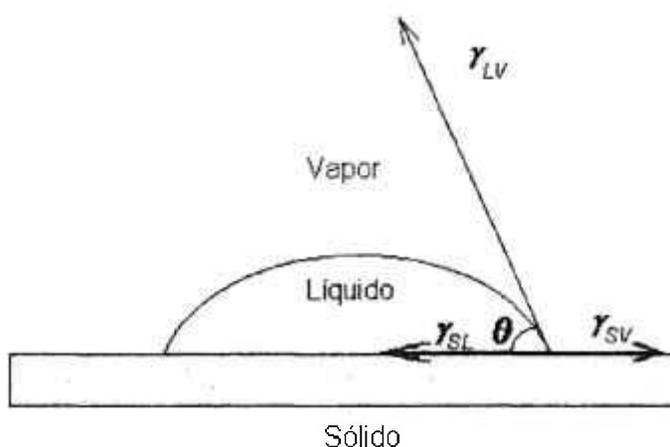


Figura 10. Medida do ângulo de contato

3.2.7 - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros foram obtidos no espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da BOMEM, modelo MB-100, com acessório de reflexão atenuada (ATR), em atmosfera inerte e a temperatura ambiente. Os espectros foram registrados na região de 600 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 20 scans/min.

3.2.8 - MICROSCOPIA ÓPTICA

O equipamento utilizado foi um microscópio Leitz Laborlux 12HL. Pequenos discos (de aproximadamente 200 μm de espessura) foram obtidos de amostras de PDMS original e modificadas usando-se um micrótomo de congelamento. As amostras foram intumescidas em uma solução aquosa do corante fucsina (0,5%). Após rápida lavagem e retirada do excesso de água, as amostras foram imediatamente analisadas.

3.2.9 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de PDMS foram fixadas em um suporte metálico e após deposição de ouro foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips modelo XL30, com analisador de energia por raios X dispersivos (EDAX).

3.2.10 - ANÁLISE MECÂNICA

O módulo de elasticidade (E) de PET e seus copolímeros foi obtido utilizando-se um dinamômetro Instron (modelo 84) cuja velocidade do travessão foi de 10mm/min. Os corpos de prova cujas dimensões encontram-se descritas na figura 11, foram preparados segundo a norma ASTM-D638. Por outro lado, os copolímeros derivados do PDMS foram cortados em anéis de aproximadamente 2mm de altura e submetidos à análise de DMA (Dynamic Mechanical Analysis) realizada num aparelho da NETZSCH 242 – Dynamic Mechanical Analyzer, a uma frequência de 1Hz, numa faixa de temperatura de -150 a 37°C a uma taxa de aquecimento de $2^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

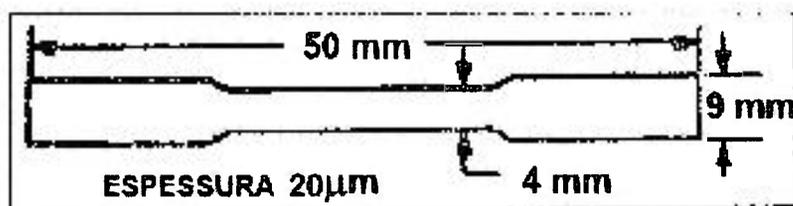


Figura 11. Corpos de prova das amostras de PET e derivados

3.2.11 - IMOBILIZAÇÃO DA ALBUMINA HUMANA

A preparação das matrizes poliméricas para posterior *imobilização da proteína* seguiu o procedimento descrito em literatura [BEDDOWS e GUTHRIE, 1988]. Para transformar as ramificações de poli(metacrilato de 2-hidroxietila) do copolímero de enxerto no correspondente poli(ácido metacrílico), amostras de PDMS e PDMS-g-PHEMA foram refluxadas com NaOH (0,3M) durante três horas (cerca de 25mL de solução para cada grama de amostra). Os produtos foram filtrados, lavados com água, HCl (0,3M) e

novamente com água, sendo em seguida mantidas em dessecador até atingir massa constante. O acoplamento da proteína ocorreu por meio dos grupos carboxílicos dos copolímeros, pela ativação destes por CMC (1-ciclohexil,1-3-(2-morfolinoetil)-carbodi-imida-meta-*p*-tolueno sulfonato) [SILVA e col., 1990]. Então o copolímero de enxerto (100mg) foi adicionado a 10mL de uma solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7) contendo 40mg de CMC e 40mg de proteína. Os componentes foram mantidos sob agitação mecânica durante 18 horas a 4 °C. Finalmente os copolímeros foram lavados e secos sob pressão reduzida a temperatura ambiente. A dosagem da proteína imobilizada foi realizada segundo o método de BRADFORD (1976). As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro UV Ultrospec III da Pharmacia Biotech, a um comprimento de onda de 595nm.

3.2.12 - TESTE DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade dos polímeros de PET e PDMS e de seus copolímeros de enxerto foi avaliada com o extrato das amostras em uma cultura celular, pelo método da supressão de colônias.

Utilizou-se uma cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO k1), da American Type Culture Collection. O ensaio foi realizado colocando-se diluições dos extratos das matrizes poliméricas em contato com a cultura de células CHO k1 em placa de Petri de 15x60 mm. Utilizou-se como controle positivo uma solução de fenol 0,02% e como controle negativo, um extrato de polietileno de alta densidade (HDPE).

Os extratos das amostras poliméricas foram preparados com meio de cultura MEM-SFB (Meio Mínimo de Eagle – Soro Fetal Bovino) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de uma solução de penicilina e estreptomicina. Utilizou-se cerca de 0,5 cm² do material esterilizado para cada mL do meio de cultura MEM-SFB (intervalo permitido pela ISO: 0,5 a 6cm² do material/mL do meio de cultura). O sistema foi incubado por 24h em estufa a 37°C. Foram feitas diluições seriadas dos extratos das amostras, do HDPE e da solução de fenol 0,02% (50; 25; 12,5; 6,25%).

As células CHO k1, foram cultivadas em garrafa de plástico, em MEM-SFB, em estufa com atmosfera úmida com 5% CO₂ a 37°C, até obtenção de uma monocamada de células com crescimento confluyente (figura 12). O desprendimento das células da garrafa foi feito com a tripsinização das mesmas (solução de tripsina a 0,25%). A suspensão foi colocada em tubos de centrífuga com tampa e centrifugados a 1500 rpm (X g) por cinco minutos. As células foram lavadas duas vezes com solução PBS (tampão fosfato salina, pH 7,4 e sem íons cálcio e magnésio) e a suspensão foi ajustada para 100 células/mL. Foram distribuídos 2mL dessa suspensão em cada placa de Petri e incubadas por cerca de 5h para adesão das células. Após esse período o meio de cultura foi removido e nessas placas foram adicionados 5mL do extrato puro e de cada diluição seriada (figura 13). Na placa de controle de CHO k1 foi adicionado 5mL do meio fresco (MEM-SFB). Foram feitas triplicatas de cada concentração dos extratos testados. As placas foram incubadas em estufa úmida com 5% CO₂, 37°C por 7 dias. Decorrido esse tempo o meio foi removido e as colônias formadas foram fixadas em formol 10% em uma solução salina 0,9% e coradas com corante de Giemsa.

As colônias visíveis em cada placa foram contadas em um contador de colônias da PHOENIX, modelo CP-600, como ilustra a figura 14 e comparadas com o número de colônias da placa controle de CHO k1.

O potencial citotóxico do material avaliado foi expresso em índice de citotoxicidade (IC_{50(%)}), que é a concentração do extrato que suprime em 50% a formação de colônias em relação ao controle [ISO 10993-5, 1992; CAMPOS e col., 1996].

2.2.13 - TESTE DE HEMOCOMPATIBILIDADE PELA ADESÃO DE PLAQUETAS

As amostras dos polímeros de PET e PDMS e seus respectivos copolímeros de enxerto foram testados quanto a hemocompatibilidade, segundo normas internacionais [ISO 10993-4, 1992]. Para testar a adesão plaquetária nas superfícies das amostras, foram coletados 10mL de sangue humano em meio ACD (anticoagulante) na proporção de 1mL de sangue : 0,25 mL de ACD. Após centrifugação (1000 rpm / 15 minutos), células vermelhas foram separadas e um plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido.



Figura 12. Incubação das culturas celulares em estufa a 37°C

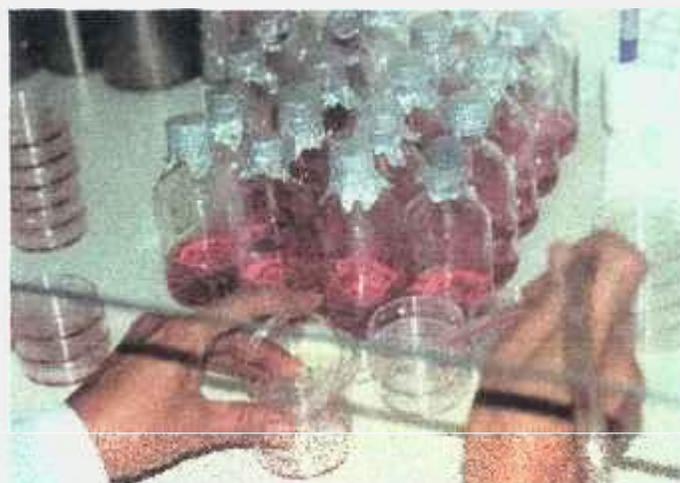


Figura 13. Retirada do meio de cultura celular e posterior adição do extrato polimérico.

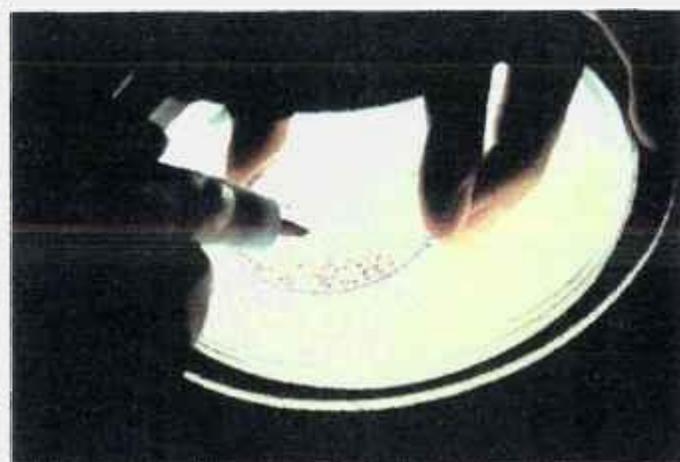


Figura 14. Contagem das colônias celulares

As amostras poliméricas (originais e modificadas) foram cortadas (25mm²) e aderidas em lamínulas de vidro com fita adesiva dupla face. As lamínulas contendo as amostras poliméricas foram colocadas em uma placa de Petri e esta foi colocada dentro de outra placa contendo água. O conjunto de placas foi mantido a 37°C por 15 minutos a fim de umidificar o meio. Em seguida, as superfícies poliméricas foram totalmente recobertas com uma quantidade de PRP, sendo novamente acondicionadas no conjunto de placas de Petri e levadas à estufa a 37°C por 1 minuto. As amostras foram então lavadas com solução salina (0,2M) e imersas em glutaraldeído (2,5%) por 10 minutos a temperatura ambiente e desidratadas com etanol nas concentrações de 50% (por 5 minutos), 75% (por 10 minutos) e 95% (15 minutos).

3.2.14 - TESTE DE HEMOCOMPATIBILIDADE PELA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

As amostras dos polímeros de PET e PDMS e seus respectivos copolímeros de enxerto foram testados em sua capacidade de hemólise (destruição de glóbulos vermelhos do sangue com liberação de hemoglobina) por meio do método de contato direto. 100µL de sangue total de coelho foram adicionados à 5mL de solução de NaCl (0,9%) em tubos contendo as amostras poliméricas (foram utilizados 500mg ou 5,5cm² de cada amostra). Outros 100µL de sangue total de coelho foram adicionados à 5mL de solução de NaCl sem amostra, obtendo-se o controle negativo; o controle positivo foi obtido adicionando-se 100µL de sangue total de coelho à 5mL de água destilada.

Após rápida homogeneização, os tubos foram deixados em banho-Maria a 37 °C durante 1 hora. Após o tempo de incubação, a absorbância do supernadante de cada tubo foi lida a 545nm em um espectrofotômetro Ultrospec III, Pharmacia LKB e a percentagem de hemólise foi calculada segundo a equação 10:

$$\left[\frac{(abs_{teste} - abs_{controle\ negativo})}{abs_{controle\ positivo}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

$$\text{onde } \begin{cases} abs_{teste} = \text{absorbância da amostra} \\ abs_{Cnegativo} = \text{absorbância do controle negativo} \\ abs_{Cpositivo} = \text{absorbância do controle positivo} \end{cases}$$

Somente amostras com valores médios de hemólise abaixo de 5% foram consideradas não hemolíticas.

3.2.15 - TESTE DE HEMOCOMPATIBILIDADE PELA FORMAÇÃO DE TROMBOS (CINÉTICA DE COAGULAÇÃO)

A relação das superfícies poliméricas com o sangue foi avaliada segundo o método cinético de formação de trombos proposto por IMAI e NOSE (1972). Sangue humano fresco (4 mL) com anticoagulante foi preparado com 1 mL de solução de ACD e mantido refrigerado no decorrer do ensaio. As matrizes modificadas e não modificadas foram colocadas em uma placa de Petri tampada contendo em seu interior um papel de filtro umedecido. O sistema foi mantido em estufa a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, 20 µL do sangue preparado com a solução de ACD foi colocado sobre a área do filme (1 cm²) e a reação de coagulação foi iniciada pela adição de 10 µL de CaCl₂ a 3,8%. A reação foi interrompida em diferentes intervalos de tempo pela adição de água destilada (5 a 10 mL). A fixação dos trombos foi realizada por meio da imersão das amostras em formaldeído a 37 % durante 5 minutos. A absorbância da água de lavagem de cada amostra foi lida a 540nm em um espectrofotômetro Ultrospec III, Pharmacia LKB.

CAPÍTULO 4



Van Gogh

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - OBTENÇÃO DOS COPOLÍMEROS DE ENXERTO PET-g-PHEMA E PDMS-g-PHEMA

4.1.1 - ESTUDO DA DIFUSÃO DO MONÔMERO NA MATRIZ - ESCOLHA DO SOLVENTE

O processo de enxertia é afetado pela difusão do monômero e do solvente dentro da matriz polimérica. Portanto, para obter-se um alto grau de enxertia, o monômero deve atingir o maior número possível dos radicais gerados na matriz polimérica [CHAPIRO, 1979]. Desta forma, o solvente escolhido deve “conduzir” as moléculas do monômero o mais próximo possível do sítio ativo do substrato polimérico, o que equivale dizer que a matriz deve apresentar um intumescimento significativo no solvente escolhido.

Tal como ilustra a figura 15, dentre os vários fatores que influenciam direta ou indiretamente no percentual de enxertia (dose, taxa de dose e concentração do monômero), o efeito de difusão pode ser usado para controlar a espessura da zona enxertada no filme. O tempo de contato do filme com a solução monomérica antes da irradiação determina a profundidade de penetração do monômero. Assim, num intervalo curto de tempo de contato, a enxertia ocorre na superfície do filme polimérico, ao passo que num intervalo mais longo, a enxertia pode ocorrer no interior da matriz polimérica [CHAPIRO, 1962]. Além do tempo de contato, deve-se levar em conta a capacidade de intumescimento do solvente \Rightarrow quanto maior a difusão do solvente na matriz polimérica, maior será a probabilidade da enxertia ocorrer no seu interior.

A escolha do solvente pode ser baseada nos valores dos *parâmetros de Hildebrand* (δ) ou parâmetro de solubilidade da matriz e do solvente [BRANDRUP e col., 1989]. O processo de dissolver um polímero em um solvente é governado pela energia livre da mistura (ΔG_m):

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

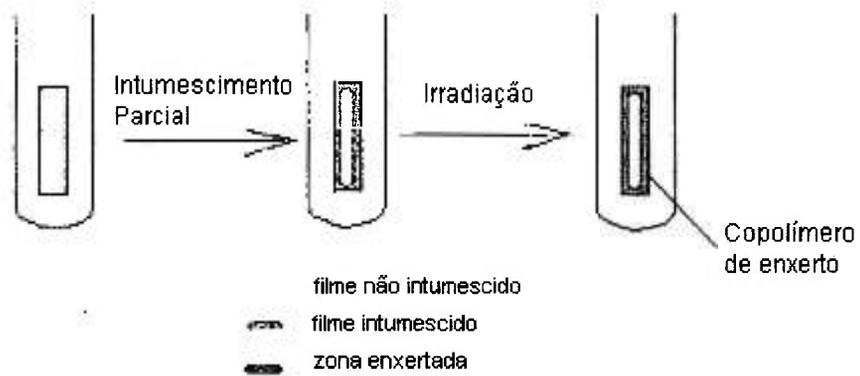


Figura 15. Efeito do solvente no processo de enxertia.

Onde ΔG_m é a variação da energia livre de Gibbs; ΔH_m é a variação da entalpia da mistura; T é a temperatura absoluta e ΔS_m é a variação da entropia da mistura.

Quando $\Delta G_m < 0$ significa que a dissolução de um polímero em um solvente ocorre de maneira espontânea. De acordo com a equação 11, este valor negativo é determinado diretamente pelo valor de ΔH_m :

$$\Delta H_m = v_1 v_2 (\delta_1 - \delta_2)^2 \quad \text{Equação 12}$$

A equação 12 permite concluir que quanto menor a diferença entre δ_1 e δ_2 , menor será o valor da entalpia, implicando assim em um maior grau de solubilidade do polímero no dado solvente.

Um dos métodos mais fáceis de se determinar o valor de δ_2 (equação 13) para um determinado polímero de estrutura conhecida, é por meio do uso da *constante de atração molar (E)*, cujos valores estão descritos na tabela 2 [BRANDRUP, 1989]:

$$\delta_2 = \rho_i \sum E_{ij} / M_j \quad \text{Equação 13}$$

Tabela 2. Valores da constante de atração molar (E) de alguns segmentos moleculares.

SEGMENTO DA CADEIA	E [(J/cm ³) ^{1/2} / mol]
-OH	462
-CH ₂ -	269
-C=	173
=CH ₂	259
-CH ₃	303
-COO-	668

Aplicando-se a os valores dos segmentos da cadeia do HEMA na equação 13, chegou-se ao valor de δ_2 igual a $9,34 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$.

A partir dos valores de δ_2 do monômero e das matrizes poliméricas de PET ($9,3 - 10,8 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$) e de PDMS ($7,1 - 11,5 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$) foram selecionados os solventes nos quais ambas as matrizes foram deixadas em contato até atingirem massa constante. Os graus de difusão dos solventes nos polímeros, bem como seus valores de δ_1 e os tempos de imersão, encontram-se descritos na tabela 3.

Tabela 3. Grau de intumescimento das matrizes poliméricas em diferentes solventes e tempos de imersão.

SOLVENTE	δ_1 (cal/cm ³) ^{1/2}	INTUMESCIMENTO (%)					
		PET			PDMS		
		8 hs	19 hs	40 hs	5 hs	8 hs	24 hs
Acetona	9,9	0,30 ± 0,04	2,00 ± 0,60	2,20 ± 0,40	14 ± 0,9	16 ± 1,2	17 ± 2
Acetato de etila	9,1	0,90 ± 0,10	3,30 ± 0,40	3,50 ± 0,40	143,0 ± 1,4	154,0 ± 3,2	156 ± 4
Água	23,4	0,30 ± 0,10	1,90 ± 0,10	2,00 ± 0,30	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2
Benzeno	9,2	0,10 ± 0,05	1,30 ± 0,15	1,50 ± 0,20	273 ± 2	279,0 ± 3,0	283 ± 3
Metanol	14,5	0,10 ± 0,04	0,60 ± 0,10	0,70 ± 0,20	Nt	Nt	Nt
Etanol	12,7	1,30 ± 0,20	1,60 ± 0,20	1,80 ± 0,08	Nt	Nt	Nt
Dioclorometano	9,7	1,10 ± 0,08	1,30 ± 0,06	1,60 ± 0,20	424,0 ± 2,3	426,0 ± 4,6	427 ± 4
Clorofórmio	9,3	7,60 ± 1,00	8,20 ± 1,20	8,40 ± 2,00	630,0 ± 2,6	720,0 ± 2,8	722 ± 3

Nt = não testado

Observou-se que em 24 horas de contato com o solvente, ambas as matrizes apresentaram um percentual de intumescimento constante, indicando que foi atingido um

estado de equilíbrio entre a matriz e o solvente. As matrizes também foram imersas em HEMA durante um tempo máximo de 30 horas e apresentaram um percentual médio de intumescimento de 2%.

No presente trabalho é de grande interesse que a enxertia do monômero hidrofílico ocorra na superfície do polímero, uma vez que a hidroflicidade desta superfície será o fator determinante da característica antitrombogênica do polímero. Outrossim, o enxerto na superfície facilitará a imobilização da albumina via ligação covalente, incrementando assim a propriedade hemocompatível.

Devido a estas considerações descartou-se, a princípio, o uso de solventes que apresentassem alto grau de intumescimento. No entanto, como será descrito posteriormente, usando-se solventes com baixos graus de intumescimento e até mesmo adicionando-se inibidor de homopolimerização, os percentuais de enxertia do HEMA nos filmes de PET foram muito baixos.

4.1.2 - ADIÇÃO DE INIBIDOR DE HOMOPOLIMERIZAÇÃO

Na primeira fase deste estudo, foi empregado o uso de uma solução metanólica de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05 mol/L) como meio reacional para a enxertia do HEMA nos substratos de PET e PDMS. O uso do metanol como solvente teve como justificativa a sua facilidade em dissolver o homopolímero PHEMA formado durante o processo de irradiação.

No método da enxertia via irradiação simultânea o grau de enxertia é diretamente afetado pela reação de homopolimerização do monômero em solução. A adição de sais metálicos à mistura reacional pode inibir a formação do homopolímero, deixando as moléculas monoméricas livres e facilitando a reação de copolimerização.

É conhecido que íons Cu^{2+} e Fe^{2+} inibem a homopolimerização do monômero, possibilitando um aumento no percentual de enxertia. Os íons de Cu^{2+} são amplamente utilizados nos processos de enxertia, pois possuem uma camada eletrônica incompleta, o que o torna capaz de aceitar um e^- do radical livre da cadeia do homopolímero em propagação [GARGAN e col., 1990]. Assim, o crescimento da cadeia homopolimérica é

cessado e o processo de enxertia do monômero no substrato polimérico é favorecido. O mecanismo desta reação está ilustrado na figura 16.

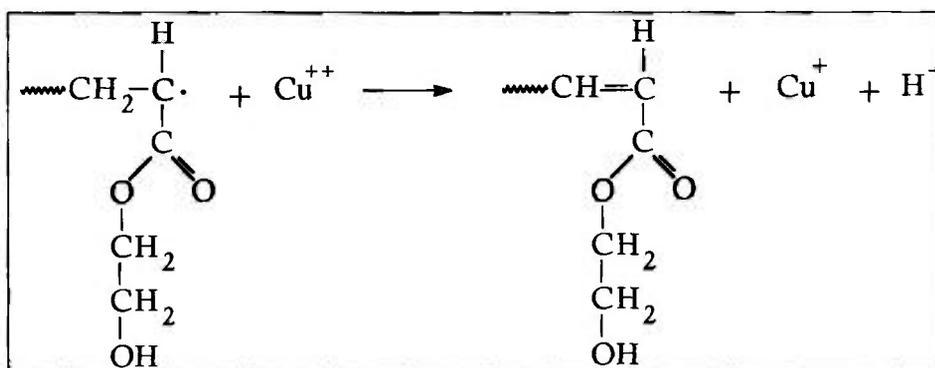


Figura 16. Mecanismo da ação do inibidor de homopolimerização.

4.1.3 – PLANEJAMENTOS FATORIAIS

As condições para a enxertia do PHEMA nas matrizes de PET e PDMS foram estudadas por meio de um planejamento fatorial de dois níveis e três variáveis (D, TD e CON). As condições experimentais para a enxertia do PHEMA nas matrizes não foram iguais, uma vez que as propriedades físico-químicas destas matrizes são significativamente diferentes.

Os planejamentos fatoriais são amplamente utilizados em experimentos onde o objetivo é analisar vários fatores de interesse com o menor número possível de ensaios [NETO e col., 1993]. A classe mais comum e simples de planejamento fatorial é aquela onde cada fator (variável independente) é pesquisado em apenas dois níveis reais, um valor baixo e um alto. Genericamente, é designado por 2^k , onde k é o número de fatores. O número de condições experimentais é 2^k e se r testes ou réplicas são realizadas em cada condição experimental, o número total de ensaios é $N = r2^k$. Para facilitar o estudo desses planejamentos, os níveis reais dos fatores são codificados com +1 (nível alto) e -1 (nível baixo) ou apenas com os sinais + e -.

4.1.3.1 - Análise do Planejamento fatorial (2^3): PDMS-g-PHEMA (1º estudo)

Nesta primeira tentativa, o meio reacional empregado foi uma solução metanólica de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05 mol/L). A tabela 4 apresenta o desenho do planejamento fatorial 2^3 (ou *matriz de planejamento*). Os sinais + e - representam os níveis codificados das variáveis estudadas. A tabela 4 traz também os percentuais de enxertia médios obtidos nos ensaios em duplicata.

Tabela 4. Matriz de planejamento. Percentuais de enxertia médios dos copolímeros de PDMS-g-PHEMA e respectivos desvios padrão.

[HEMA] ^a	TAXA DE DOSE ^b	DOSE ^c	ENXERTIA (%)
-	-	-	4,0 ± 0,2
+	-	-	43,0 ± 2,0
-	+	-	15,0 ± 0,5
+	+	-	78,0 ± 28,0
-	-	+	40,0 ± 2,6
+	-	+	84,0 ± 2,2
-	+	+	111,0 ± 1,4
+	+	+	101,0 ± 23,0

a) nível (-) = 10%(v/v), nível (+) = 50%(v/v)

b) nível (-) = 0,064kGy/h, nível (+) = 0,366kGy/h

c) nível (-) = 1kGy, nível (+) = 10kGy

A análise dos dados do planejamento fatorial se iniciou com a abordagem dos efeitos das variáveis (concentração do monômero, taxa de dose e dose) bem como os efeitos das interações entre as mesmas. O efeito, como já dito anteriormente, informa o quanto cada variável (ou combinação entre duas ou mais variáveis) influencia no fator resposta (no caso estudado, *percentual de enxertia*) quando seu valor passa do nível mais baixo para o mais alto. Como todos os ensaios foram realizados em duplicata torna-se necessário considerar também o *erro padrão de cada efeito* (δ_E). O cálculo de δ_E se deu conforme a expressa da equação 14:

$$\delta_E = [\sum(d_i^2)] / 0,5$$

Equação 14



Onde d_i é a diferença dos percentuais de enxertia obtidos nas duplicatas do i -ésimo ensaio. Aplicando-se os resultados à equação acima, chegou-se ao valor de 9,3.

A escolha dos efeitos com significância estatística foi realizada segundo um teste *t-Student* com um nível mínimo de 95% de confiança. O valor de t com 8 graus de liberdade segundo uma tabela estatística é de 2,306 [NETO e col., 1993]. Portanto, para que uma variável seja considerada estatisticamente significativa, ela deve apresentar um efeito estimado com um valor mínimo de $t_{8-1} \times \delta_E$, ou seja, 21,4.

Tabela 5. Efeitos estimados das variáveis estudadas e seus respectivos desvios padrão.

Ensaio	Efeito	Efeito Estimado \pm Erro Padrão
1	Concentração (CON)	34,25 \pm 9,30
2	Taxa de dose (TD)	33,25 \pm 9,30
3	Dose (D)	49,25 \pm 9,30
4	CON.TD	-7,25 \pm 9,30
5	CON.D	-17,25 \pm 9,30
6	TD.D	10,75 \pm 9,30
7	CON.TD.D	-19,75 \pm 9,30
8	Média	59,75 \pm 4,65

Os resultados obtidos descritos na tabela 5, indicam **que todas as variáveis analisadas apresentam significância estatística**, ou seja, todas influenciam diretamente no percentual de enxertia. Outra conclusão é o fato de que as três variáveis não interagem entre si. Como conclusão geral pode-se dizer que **o comportamento do percentual de enxertia não pode ser previsto pela técnica do planejamento fatorial empregando-se as condições experimentais propostas**.

Além da impossibilidade de se prever o comportamento do percentual de enxertia por esta técnica, alguns ensaios apresentaram percentuais de enxertia acima de 100%. Quando um material polimérico é escolhido para uma determinada aplicação biomédica, um dos motivos para sua escolha está relacionado com a propriedade mecânica deste material. O percentual de enxertia, portanto, não deve comprometer as propriedades mecânicas do polímero não modificado.

4.1.3.2 - Análise do Planejamento fatorial (2³): PDMS-g-PHEMA (2^o estudo)

Visando a obtenção de copolímeros de enxerto PDMS-g-PHEMA com propriedades mecânicas mais adequadas para sua aplicação como biomaterial, foi realizado um novo planejamento fatorial, onde desta vez fez-se uso do acetato de etila como solvente. Também foi alterado o valor da concentração do monômero. As novas condições experimentais estão descritas na tabela 6.

Tabela 6. Matriz de planejamento. Percentuais de enxertia médios dos copolímero de PDMS-g-PHEMA e respectivos desvios padrão.

ENSAIO	DOSE ^a	TAXA DE DOSE ^b	[HEMA] ^c	ENXERTIA (%)
1	-	-	-	21,7 ± 1,2
2	+	-	-	23,3 ± 0,6
3	-	+	-	15,5 ± 1,4
4	+	+	-	16,4 ± 0,2
5	-	-	+	68,2 ± 3,7
6	+	-	+	83,0 ± 6,3
7	-	+	+	54,1 ± 1,0
8	+	+	+	54,7 ± 1,3

a) nível (-) = 1kGy, nível (+) = 10kGy

b) nível (-) = 0,064kGy/h, nível (+) = 0,366kGy/h

c) nível (-) = 10%(v/v), nível (+) = 30%(v/v)

O erro padrão dos efeitos foi calculado segundo a equação 13 e o valor obtido foi de **1,93**. Aplicando-se o teste de *t-Student* (95% de confiança), concluiu-se que os fatores com significância estatística são aqueles com valores absolutos superiores a **4,45**. A partir dos dados da tabela 6, observa-se que somente as variáveis *taxa de dose e concentração*, bem como o efeito de interação entre as mesmas, influenciaram significativamente o percentual de enxertia nas condições avaliadas, como ilustra a tabela 7.

A análise por meio de gráfico normal é uma técnica alternativa para elucidar o que é efeito e o que pode vir a ser apenas considerado como ruído nos resultados de um planejamento. Os efeitos desprezíveis têm distribuição zero e quando projetados em um gráfico normal tendem a se agrupar em uma linha reta que passa pelo ponto (0,0) [NETO e col., 1993]. Na figura 17, observou-se que somente os efeitos taxa de dose e concentração, além da interação entre ambos fugiram à tendência do agrupamento sobre esta reta, confirmando assim as conclusões anteriores.

Tabela 7. Efeitos estimados a partir dos percentuais de enxertia do PHEMA na matriz de PDMS descritos na tabela 6.

Ensaio	Variáveis	Efeito Estimado \pm Erro Padrão
1	Dose (D)	4,45 \pm 1,93
2	Taxa de dose (TD)	-13,86 \pm 1,93
3	Concentração (CON)	45,78 \pm 1,93
4	D.TD	-3,73 \pm 1,93
5	D.CON	3,23 \pm 1,93
6	TD.CON	-7,33 \pm 1,93
7	D.TD.CON	-3,33 \pm 1,93
8	Média	42,10 \pm 0,97

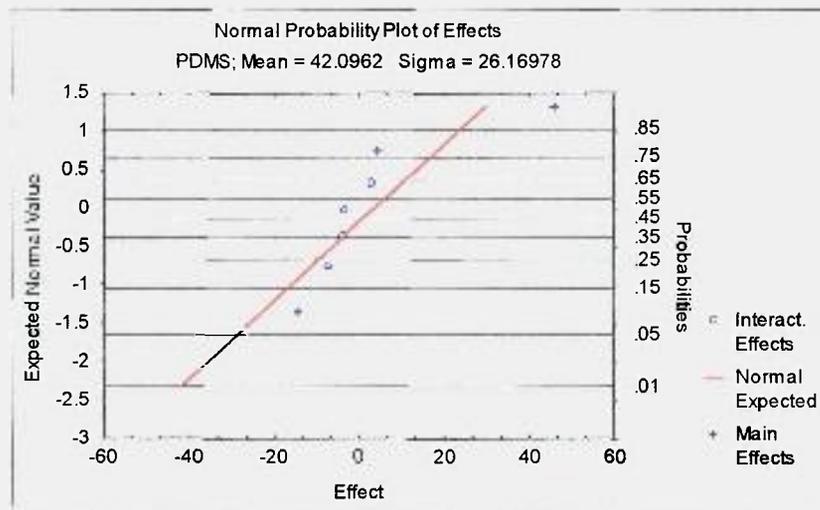


Figura 17. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos estimados para os copolímeros de PDMS-g-PHEMA

Até aqui, cada fator foi estudado em apenas dois níveis. Isso pode resultar numa visão um tanto imprecisa da verdadeira relação funcional, ligando a resposta do sistema aos fatores que a influenciam. O passo seguinte foi estudar o rendimento da enxertia atribuindo a estes mesmos fatores valores intermediários com relação ao planejamento anterior. Para tal, a dose de radiação foi fixada em um valor de 5,5kGy. Este valor foi escolhido aleatoriamente pois, como já visto, este foi o parâmetro que menos influenciou no percentual de enxertia. No caso da taxa de dose de radiação e concentração do monômero foi escolhido o valor médio do intervalo usado no experimento anterior para

cada variável. À matriz de planejamento ilustrada na tabela 6 acrescentou-se um novo nível (nível 0) aos fatores estudados. Este foi chamado de *ponto central*.

O objetivo desta nova etapa foi, portanto, melhorar o percentual de enxertia, escolhendo outros valores para as variáveis controle e investigando-se a superfície de resposta em torno das condições experimentais já estipuladas no primeiro planejamento fatorial. O planejamento agora contém um ponto central e por isso varre três níveis de cada variável, e não apenas dois. O fato de existirem três níveis permitiu verificar se houve ou não falta de ajuste para um modelo linear (o que seria impossível se houvesse apenas dois níveis) [NETO e col., 1993].

As variáveis taxa de dose (TD) e concentração (CON) foram codificadas da seguinte maneira:

- $X_1 = [TD - (20 + 50)\text{cm}/2] = (TD - 35\text{cm})$
- $X_2 = [CON - (10 + 30)\%/2] = (CON - 20\%)$

Observação: a 35cm de distância da fonte corresponde a uma taxa de dose de 148Gy/h.

Variáveis com unidade codificada nula correspondem ao ponto central.

A matriz parcial do planejamento encontra-se ilustrada na tabela 8.

Tabela 8. Matriz de planejamento referente ao estudo no ponto central

Ensaio	TD	CON	X_1	X_2	Enxertia (%)
9	77 Gy/h	10%	-1	-1	22,1 ± 1,5
10	324 Gy/h	10%	1	-1	12,4 ± 0,2
11	77 Gy/h	30%	-1	1	60,6 ± 0,9
12	324 Gy/h	30%	1	1	43,9 ± 7,4
13	148 Gy/h	20%	0	0	41,2 ± 0,5
14	148 Gy/h	20%	0	0	37,9 ± 5,3
15	148 Gy/h	20%	0	0	40,5 ± 1,4

A tabela 9 mostra a matriz completa do planejamento e os percentuais de enxertia obtidos experimentalmente em cada combinação de níveis. Ao todo foram realizados 15 ensaios, sendo 3 deles repetições no ponto central.

Foi então considerado que a superfície de resposta nesta região central é uma função linear dos fatores **TD** e **CON**, e que portanto o percentual de enxertia pode ser estimado pela Equação 15:

$$\hat{E} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad \text{Equação 15}$$

Tabela 9. Matriz de planejamento completa usada na obtenção do copolímero PDMS-g-PHEMA

Ensaio	Dose	Taxa de dose	Concentração	Enxertia (%)
1	-1	-1	-1	21.7
2	1	-1	-1	23.3
3	-1	1	-1	15.5
4	1	1	-1	16.4
5	-1	-1	1	68.2
6	1	-1	1	83.0
7	-1	1	1	54.1
8	1	1	1	54.7
9	0	-1	-1	22.1
10	0	1	-1	12.4
11	0	-1	1	60.6
12	0	1	1	43.9
13	0	0	0	41.2
14	0	0	0	37.9
15	0	0	0	40.5

Onde b_0 , b_1 , b_2 e b_3 são estimativas dos parâmetros do modelo e x_1 , x_2 e x_3 representam as variáveis dose, taxa de dose e concentração codificadas. Os valores de b_0 , b_1 , b_2 e b_3 foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados (ou regressão). Os cálculos realizados pelos programas estatísticos usados na análise dos resultados experimentais são discutidos em detalhes no *Apêndice* deste trabalho.

Os coeficientes calculados para o polinômio ajustado em primeiro grau foram:

$$b_0 = 39,70$$

$$b_1 = 2,23$$

$$b_2 = -6,83$$

$$b_3 = 21,09$$

Uma vez que os ensaios são realizados em duplicatas e com repetições, é interessante saber se a flutuação das respostas introduz incerteza na determinação dos parâmetros e nas previsões feitas a partir deles. Os desvios dos parâmetros são calculados a partir de outra equação matricial (equação 16):

$$\hat{V}(b) = (X'X)^{-1} s^2 \quad \text{Equação 16}$$

X corresponde à matriz completa de coeficientes de contraste, ou seja, os valores das variáveis codificadas: 0, -1 ou +1, s^2 nada mais é do que o desvio padrão observado para as repetições dos ensaios referentes ao ponto central.

$$\hat{V}(b) = \begin{pmatrix} 0,067 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,125 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,083 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,083 \end{pmatrix} \times 2,89 = \begin{pmatrix} 0,193 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,361 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,241 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,241 \end{pmatrix}$$

Elevando-se a matriz resultante a 1/2 obtém-se então os erros padrão dos parâmetros b_0 , b_1 , b_2 e b_3 .

Calculou-se a estimativa da variância (s_x^2) para os três ensaios correspondentes ao ponto central e o valor obtido foi de **2,89**. Conforme já descrito, obteve-se então a equação 17 a partir da equação 15, a qual propõe a idéia do modelo linear

$$\hat{E} = 39,7 + 2,23 x_1 - 6,83 x_2 + 21,1 x_3 \quad \text{Equação 17}$$

$(\pm 0,45)$ $(\pm 0,61)$ $(\pm 0,50)$ $(\pm 0,50)$

Uma vez admitido que os erros padrão dos parâmetros se distribuem normalmente, empregou-se então a distribuição de Student para testar a significância do valor estimado para cada um deles. O intervalo de confiança foi construído segundo a equação 18:

$$b_i \pm t_{n-1} \frac{s}{(n)^{1/2}} \quad \text{Equação 18}$$

Sendo: b_i = o valor do i -ésimo parâmetro, n o número de observações no ponto central e $s/(n)^{1/2}$ o erro padrão do i -ésimo parâmetro.

Os intervalos obtidos a um nível de 95% de confiança (onde $t_{n-1} = 4,303$) foram:

$$b_0: 37,8 \text{ a } 41,6$$

$$b_1: -0,39 \text{ a } 4,85$$

$$b_2: -4,68 \text{ a } -8,98$$

$$b_3: 18,9 \text{ a } 23,20$$

Como os limites calculados para b_0 , b_2 e b_3 apresentaram sinais iguais, considerou-se que estes parâmetros seriam significativamente diferentes de zero nesse nível de confiança. Já no caso de b_1 os limites do intervalo apresentaram sinais opostos e como nenhum dos valores num intervalo de confiança poderia ser mais provável que o outro, concluiu-se que o valor verdadeiro de b_1 seria provavelmente zero, anulando assim sua significância estatística.

Com base nos resultados, concluiu-se que a equação 19 seria a que melhor descreveria o modelo linear, sendo x_2 e x_3 atribuídos à taxa de dose e concentração, respectivamente.

$$\hat{E} = \underset{(\pm 0,45)}{39,7} - \underset{(\pm 0,50)}{6,83} x_2 + \underset{(\pm 0,50)}{21,1} x_3 \quad \text{Equação 19}$$

A análise da equação 19 levou à seguinte conclusão: *quanto menor a taxa de dose e maior a concentração do monômero, maior será o rendimento da enxertia*. A análise da variância para o ajuste encontra-se na tabela 10.

Tabela 10. Análise da variância para o ajuste do modelo $\hat{y} = b_0 + b_2x_2 + b_3x_3$ aos dados da tabela 9.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	5938,58	3	1979,53	52,09
Resíduos	418,03	11,00	38,00	
Falta de ajuste	412,24	9,00	45,80	15,83
Erro Puro	5,79	2,00	2,89	
TOTAL	6356,61	14,00		
% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 93,42				
% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99,91				

Para averiguar a veracidade das afirmações feitas até este ponto, o ajuste do modelo foi analisado segundo um teste F da razão MQ_{faj} / MQ_{ep} . A percentagem de variação explicada pela regressão, ou seja, a razão entre a soma quadrática devida à regressão e a soma quadrática total foi de:

$$SQ_R / SQ_T = 93,42\%$$

Mas esse valor não poderia ser comparado com 100% por causa da contribuição do erro puro. Como não há modelo que consiga reproduzir a soma quadrática do erro puro, o VALOR MÁXIMO EXPLICÁVEL nada mais é que a diferença:

$$SQ_T - SQ_{ep} = 6356,61 - 5,79 = 6350,82$$

Percentualmente este resultado corresponde a

$$6350,82 / 6356,61 = 99,91\%$$

E foi com este novo valor que a variação efetivamente explicada, **93,42%**, foi então comparada. O valor da razão:

$$MQ_{Regressão} / MQ_{resíduos} = 1979,53 / 38,003 = \mathbf{52,09}$$

Quando comparado com $F_{3,11} = 3,59$ (no nível de 95% de confiança) indicou que a regressão feita no modelo foi significativa. É interessante salientar que embora uma regressão seja altamente significativa do ponto de vista do teste F, não é útil para realizar previsões, por cobrir uma pequena faixa de variação dos fatores estudados [NETO, 1993]. Para que isso não ocorra, ou seja, para que a regressão além de estatisticamente significativa tenha também utilidade para fins preditivos, BOX e WETZ sugeriram em 1973 que o valor da razão MQ_R / MQ_r deve ser no mínimo quatro a cinco vezes maior que o valor de F_{n-1} . Essa condição foi portanto amplamente satisfeita no modelo proposto.

A adequação do modelo foi também confirmada comparando-se o valor da razão:

$$MQ_{faj} / MQ_{ep} = 45,80 / 2,89 = 15,85$$

Com o valor do teste $F_{9,2} = 19,38$. Isto equivale dizer que a probabilidade do ajuste do modelo não ser adequado é inferior à 5%.

Conclui-se portanto, que a região estudada da superfície de resposta seja satisfatoriamente descrita pela equação 19. Uma representação da perspectiva do plano obtido a partir da equação 19 é mostrada na figura 18.

Gráfico de Superfície de resposta

Mean = 36.7833 Sigma = 17.0959 Intercept = 40.8500

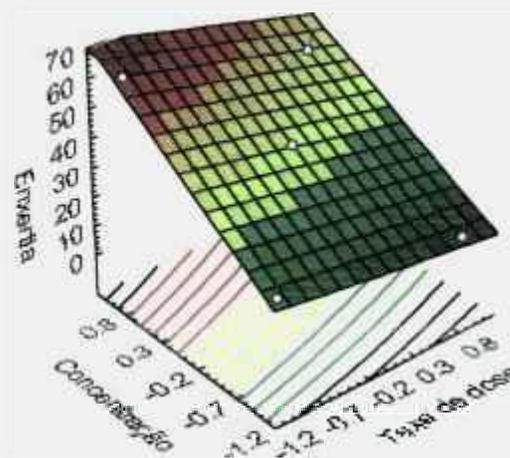


Figura 18. Plano descrito pela equação

$$\hat{E} = 39,7 - 6,83 x_2 + 21,1 x_3$$

$(\pm 0,45)$ $(\pm 0,50)$ $(\pm 0,50)$

4.1.3.3 - Análise do Planejamento Fatorial 2³: PET-g-PHEMA (1^o estudo)

Para a obtenção dos copolímeros de PET-g-PHEMA foram realizados oito ensaios cujas condições experimentais estão descritas na matriz de planejamento da tabela 11. O meio reacional foi uma solução de CuSO₄.5H₂O em metanol (0,5 mol/L).

Tabela 11. Matriz do planejamento fatorial proposto para a obtenção de PET-g-PHEMA.

ENSAIO	DOSE ^a	TAXA DE DOSE ^b	[HEMA] ^c	ENXERTIA (%)
1	-	-	-	0,48 ± 0,10
2	+	-	-	0,56 ± 0,11
3	-	+	-	0,87 ± 0,50
4	+	+	-	1,17 ± 0,06
5	-	-	+	0,69 ± 0,16
6	+	-	+	2,52 ± 0,17
7	-	+	+	1,37 ± 0,36
8	+	+	+	0,96 ± 0,06

a) nível (-) = 1kGy, nível (+) = 10kGy
b) nível (-) = 0,064kGy/h, nível (+) = 0,366kGy/h
c) nível (-) = 10%(v/v), nível (+) = 30%(v/v)

Seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente para o PDMS, a análise do planejamento fatorial para as amostras de PET iniciou-se com a escolha dos efeitos estatisticamente significativos. Aplicando-se um teste *t-Student* a um nível de 95% de confiança e 8 graus de liberdade, encontrou-se o valor tabelado para $t_{8-1} = 2,306$ [NETO e col., 1993]. O erro padrão dos efeitos (δ_E) foi estimado em 0,18, sendo portanto **0,42** ($= t_{8-1} \times \delta_E$) o valor mínimo para que o efeito pudesse ser considerado estatisticamente significativo (tabela 12). Interações de três fatores foram desprezadas.

Tabela 12. Efeitos estimados a partir dos percentuais de enxertia do PHEMA na matriz de PET descritos na tabela 11.

ENSAIO	EFEITO	EFEITO ESTIMADO ± ERRO PADRÃO
1	1:Dose	± 0,42
2	2:Taxa de dose	0,030 ± 0,42
3	3:Concentração	± 0,42
4	12	± 0,42
5	13	0,26 ± 0,42
6	23	± 0,42
7	123	± 0,42
8	Média	± 0,21

Embora alguns dos efeitos estimados tivessem valor absoluto superior a 0,42, nenhum deles apresentou significância estatística. Tal afirmação foi confirmada pelo gráfico normal de probabilidades, que é uma técnica que auxilia a distinguir o que é realmente efeito do que é apenas ruído [NETO e col., 1993]. Os efeitos desprezíveis possuem médias igual a zero e tendem a se agrupar em uma reta que passa pelo ponto (0,0). O gráfico normal expresso na figura 19 mostrou que todos os efeitos estimados foram considerados estatisticamente insignificantes, tornando impossível se concluir algo a partir dos dados obtidos.

A dificuldade de modificação da matriz polimérica de PET é decorrente de muitas características inerentes ao polímero. A natureza química do PET não permite a formação de uma apreciável quantidade de radicais em suas macromoléculas, dificultando assim o início da enxertia [SANLI e col., 1993]. O valor do rendimento radiolítico (G_R) deste polímero está compreendido entre 0,035 e 0,14 [BRANDRUP, 1989].

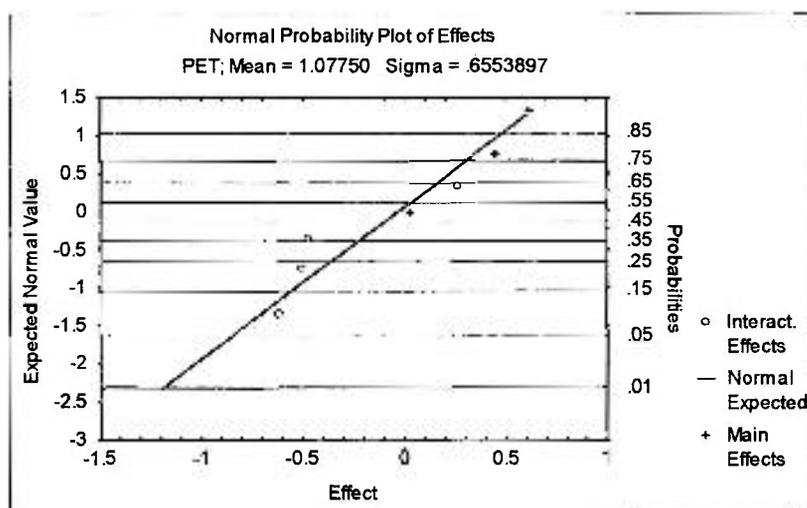


Figura 19. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos estimados para os copolímeros de PET-g-PHEMA.

4.1.3.4 - Análise do Planejamento Fatorial 2³: PET-g-PHEMA (2º estudo)

Afim de obter percentuais de enxertia mais significativos, foi testado o uso de solventes clorados na enxertia em filmes de PET. MEMETEA e STANNET (1979) descreveram em seu trabalho que solventes clorados facilitam a enxertia de monômeros vinílicos nos polímeros de PET. Os autores relataram que o uso de diclorometano (CH_2Cl_2) possibilitou a enxertia do poliestireno em filmes de PET a um percentual de 49%. Partindo-se deste princípio, uma amostra do filme de PET foi intumescido durante 24 horas a temperatura ambiente, em uma solução de HEMA a 25 % em dois solventes: CH_2Cl_2 e acetato de etila. O percentual de intumescimento foi de 31% para a solução em CH_2Cl_2 e 22% em acetato de etila. Com base no referido trabalho, amostras de PET em presença de soluções de HEMA (25% v/v) nos dois solventes, foram irradiadas em uma fonte de ⁶⁰Co Gammacell a uma dose de 40kGy a uma taxa de dose de 3,8kGy/h. Os copolímeros obtidos em acetato de etila apresentaram um percentual de enxertia de 4,3% ($\pm 0,4\%$) enquanto que aqueles obtidos em CH_2Cl_2 apresentaram um percentual de 55,3% ($\pm 1,8\%$).

Assim, um novo planejamento fatorial foi proposto para se avaliar os percentuais de enxertia do PHEMA nas matrizes de PET usando-se doses e taxas de dose de radiação mais elevadas e CH_2Cl_2 como solvente. A nova matriz de planejamento está descrita na tabela 13.

Tabela 13. Matriz de planejamento proposta para obtenção do PET-g-PHEMA.

ENSAIO	DOSE ^a	TAXA DE DOSE ^b	[HEMA] ^c	ENXERTIA (%)
1	-	-	-	18,2 \pm 0,6
2	+	-	-	18,6 \pm 1,2
3	-	+	-	21,2 \pm 0,9
4	+	+	-	15,0 \pm 1,1
5	-	-	+	25,0 \pm 0,8
6	+	-	+	24,0 \pm 1,1
7	-	+	+	35,3 \pm 3,5
8	+	+	+	55,3 \pm 1,8

a) nível (-) = 18kGy, nível (+) = 40kGy

b) nível (-) = 0,732kGy/h, nível (+) = 3,66kGy/h

c) nível (-) = 10%(v/v), nível (+) = 25%(v/v)

O erro padrão dos efeitos foi estimado em 0,81, sendo portanto **1,87** ($= 2,306 \times 0,81$) o valor mínimo para que o efeito pudesse ser considerado estatisticamente significativo (tabela 14).

Tabela 14. Efeitos estimados obtidos a partir dos dados da tabela 13.

ENSAIO	EFEITO	EFEITO ESTIMADO ± ERRO PADRÃO
1	Dose (D)	7,93 ± 1,87
2	Taxa de dose (TD)	5,63 ± 1,87
3	Concentração (CON)	15,48 ± 1,87
4	D.TD	-0,98 ± 1,87
5	D.CON	4,98 ± 1,87
6	TD.CON	11,68 ± 1,87
7	D.TD.CON	8,08 ± 1,87
8	Média	28,91 ± 0,94

A análise deste último planejamento fatorial levou a concluir que todas as variáveis estudadas influenciam diretamente no percentual de enxertia nas condições avaliadas. No caso das interações entre as mesmas, somente aquela que envolve dose e taxa de dose não tem efeito significativo na resposta final do processo de enxertia. No estudo que somente envolve estas duas variáveis, o nível de enxertia pode ser avaliado fixando-se uma e variando-se a outra variável em questão.

Concluiu-se então que as condições iniciais propostas não são ideais para a realização da análise fatorial. Como a influência da taxa de dose na técnica da enxertia é já bem consolidada cientificamente [CHAPIRO, 1962], o que pode-se especular através dos resultados obtidos é que as condições de reação utilizada para este sistema está adicionando outros fatores à cinética da reação, tornando todo o processo mais complexo.

4.2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COPOLÍMEROS PET-g-PHEMA E PDMS-g-PHEMA

O estudo da biocompatibilidade representa uma parte muito importante do conhecimento no campo da ciência dos biomateriais. Seu estudo é frequentemente incumbido aos bioquímicos, biólogos e médicos. Contudo, uma questão importante na biocompatibilidade é saber como o artefato ou material altera sua estrutura química para influenciar ou direcionar a resposta de proteínas e células frente a sua presença no organismo. Para artefatos e materiais que não liberam substâncias indesejáveis em quantidades suficientes que denotam influência na modificação do comportamento de células e tecidos, esta alteração ocorre por meio da estrutura da superfície – o corpo “lê” esta estrutura e responde. Por esta razão, deve-se entender a estrutura da superfície deste biomaterial [COOKE e col., 1996].

São muitos os parâmetros que descrevem uma superfície. Por mais parâmetros que sejam investigados, sempre será fornecida apenas parte da descrição completa da superfície. Uma caracterização completa requer o uso de muitas técnicas para compilar todas as informações necessárias. Até o presente momento, desconhece-se quais os parâmetros mais importantes que deveriam ser analisados para um estudo mais completo das respostas biológicas frente às superfícies estranhas [COOKE e col., 1996].

A seguir, são discutidos os resultados das análises físico-químicas realizadas para avaliar alguns dos parâmetros que caracterizam a superfície dos copolímeros.

4.2.1 - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia no infravermelho permite acompanhar, por meio das vibrações das ligações químicas, as alterações na cadeia polimérica do substrato devido à enxertia da cadeia do PHEMA. Espectros obtidos por transmissão (FTIR) informam a natureza dos segmentos no interior da matriz, enquanto que aqueles obtidos por reflexão (FTIR-ATR) detectam somente as ligações que se distribuem na superfície do polímero.

A figura 20 ilustra o espectro FTIR-ATR do PHEMA. As bandas presentes nas regiões de 3350 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, aos grupos $-\text{OH}$ e $\text{C}=\text{O}$ do homopolímero PHEMA.

Tanto no espectro FTIR-ATR do copolímero PDMS-g-PHEMA (figura 21) quanto no espectro do PET-g-PHEMA (figura 22), verifica-se uma alteração na região de 1700 cm^{-1} , a qual foi atribuída à presença da banda do grupo $\text{C}=\text{O}$ proveniente do PHEMA.

No caso dos espectros FTIR-ATR do PET-g-PHEMA, o aumento da intensidade desta banda foi verificado por meio de uma normalização. As intensidades da banda de carbonila das amostras de PET e PET-g-PHEMA (17 e 27% de enxertia) foram normalizadas por meio do valor da área da banda que ocorre a 1410 cm^{-1} , referente à vibração do anel fenileno. Segundo CHEN e col. (1998), esta banda não é sensível a modificações químicas que a amostra venha a sofrer. Desta forma, a partir dos espectros da figura 22, foram obtidos os dados descritos na tabela 15, que se referem às intensidades relativas das bandas de $\text{C}=\text{O}$, que por sua vez aumentou com o percentual de enxertia na matriz de PET.

Tabela 15. Intensidades relativas das bandas de $\text{C}=\text{O}$ dos espectros de FTIR-ATR dos filmes de PET e PET-g-PHEMA.

Amostra	C=O
PET	2,63
PET-g-PHEMA (17%)	3,63
PET-g-PHEMA (27%)	3,91

No espectro FTIR-ATR da matriz de PDMS-g-PHEMA ilustrado na figura 20 verifica-se também a banda a 3400cm^{-1} característica do grupo $-\text{OH}$ proveniente das cadeias do PHEMA. No caso dos copolímeros de PET-g-PHEMA, esta banda somente foi visualizada nos espectros de FTIR obtidos sem o acessório ATR (figura 23). Como o uso de solvente clorado facilita a difusão das moléculas do monômero para o interior da matriz polimérica [MEMETEA e STANNET, 1979], concluiu-se que as cadeias de PHEMA poderiam estar sendo enxertadas no interior desta.

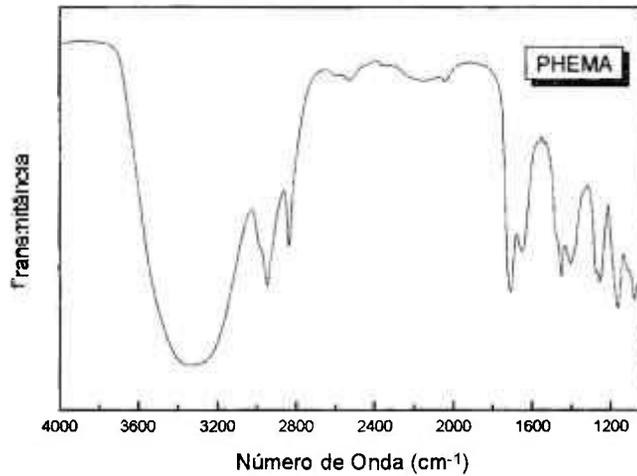


Figura 20. Espectro FTIR-ATR do PHEMA

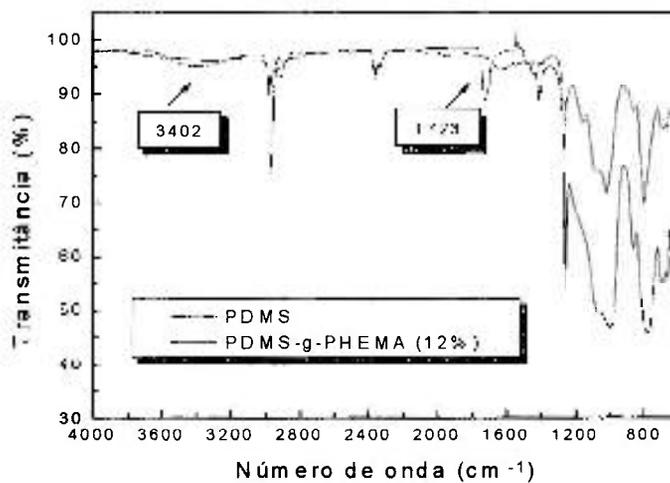


Figura 21. Espectro FTIR-ATR do PDMS não modificado e do copolímero de enxerto PDMS-g-PHEMA com 12% de enxertia. Condições de enxertia: HEMA: acetato de etila (10:90); dose = 5,5 kGy; taxa de dose = 324 Gy/h.

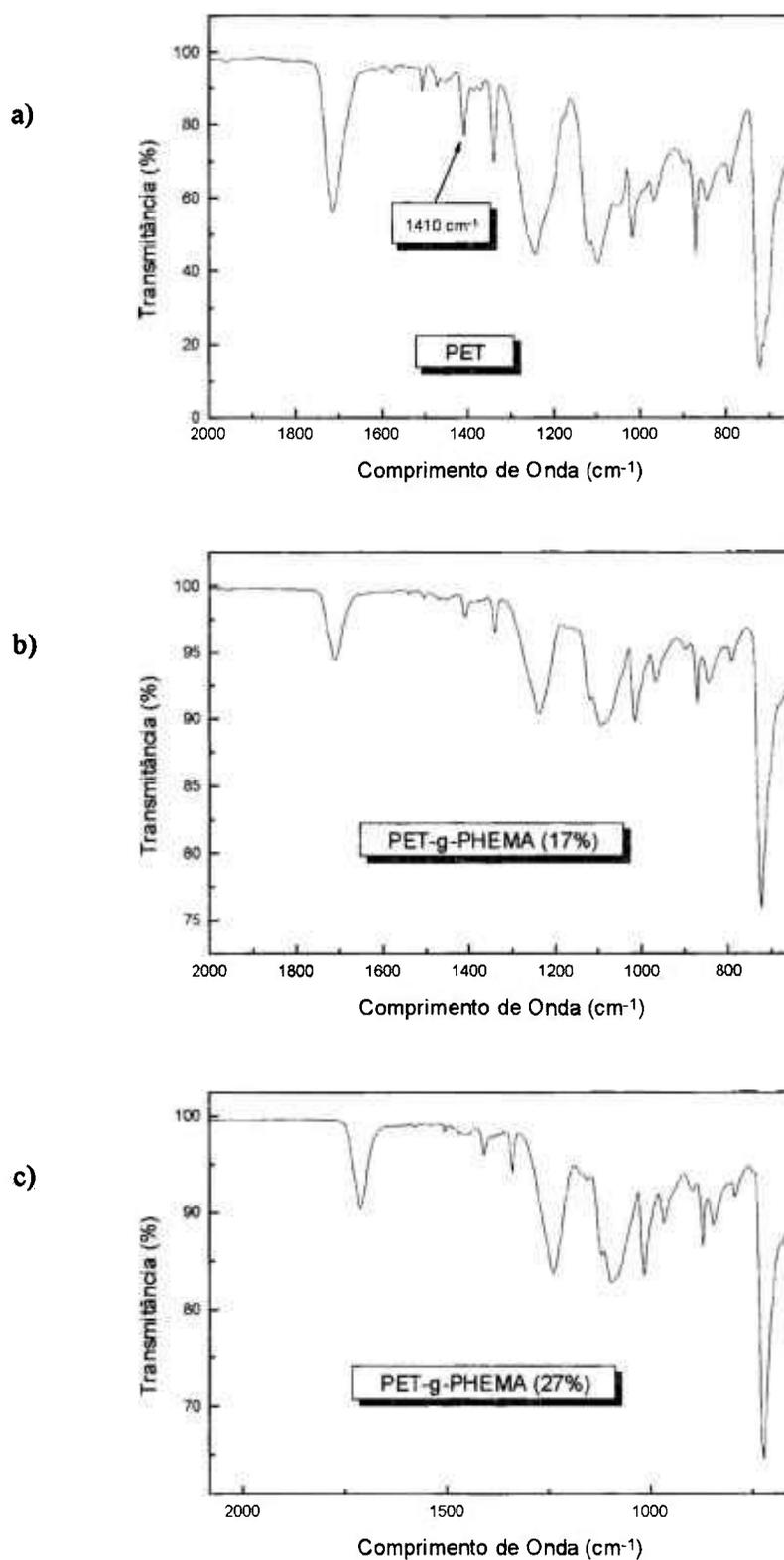


Figura 22. Espectros FTIR-ATR dos filmes de: a) PET, b) PET-g-PHEMA (17%), c) PET-g-PHEMA (27%). As amostras foram irradiadas na presença de CH_2Cl_2 , sob vácuo, com dose de 20 kGy a uma taxa de 3,6 kGy/h.

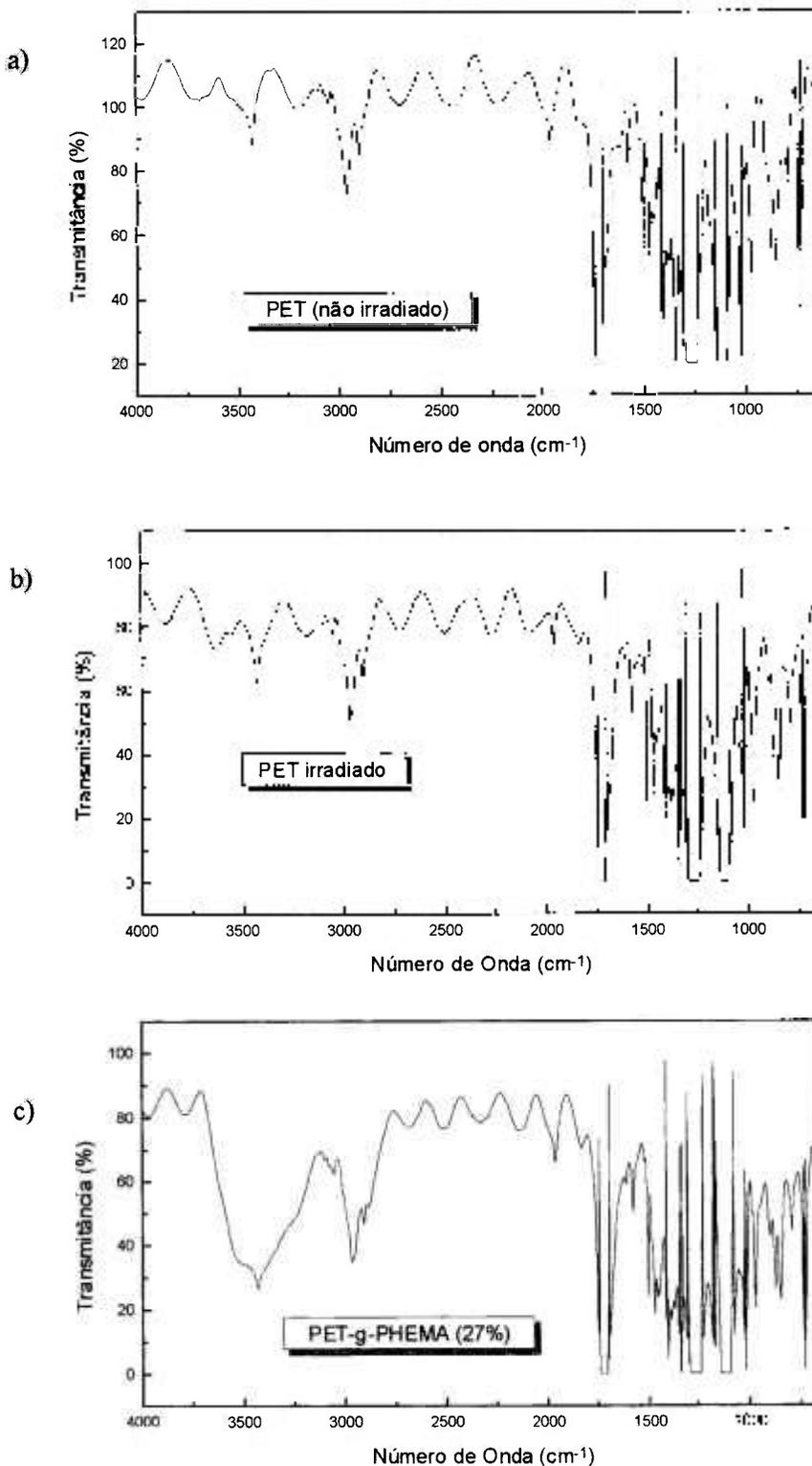


Figura 23. Espectros FTIR dos filmes de: a) PET, b) PET irradiado e c) PET-g-PHEMA (27%). Condições de irradiação: dose de 20kGy, taxa de dose de 3,6kGy/h. Solvente = CH₂Cl₂.

Também foi comprovado que a banda de OH é realmente proveniente das cadeias de PHEMA uma vez que esta banda está ausente tanto no espectro do filme de PET original quanto no espectro do filme de PET irradiado nas mesmas condições de obtenção do PET-g-PHEMA (27%). O mesmo foi observado por XUE e WILKIE (1995) após a modificação de filmes de PET com ácido metacrílico.

4.2.2 - HIDROFILICIDADE DOS COPOLÍMEROS

A copolimerização por enxertia induzida por radiação pode levar a alterações significativas na estrutura polimérica influenciando nas propriedades físico-químicas do polímero modificado. O aumento da hidrofiliabilidade é uma das consequências da enxertia do hidrogel no substrato polimérico. Alguns dos fatores responsáveis pelo intumescimento dos hidrogéis em meio aquoso são a alta flexibilidade da cadeia da macromolécula, baixa densidade de ligações cruzadas, fortes interações com a água e a existência de um potencial osmótico [RATNER, 1989].

As tabelas 16 e 17 mostram o conteúdo de água nos copolímeros de PDMS-g-PHEMA e PET-g-PHEMA após imersão em água a 37°C durante 24 horas. Nota-se que o conteúdo de água aumenta com o percentual de enxertia, evidenciando assim o aumento da hidrofiliabilidade da matriz polimérica após a introdução das cadeias hidrofílicas de PHEMA.

Tabela 16. Percentual do conteúdo de água nas amostras de PDMS-g-PHEMA após 24 hs de imersão a 37°C.

ENXERTIA (%)	INTUMESCIMENTO(%)
0,0	0,3
12,0	5,0
41,0	13,0
54,0	15,0
83,0	20,0

A medida do ângulo de contato das superfícies do filme de PET original e modificado também evidenciou o aumento da hidrofiliabilidade proporcional ao conteúdo de PHEMA na matriz polimérica (tabela 17). Foi observado também que a quantidade de água

presente na matriz intumescida atinge seu máximo ao redor de 9%, apesar dos níveis altos de enxertia. Isto ocorre provavelmente devido ao fato de que as cadeias hidrofílicas do PHEMA estarem presas no interior das cadeias hidrofóbicas do PET. Tal fato também foi observado por XUE e WILKIE (1995) em filmes de PET modificados com poli(ácido metacrílico) (PMMA).

Tabela 17. Medida do percentual do conteúdo de água nas amostras de PET-g-PHEMA após 24 hs de imersão a 37°C e ângulo de contato.

Enxertia (%)	Intumescimento (%)	Ângulo de contato
0	3	71,0 ± 1,9
18	4	65,0 ± 2,5
25	7	57,0 ± 2,5
38	8	53,0 ± 3,5
57	9	55,0 ± 2,0

4.2.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As fotografias das superfícies de PET e derivados obtidas por meio de análise MEV estão ilustradas na figura 24. Até um nível de 57% de enxertia de cadeias de PHEMA, não foi possível visualizar mudanças significativas na superfície do PET. Isto já havia sido notado também nas análises de infravermelho usando-se acessório ATR (figura 22). Estes resultados levam a crer que, devido ao uso de solvente organoclorado e à fina espessura do filme, promoveu-se uma alta difusão das moléculas do HEMA, fazendo com que as cadeias hidrofílicas se mantivessem no interior da matriz de PET.

Por outro lado, nas fotografias das superfícies do PDMS e copolímeros com diferentes percentuais de enxertia (figura 25), observa-se que inicialmente há uma deposição do enxerto formando uma superfície irregular e saliente que aumenta com o nível de enxertia de até 38%. A percentuais mais elevados (83%) a deposição maior torna a superfície do copolímero mais uniforme e plana. Foi concluído que a irregularidade da superfície depende muito das condições de irradiação empregadas na obtenção dos copolímeros de enxerto. O emprego de taxas de dose mais baixas promove a enxertia das macrocadeias hidrofílicas no interior da matriz hidrofóbica, pois o tempo de difusão mais longo permite maior penetração das moléculas do monômero na matriz polimérica. Sendo assim, taxas de dose mais altas promoveriam uma maior concentração de cadeias do homopolímero na superfície do substrato polimérico. Isto foi comprovado por meio da

fotografia da superfície de PDMS com 12% de enxertia obtida numa taxa de dose mais elevada. Apesar do baixo percentual de enxertia, esta é a mais rugosa dentre as superfícies analisadas, todas com percentuais de enxertia mais elevados.

4.2.4 - MICROSCOPIA ÓPTICA

Por meio da análise por microscopia óptica de amostras de PDMS e PDMS-g-PHEMA intumescidas em solução aquosa do corante fucsina (0,5%) foi possível visualizar a forma com que as cadeias hidrofílicas se distribuem na matriz polimérica hidrofóbica. Segundo LORA e col. (1994), este corante é absorvido somente pela região hidrofílica da matriz, o que possibilita uma visualização acerca da localização das cadeias do monômero na matriz polimérica. As fotografias da figura 26 mostram que o corante é absorvido apenas pela região hidrofílica; o PDMS hidrofóbico não adquiriu coloração. Este resultado reforça a conclusão de que as cadeias do monômero se distribuem na matriz polimérica de acordo com as condições de irradiação empregadas. Empregando-se taxas de dose mais elevadas, a camada hidrofílica permanece na superfície da matriz.

4.2.5 - PROPRIEDADES MECÂNICAS

O módulo de Young (E) é a razão entre a tensão aplicada ao material e a deformação sofrida pelo mesmo. O valor de E de um polímero varia em função de forças intermoleculares, grupos endurecedores (tais como carga de reforço) e aditivos, e aumenta com a densidade de reticulação. Quanto maior o valor de E , maior a resistência do material para ser alongado [MANO, 1991].

A tabela 18 ilustra os valores de E das amostras de PET irradiado e PET-g-PHEMA com diferentes percentuais de enxertia. O que se observa nos dados desta tabela é que a baixos níveis de enxertia a introdução de cadeias de T_g (temperatura de transição vítrea) mais elevada causa um aumento no valor de E . A T_g do PHEMA é de aproximadamente 330°C, ao passo que a T_g do PET é de apenas 70°C [BRANDRUP, 1989]. Porém, aumentando-se a quantidade de cadeias de monômero enxertadas promove-se uma diminuição de E , o que provavelmente é decorrente da destruição do retículo cristalino da matriz de PET.

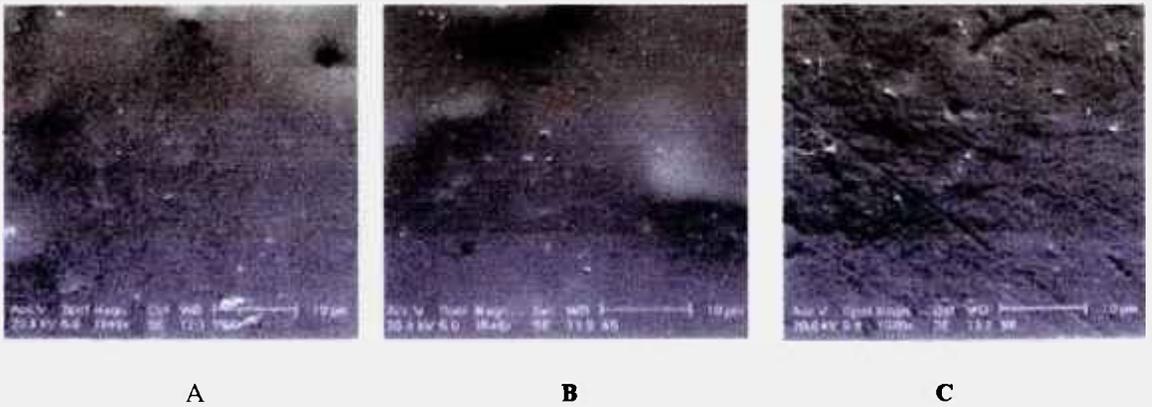


Figura 24. a) PET original; b) PET-g-PHEMA (25%) (dose = 18 kGy, t.dose = 732Gy/h); c) PET-g-PHEMA (57%) (dose = 40 kGy, t.dose = 3,66kGy/h). Aumento de 1640x, escala de 10µm.

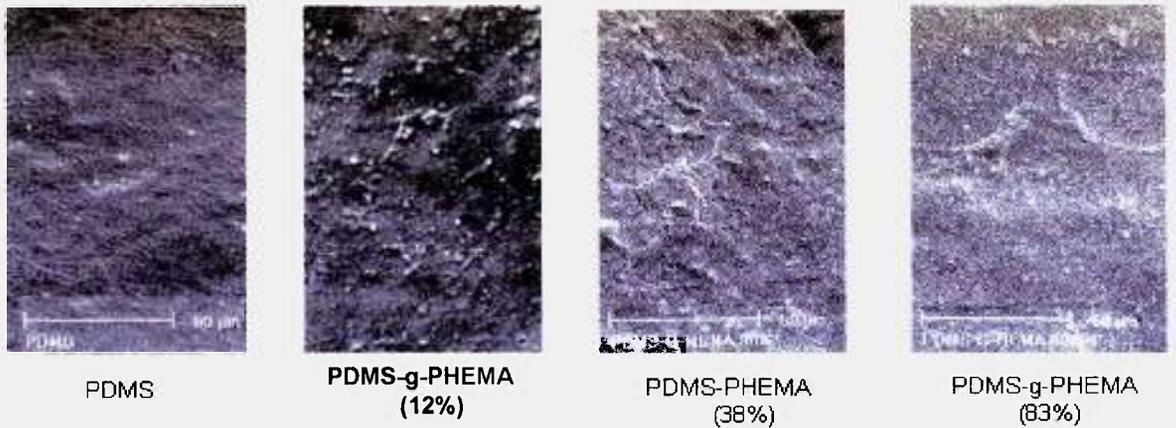


Figura 25. PDMS; PDMS-g-PHEMA 12% (dose = 5,5kGy, t.dose = 324 Gy/h, [HEMA] = 10%), PDMS-g-PHEMA 38% (dose = 5,5kGy, t.dose = 148 Gy/h, [HEMA] = 20%), PDMS-g-PHEMA 83% (dose = 10kGy, t.dose = 79 Gy/h, [HEMA] = 30%). Aumento de 400 x, escala de 50µm.

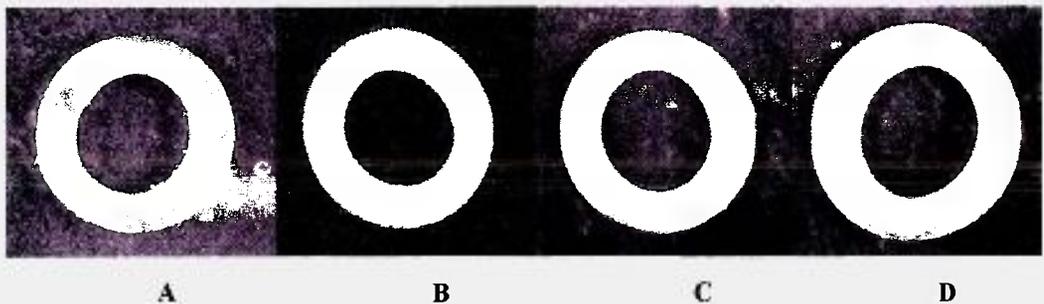


Figura 26. Fotografias de microscopia óptica de amostras cortadas transversalmente: a) PDMS não modificado; copolímeros de PDMS-g-PHEMA: b) enxertia = 15,5% (TD = 331 Gy/h, [HEMA] = 10%); c) enxertia = 24% (TD = 79 Gy/h, [HEMA] = 10%); d) enxertia = 41% (TD = 331 Gy/h, [HEMA] = 20%).

Tabela 18. Módulo de Young dos filmes de PET e PET-g-PHEMA

Amostra	M. Young (MPa)
PET irradiado*	1185 ± 114
PET-g-PHEMA (17%)*	1328 ± 139
PET-g-PHEMA (27%)*	942 ± 147

* Irradiação: dose de 20kGy a uma taxa de dose de 3,6kGy/h. Meio = CH₂Cl₂.

Os valores de E das amostras de PDMS e PDMS-g-PHEMA descritos na tabela 19 foram obtidos por análise dinâmico-mecânica (DMA), a uma temperatura de 37°C e frequência de 1Hz. Observa-se que o módulo do PDMS não varia quando irradiado com uma dose de 1kGy a diferentes taxas de dose. Observou-se também que E é proporcional ao percentual de enxertia dos copolímeros obtidos nas mesmas condições de irradiação. O aumento de E pode ser resultante da introdução de macrocadeias de T_g elevada na matriz elastomérica de PDMS, cuja T_g é de apenas -123°C [BRANDRUP, 1989].

Tabela 19. Variação de E das amostras de PDMS e PDMS-g-PHEMA obtido por DMA

Amostra	Condição	E (MPa)
PDMS	Não irradiado	9,0
PDMS	Irradiado: 1 kGy, 71 Gy/h	9,0
PDMS	Irradiado: 1 kGy, 331 Gy/h	9,2
PDMS-g-PHEMA (22%)	1 kGy, 79 Gy/h, [HEMA] = 10% (v/v)	26,4
PDMS-g-PHEMA (68%)	1 kGy, 79 Gy/h, [HEMA] = 30% (v/v)	204,0

4.3 - AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE

A biocompatibilidade das amostras foi avaliada por testes *in vitro* de hemocompatibilidade e citotoxicidade, baseados nas normas da ISO 10.993, partes 4 e 5, respectivamente.

4.3.1 - TESTES DE HEMOCOMPATIBILIDADE

A hemocompatibilidade pode ser definida como a propriedade de um material ou artefato médico que possibilita o seu uso em contato com o sangue, sem que este sofra reações adversas devido à presença da superfície estranha [HANSON e RATNER, 1996].

Nos testes descritos a seguir, foram utilizados sangue humano (adesão plaquetária) e sangue de coelho (ação hemolítica em sangue total e cinética de coagulação). A química do sangue de cada espécie animal difere, podendo variar particularmente com respeito à concentração e função de proteínas e células sanguíneas, as quais participam nos processos de coagulação, trombose e fibrinólise. O tamanho dos elementos sanguíneos formados pode também diferir [MCINTIRE e col. apud HANSON e RATNER, 1996]. Apesar destas limitações, testes com animais têm auxiliado muito na definição de mecanismos de interações entre sangue e material e formação de trombos. Ou seja, embora os resultados de testes com animais podem não ser resultados preditivos para a espécie humana sob o ponto de vista quantitativo, em muitos casos podem ser considerados qualitativamente próximos [HANSON e RATNER, 1996].

4.3.1.1 - Imobilização da Albumina Humana (HA)

O primeiro fenômeno que ocorre quando o substrato polimérico entra em contato com o sangue é a rápida adsorção de proteínas formando assim uma capa proteica na superfície do material; as células são incapazes de reconhecer a superfície do polímero sintético porém, são capazes de reconhecer proteínas [RATNER, 1989]. Esta capa proteica modifica a superfície do material e determina as interações posteriores que se produzem no sistema sangue-superfície sintética, dando lugar a um material trombogênico ou não. Enzimas fibrinolíticas como a uroquinase podem ser imobilizadas sobre superfícies poliméricas para a obtenção de superfícies hemocompatíveis [RATNER, 1989]. No entanto, esta metodologia é bastante limitada devido ao alto custo das enzimas isoladas.

De acordo com BRASH (1983) e IKADA e col. (1981), as superfícies recobertas por albumina têm um efeito inibidor da adesão plaquetária e são tromborresistentes, ao

contrário daquelas recobertas por fibrinogênio ou γ -globulina que apresentam efeito oposto. Isto provavelmente ocorre devido ao fato de que a adesão plaquetária se produz por meio de uma reação entre alguma enzima das plaquetas e resíduos tipo sacarídeo da proteína adsorvida. Tais resíduos estão ausentes na albumina. Para este trabalho foi escolhida a albumina humana (HA) que por ser homogêneo tem uma menor probabilidade de causar respostas imunes adversas no organismo humano.

A imobilização da HA foi realizada como no procedimento descrito por BEDDOWS e GUTHRIE (1988). Superfícies poliméricas de PET e PDMS modificadas com PHEMA foram tratadas com NaOH, o que possibilitou a transformação das cadeias de PHEMA no correspondente poli(ácido metacrílico). Segundo os referidos autores, a proteína reage com estes grupamentos carboxílicos gerados então na superfície da matriz polimérica, conforme ilustra a figura 27.

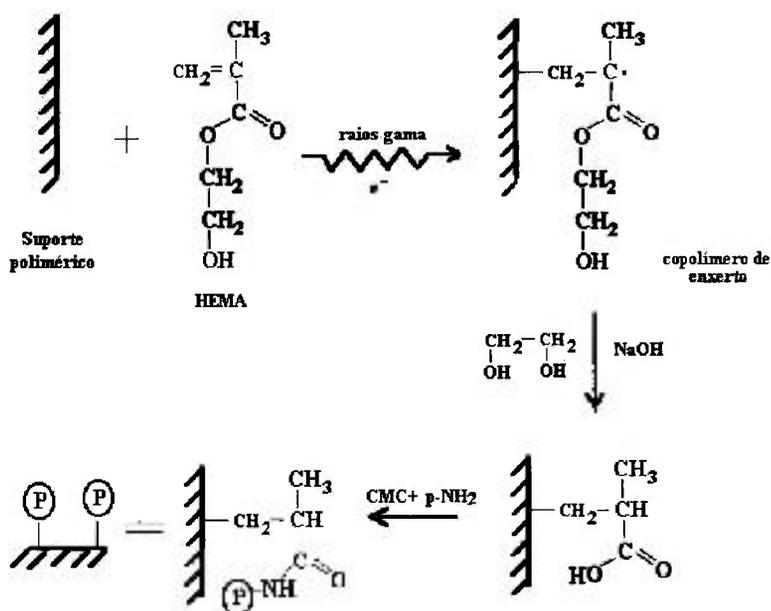


Figura 27. Imobilização da HA nas superfícies poliméricas modificadas com PHEMA.

As matrizes de PET modificadas com PHEMA não resistiram ao tratamento com NaOH. Isto levantou a suspeita de que as condições experimentais escolhidas para a modificação destes filmes de PET com PHEMA possam ter gerado não um copolímero de enxerto, mas sim uma estrutura de rede interpenetrante entre os dois polímeros ou mesmo uma blenda polimérica. O mesmo foi concluído por XUE e WILKIE (1995) que estudaram a modificação (via método químico) de filmes de PET com poli(ácido metacrílico) (PMMA). Os autores ao tratarem os filmes de PET modificados com PMMA concluíram que foram obtidas blendas e não copolímeros de enxerto, uma vez que estas superfícies se dissolveram ao entrar em contato com NaOH.

Foram realizados espectros de FTIR (pastilha de KBr) dos resíduos obtidos após tratamento com NaOH visando a confirmação da obtenção da blenda, porém, nada foi concluído a partir dos espectros obtidos.

A dosagem de HA imobilizada nas superfícies de PDMS modificadas com PHEMA foi avaliada segundo o método de BRADFORD (1976). A curva padrão utilizada na quantificação da HA imobilizada encontra-se ilustrada na figura 28.

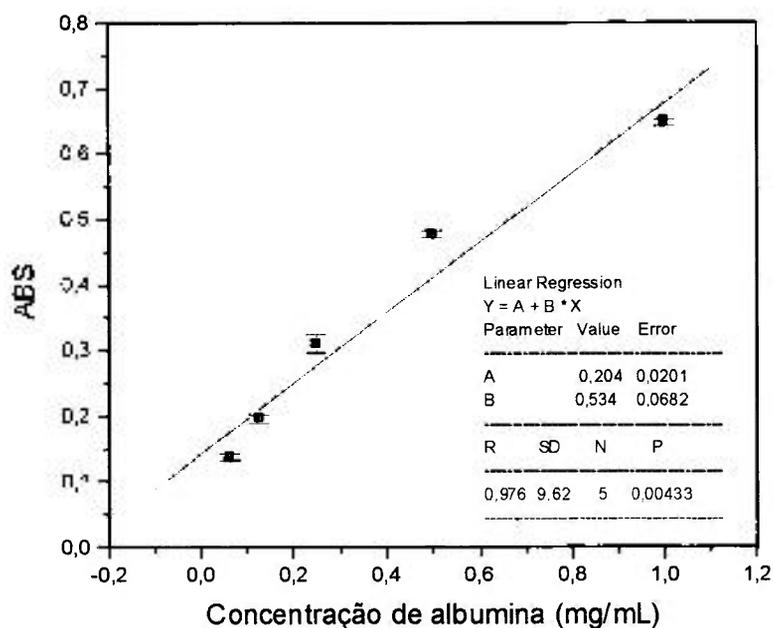


Figura 28. Curva padrão da HA

A quantidade de HA consumida no meio após contato com a superfície polimérica foi calculada segundo a equação 20 fornecida pela regressão da curva da figura 28, na qual Abs é o valor da absorbância lida e $[HA]_f$ é a concentração final da HA presente na solução após contato com a superfície polimérica.

$$(Abs) = 0,204 + 0,520x[HA]_f \quad \text{Equação 20}$$

As leituras da absorbância das soluções foram realizadas em duplicata. Os dados obtidos encontram-se descritos na tabela 20. Foi observado que após 20 horas de reação a uma temperatura de cerca de 4°C foram imobilizadas cerca de 0,35mg de HA/mg de copolímero independentemente do percentual de enxertia (12 a 83%). A isto foi associado o fato de que somente os grupos carboxílicos presentes na superfície do copolímero participam efetivamente na imobilização proteica.

Tabela 20. Quantidade de HA imobilizada nas superfícies de PDMS modificadas com PHEMA após 20 horas de contato.

Amostra	ABS (20 h reação)	$[HA]_i$ (mg/mL)	$[HA]_f$ (mg/mL)	HA _{imobilizada} (mg/mg copolímero)
PDMS-g-PHEMA (12%)	0,641 ± 0,017	4,19	0,45	0,38
PDMS-g-PHEMA (41%)	0,666 ± 0,007	4,00	0,48	0,35
PDMS-g-PHEMA (54%)	0,654 ± 0,016	3,97	0,47	0,35
PDMS-g-PHEMA (83%)	0,678 ± 0,005	4,02	0,51	0,35

4.3.1.2 - Ação Hemolítica em Sangue Total

Como já dito no início deste trabalho (item 2.5.2), o teste de hemólise determina o grau de lise das células vermelhas (eritrócitos) do sangue. O principal efeito resultante da interação do material com as células vermelhas é o envelhecimento acelerado ou destruição mecânica prematura destas células, culminando finalmente na liberação da hemoglobina [WILLIAMS, 1987].

De acordo com NAKAMURA (1993), um material só é considerado hemolítico se o índice de hemólise for superior a 2%. Os resultados obtidos no ensaio para determinação da atividade hemolítica das superfícies poliméricas estão descritos na tabela 21. De acordo com os dados obtidos, nenhuma das superfícies avaliadas apresentam atividade hemolítica, uma vez que a percentagem de hemólise foi inferior a 2%.

Tabela 21. Hemólise das matrizes poliméricas.

MATERIAL	% HEMÓLISE
PET	0,77 ± 0,31
PET-g-PHEMA (16%)	0,63 ± 0,19
PET-g-PHEMA (38%)	0,58 ± 0,12
PDMS	1,24 ± 0,16
PDMS-g-PHEMA (22%)	0,60 ± 0,08
PDMS-g-PHEMA (54%)	0,52 ± 0,04
PDMS-g-PHEMA-i-HA (22%)	0,00 ± 0,15

Embora um material não apresente atividade hemolítica, isto não implica que o mesmo seja tromborresistente, pois somente as plaquetas desempenham papel importante no processo de coagulação sanguínea [BEUGELING, 1979; RATNER, 1989].

4.3.1.3 - Adesão plaquetária

O sangue é uma suspensão de células e entre elas estão eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Dentre estes elementos celulares, as plaquetas são as únicas que possuem um papel importante no processo de coagulação, pois em seu interior encontram-se grânulos cujo conteúdo são substâncias de grande importância no mecanismo de coagulação.

Como já dito, PHEMA é conhecido como um hidrogel que apresenta alta hidrofiliabilidade, o que lhe acarreta boas propriedades biocompatíveis [HISUE e col., 1994]. De acordo com HOFFMAN e col. (1977), o PHEMA pode ser considerado como um material relativamente não trombogênico ou não trombo-aderente. WILLIAMS (1987) explica que material antitrombogênico é aquele que controla de alguma forma o mecanismo da cascata de coagulação, evitando assim a formação de trombos. Já o material não trombogênico é aquele cuja superfície é inerte frente ao contato com o sangue, não desencadeando o mecanismo de formação de trombos na interface sangue-superfície estranha.

Segundo RATNER (1981), a baixa adesão de proteínas e células nos hidrogéis está correlacionada possivelmente com a sua baixa energia livre interfacial. Isto foi observado em testes *in vivo*, onde os trombos sangüíneos acumulados não aderiram firmemente à superfície hidrofílica do hidrogel, e com a própria dinâmica do fluxo sangüíneo foram em seguida liberados e a superfície do material restaurada.

Sabe-se que o primeiro fenômeno que ocorre quando um material sintético entra em contato com o sangue é a adsorção quase instantânea de proteínas do plasma (albumina, γ -globulina e fibrinogênio) na superfície do material. Esta capa proteica modifica a superfície do material e determina as interações posteriores que se produzem no sistema sangue-superfície sintética, dando lugar a um material trombogênico ou não [RATNER, 1989]. A tendência de adesão das plaquetas é determinada pela natureza da capa proteica.

Polímeros que adsorvem preferencialmente albumina mais do que outras proteínas plasmáticas tendem a ser menos trombogênicos, ou seja, possuem menor tendência a produzir coágulos sangüíneos [WILLIAMS, 1987 e BRASH, 1983]. Este comportamento deve-se ao fato de que interações entre os grupos sacarídeos terminais presentes na membrana glucoproteica da plaqueta com as proteínas plasmáticas são as responsáveis pela ativação plaquetária. Uma vez que a albumina não contém galactose, isto evidenciaria a falta de afinidade da plaqueta por superfícies recobertas por albumina [LEE e KIM apud WILLIAMS, 1987]. Neste mesmo estudo foi observado também que não basta somente recobrir a superfície com albumina: esta deve estar firmemente ligada à superfície do material com uma configuração que impossibilite a reação desta com a membrana plaquetária.

As micrografias de MEV das superfícies de PET e PET-g-PHEMA com diferentes percentuais de enxertia encontram-se ilustradas na figura 29. A análise destas micrografias permite concluir que houve uma melhoria da hemocompatibilidade da superfície de PET graças a presença das cadeias de PHEMA, uma vez que o número de plaquetas aderidas à superfície original é maior que o da superfície modificada. A tabela 22 traz o número de plaquetas aderidas em cada superfície polimérica. Vale ressaltar que cada superfície foi fotografada em pelo menos quatro diferentes pontos.

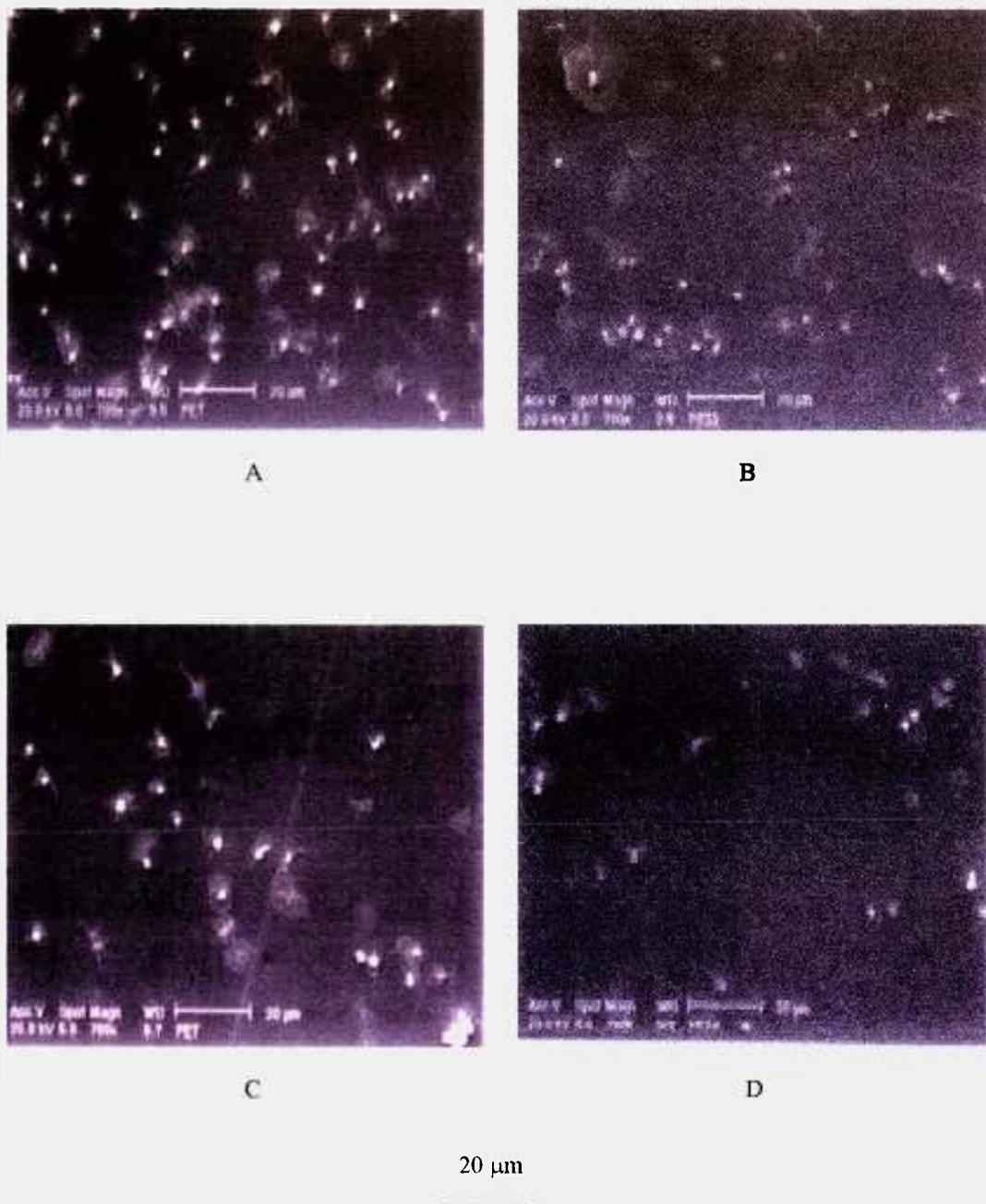


Figura 29. Micrografia no MEV das superfícies de: A) PET, B) PET-g-PHEMA (21%), C) PET-g-PHEMA (38%), D) PET-g-PHEMA (55%) – após ensaio de adesão de plaquetas. Aumento: 700x, escala de 20µm.

Tabela 22. Quantidade de plaquetas aderidas às superfícies de PET original e modificadas e seus respectivos desvios padrão.

Amostra	Plaquetas \pm desvio padrão
PET	78 \pm 5
PET-g-PHEMA (21%)	73 \pm 18
PET-g-PHEMA (15%)	84 \pm 8
PET-g-PHEMA (25%)	31 \pm 8
PET-g-PHEMA (38%)	29 \pm 6
PET-g-PHEMA (56%)	22 \pm 2

A figura 30 ilustra as micrografias das superfícies de PDMS original e modificadas pela enxertia do PHEMA, inclusive as imobilizadas com HA. A irregularidade das superfícies dificultou a identificação das plaquetas, uma vez que estas são muito pequenas quando comparadas às irregularidades que as superfícies apresentam. Frente a este fato, tornou-se muito difícil comprovar a melhoria da hemocompatibilidade da superfície após modificação com HEMA. Entretanto, nas superfícies de PDMS modificadas com PHEMA e passivadas com HA nota-se claramente o menor número de plaquetas aderidas comparativamente ao da superfície de PDMS original.

A literatura apresenta trabalhos que envolvem o estudo da melhoria da propriedade hemocompatível da superfície de PDMS por meio da modificação com HEMA utilizando-se diferentes técnicas. RATNER e col. (1975) observaram que a enxertia do PHEMA na superfície de PDMS via radiação ionizante, utilizando-se uma dose máxima de radiação de 2,5 kGy, diminuiu a adesão celular nesta superfície. Foi concluído também que esta redução foi maior após recobrir a superfície do copolímero com albumina. KHORASANI (1999) observou melhoria da hemocompatibilidade do PDMS após modificação com HEMA via laser, uma vez que houve significativa redução do número de plaquetas aderidas à superfície do material. Porém, por meio das fotografias destas superfícies obtidas por MEV, a redução do número de plaquetas nas superfícies de PDMS modificadas com PHEMA não é evidenciada. A hemocompatibilidade das superfícies destes copolímeros foi comprovada por meio da contagem de plaquetas marcadas com $^{51}\text{CrO}_4$ aderidas à superfície [TAMADA e col., 1995].

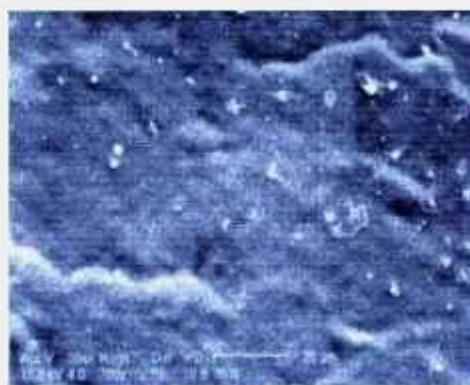
Portanto, fotografias obtidas por meio de MEV talvez não seja a melhor maneira de avaliar as plaquetas aderidas em superfícies que sejam muito irregulares.



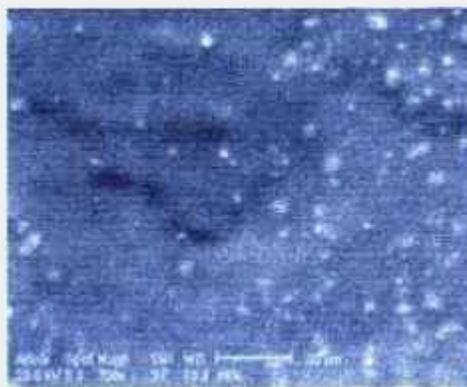
PDMS



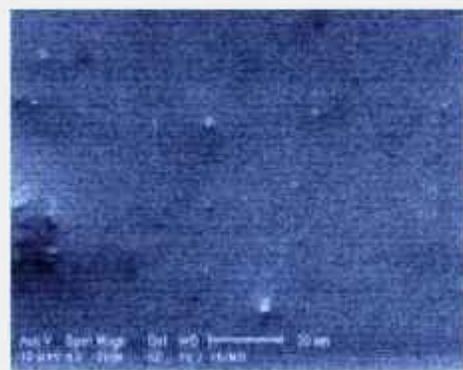
PDMS-g-PHEMA (12%)



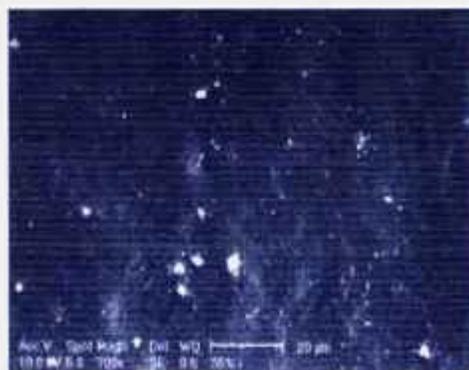
PDMS-g-PHEMA 40%



PDMS-g-PHEMA 60%



PDMS-g-PHEMA-i-HA (12%)



PDMS-g-PHEMA-i-HA (35%)

20 μ m

Figura 30. Micrografia no MEV das superfícies de PDMS original, PDMS modificado com PHEMA e PDMS modificado com PHEMA e imobilizado com HA – após ensaio de adesão de plaquetas. Aumento: 700x, escala de 20 μ m.

Neste trabalho foi utilizado HEMA fornecido pela Aldrich Chemical Company sem prévia purificação. O laudo técnico da fornecedora informa que o monômero utilizado apresenta cerca de 1% de ácido metacrílico. O potencial de adsorção de hidrogéis feitos a partir de HEMA impuro pode causar efeitos indesejáveis quando os materiais são usados como biomateriais em contato com o fluido sangüíneo. De acordo com HORBETT (1986), a presença de ácido metacrílico no HEMA não purificado (com cerca de 0,8% de ácido metacrílico) utilizado para a modificação de tubos de borracha de silicona aumentou a adsorção de fibrinogênio e γ -globulina e diminuiu a adsorção de albumina nesta superfície, evidenciando assim o seu caráter trombogênico. Talvez por este motivo, a propriedade hemocompatível da superfície do PDMS após modificação com HEMA não tenha se alterado significativamente. Somente as superfícies imobilizadas com albumina humana (cerca de 0,35mg/g de copolímero) apresentaram visualmente um número reduzido de plaquetas aderidas, conforme mostrado na figura 30.

4.3.1.4 - Cinética de Coagulação

O tempo necessário para que a superfície do material acione o mecanismo de coagulação sangüínea serve como indicativo da trombogenicidade desta superfície.

A avaliação da cinética de coagulação sangüínea (velocidade de formação de trombos) das superfícies poliméricas, foi realizada segundo o trabalho de HUANG e col. (1998). A tabela 23 e a figura 31 ilustram o perfil da formação de trombos das amostras de PET e PET-g-PHEMA, PDMS e PDMS-g-PHEMA, respectivamente. A absorbância da solução de hemoglobina hemolisada varia com o tempo. Quanto mais alta a absorbância lida, melhor a tromborresistência da superfície. Neste ensaio, o vidro foi utilizado como referência, uma vez que esta superfície é altamente trombogênica.

Os dados da tabela 23 indicam que houve uma melhora da tromborresistência da superfície de PET após sua modificação com HEMA. Estes resultados reafirmam as conclusões já obtidas nos testes de atividade hemolítica e adesão plaquetária.

Tabela 23. Absorbância da solução de hemoglobina hemolisada obtida no ensaio de cinética de coagulação para as superfícies de PET e PET-g-PHEMA.

Amostra	ABS			
	1 minuto	2 minutos	4 minutos	8 minutos
Vidro	0,371 ± 0,006	0,303 ± 0,028	0,293 ± 0,004	0,130 ± 0,016
PET (não modificado)	0,370 ± 0,033	0,357 ± 0,047	0,295 ± 0,115	0,141 ± 0,065
PET-g-PHEMA (12%)	0,418 ± 0,025	0,437 ± 0,022	0,358 ± 0,038	0,141 ± 0,056
PET-g-PHEMA (14%)	0,399 ± 0,029	0,415 ± 0,007	0,396 ± 0,031	0,143 ± 0,004
PET-g-PHEMA (19%)	0,394 ± 0,009	0,377 ± 0,096	0,369 ± 0,005	0,183 ± 0,061
PET-g-PHEMA (19%)	0,406 ± 0,001	0,417 ± 0,033	0,392 ± 0,031	0,202 ± 0,001
PET-g-PHEMA (21%)	0,368 ± 0,033	0,402 ± 0,020	0,487 ± 0,057	0,236 ± 0,088

Os resultados obtidos no teste realizado com superfícies de PDMS e copolímeros de PDMS-g-PHEMA com diferentes níveis de enxertia encontram-se plotados na figura 31. Não foi observada nenhuma diferença significativa nos tempos de formação de trombos nas superfícies do PDMS original, do copolímero PDMS-g-PHEMA e copolímero passivado com albumina. Assim como no teste de adesão plaquetária, os resultados obtidos nesta análise não demonstram uma evidente melhoria do caráter tromborresistente da superfície de PDMS após modificação com HEMA.

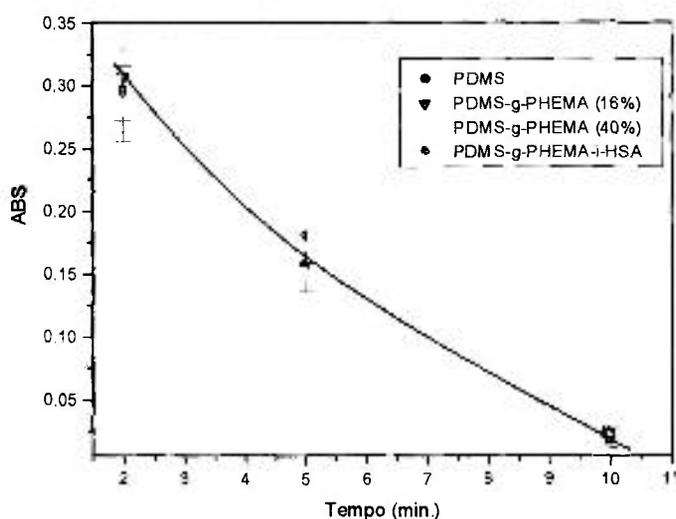


Figura 31. Curva de Cinética de Coagulação.

Contudo, com o aumento da hidrofiliicidade da matriz de PDMS após a introdução das cadeias de PHEMA, esperava-se observar uma melhoria no que diz respeito à tromborresistência do material. O mesmo fato foi observado por OTSUHATA (1985) ao avaliar as propriedades hemocompatíveis das superfícies de copolímeros de PU e borracha natural enxertados com PHEMA. De acordo com o referido autor, o método da enxertia via radiação ionizante de monômeros hidrofílicos em substratos hidrofóbicos pode melhorar a tromborresistência do material polimérico, porém não se pode prever qual o tipo de combinação monômero-substrato que produzirá uma superfície com caráter não trombogênico. Segundo o mesmo autor, além do caráter hidrofílico, outro fato que também deve ser levado em conta na obtenção de superfícies com caráter não trombogênico é a criação de uma superfície difusa após modificação do substrato polimérico com um hidrogel. Hayashi e col. observaram o mesmo fato quando modificaram tubos de borracha de silicóna com diferentes monômeros hidrofílicos via radiação ionizante, obtendo superfícies hidrofílicas porém de caráter trombogênico [HAYASHI apud OTSUHATA, 1985].

Segundo RATNER (1986), esta superfície difusa é caracterizada por uma região da superfície que, quando em contato com o fluido biológico, apresenta alta mobilidade das cadeias poliméricas, o que lhes permite que interajam com os componentes químicos presentes no meio. Porém, a principal propriedade desta região é a diferenciação do arranjo das moléculas de água, diferente de qualquer outro tipo de superfície. A figura 32 ilustra a complexa natureza desta superfície.

O efeito que o substrato causa nas cadeias enxertadas pode servir como um efeito preventivo da formação de superfícies difusas, impedindo assim a obtenção de superfícies hidrofílicas com melhora da hemocompatibilidade [OTSUHATA, 1985].

De acordo com HSIUE (1994), superfícies de PDMS modificadas com PHEMA apresentam ângulo de contato estáveis quando estocadas em água deionizada. Porém, as mesmas superfícies quando estocadas em ar seco apresentam um gradual aumento no ângulo de contato em função do tempo de estocagem, comprometendo assim seu caráter hidrofílico. O fato de se realizar este teste em superfícies estocadas durante alguns meses em dessecador pode também ter interferido de certa forma nos resultados obtidos.

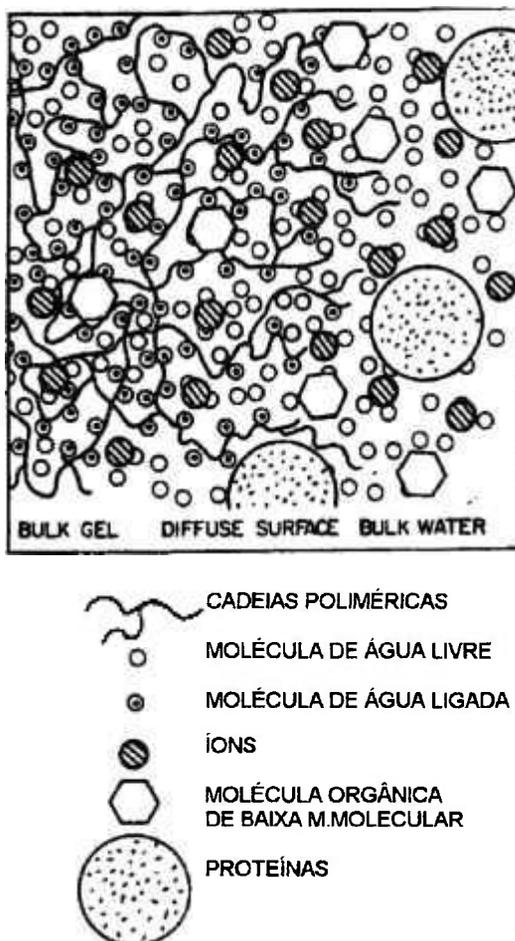


Figura 32. Superfície difusa do hidrogel

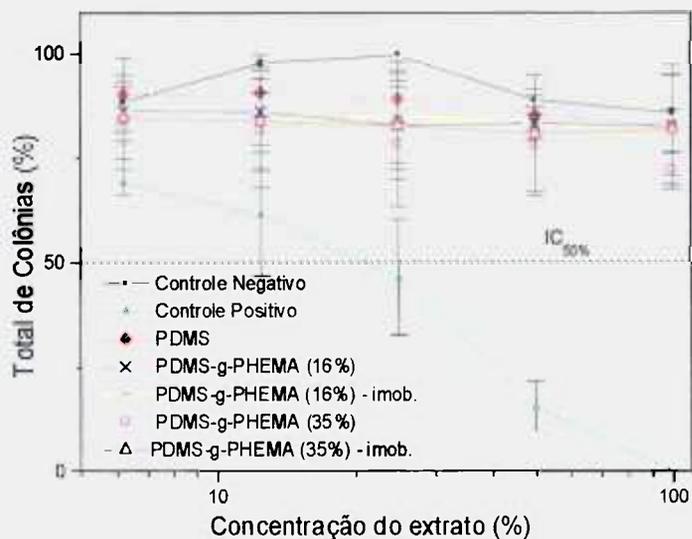
4.3.2 - TESTE DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade de um material é a medida da sua capacidade de causar efeitos tóxicos (morte celular, alterações na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática, etc) a nível celular. É distintamente diferente de fatores físicos que afetam a adesão celular (carga superficial do material, hidrofobicidade, hidroflicidade, etc).

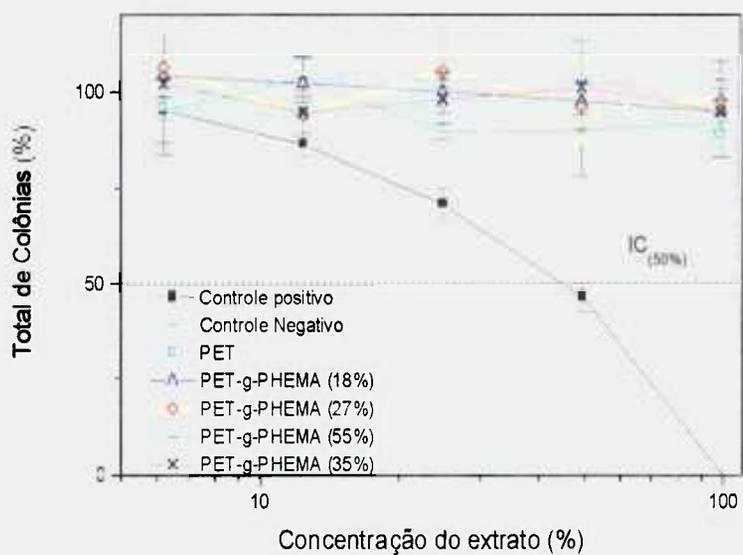
Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são testes preditivos para uma vasta variedade de materiais utilizados na confecção de artefatos médicos (elastômeros, polímeros, cerâmicas, metais, entre outros). Em ensaios de citotoxicidade, controles positivos (tóxicos) e negativos (atóxicos) são incluídos de modo a assegurar a operação e a adequabilidade do sistema de teste [HANSON e RATNER., 1996].

No ensaio de citotoxicidade, a percentagem de colônias de células visíveis nas diferentes concentrações do extrato das matrizes poliméricas encontra-se projetada na figura 33. A concentração de extrato necessária para inibir em 50% a formação das colônias é expressa como *índice de citotoxicidade* ($IC_{50(\%)}$). Nem as amostras de PDMS e PET originais, nem seus copolímeros derivados do PHEMA, foram consideradas citotóxicas, uma vez que o $IC_{50(\%)}$ em todas as concentrações de seus extratos foi maior que 100%.

De acordo com CÍFKOVÁ e col. (1990), borracha de silicone puro e modificada com PHEMA quando implantadas em tecidos de organismos vivos, apresentam biocompatibilidade similar àquela observada em implantes de superfícies de PHEMA puro, tal como o resultado ilustrado na figura 33.



A



B

Figura 33. Curva de citotoxicidade das amostras: a) PDMS e derivados; b) PET e derivados

CAPÍTULO 5



Pierre Renoir

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram concluir que:

1. A quantidade de cadeias de PHEMA nas matrizes modificadas de PDMS e PET depende não somente das condições experimentais da irradiação, como também sofre influência das características inerentes a cada uma das matrizes poliméricas. PDMS, uma matriz elastomérica com baixa T_g ($-120\text{ }^\circ\text{C}$, aproximadamente), incorporou maiores quantidades de cadeias de PHEMA em condições mais amenas (menores dose e taxa de dose de radiação) do que a matriz de PET, de T_g mais elevada ($70\text{ }^\circ\text{C}$, aproximadamente). A influência de cada variável no percentual de cadeias de PHEMA incorporadas em ambas matrizes foi avaliada por meio de planejamentos fatoriais. Esta técnica permitiu não só o estudo simultâneo das variáveis concentração do monômero, dose e taxa de dose de radiação como também possibilitou a redução de ensaios experimentais necessários para a conclusão deste estudo. O planejamento mostrou que no caso da matriz de PDMS, a quantidade de cadeias de PHEMA incorporadas nas condições estudadas depende muito *da taxa de dose de radiação e concentração do monômero*, sendo pouco influenciado pela dose de radiação. A respeito da enxertia na matriz de PET, as condições experimentais escolhidas não permitiram concluir como cada variável atua no processo de modificação desta matriz, uma vez que todas foram consideradas estatisticamente significativas. Foi observado porém, que não há interação entre as variáveis dose e taxa de dose nas condições em que se realizaram os ensaios experimentais, ou seja, estas duas variáveis atuam de forma independente no percentual de cadeias de PHEMA incorporadas à matriz de PET no limite das condições estipuladas.

2. O aumento da hidrofiliabilidade das matrizes de PET e PDMS após modificação com PHEMA deve-se exclusivamente à presença das cadeias deste hidrogel em ambas as matrizes poliméricas citadas. Isto foi comprovado uma vez que não houve alteração no conteúdo de água nas matrizes não modificadas e irradiadas (na ausência de monômero) após cerca de 24 horas de contato.

3. A distribuição das cadeias do PHEMA nas matrizes de PET e PDMS depende das condições experimentais (solvente, dose e taxa de dose) nas quais foram realizadas as irradiações. Notou-se que a utilização de solventes com maior grau de difusão promoveu maior penetração das moléculas do monômero nas matrizes poliméricas, o que em alguns casos resultou em matrizes com alto percentual de PHEMA e baixa hidrofiliçidade. Estas afirmações também foram confirmadas por meio da análise de espectroscopia infravermelho. Espectros de reflexão obtidos utilizando-se o acessório ATR não evidenciaram a presença dos segmentos de PHEMA na superfície do polímero de PET. Somente os espectros de transmissão detectaram a presença dos mesmos no interior da matriz polimérica de PET. No caso da matriz de PDMS a localização das cadeias hidrofílicas do PHEMA foi monitorada por meio de sua coloração com corante fucsina.

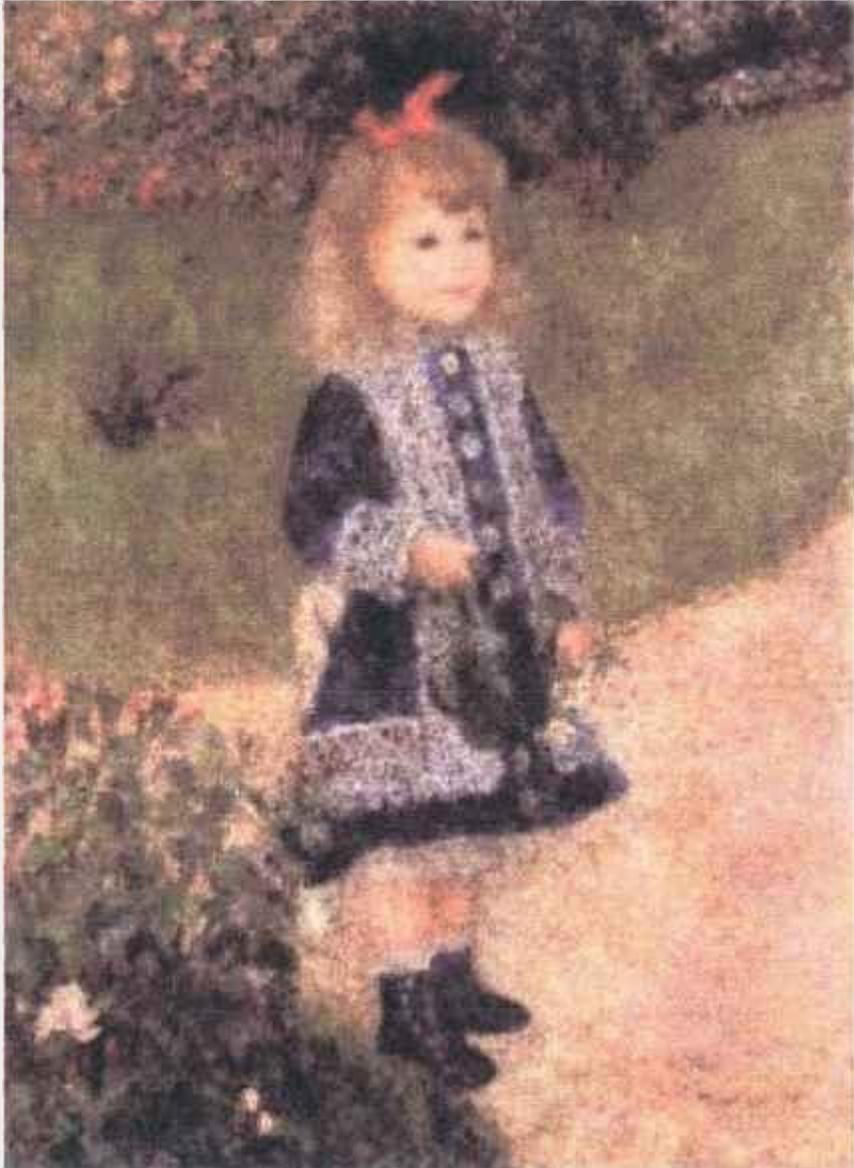
4. Ensaios mecânicos mostraram que a variação do módulo de Young (E) pode estar diretamente relacionada não só à quantidade de cadeias de PHEMA presentes na matriz, como também depende das características físico-químicas da matriz polimérica em questão. Como já dito, a matriz de PDMS apresenta uma T_g de aproximadamente $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que PHEMA apresenta T_g de cerca de $330\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os ensaios demonstraram que quanto maior a quantidade de cadeias de PHEMA presentes na matriz de PDMS, maior o valor de E. Ao contrário, PET, cuja T_g é de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, mostrou que o valor de E diminui quando a quantidade de cadeias de PHEMA se eleva, o que provavelmente é decorrente da destruição do seu retículo cristalino. Em ambas as matrizes não foi notada influência significativa da irradiação no valor de E.

5. O método escolhido para a imobilização da albumina humana só se mostrou apropriado para as superfícies de PDMS modificadas com PHEMA. Matrizes de PET modificadas com PHEMA foram destruídas ao entrar em contato com NaOH, cuja função era a ativação dos grupamentos carboxílicos do PHEMA. A quantidade de albumina humana imobilizada na superfície do PDMS-g-PHEMA mostrou ser independente do percentual de enxertia. Copolímeros com 12 e 83% de enxertia imobilizaram cerca de 0,35mg de albumina por mg de copolímero. Isto se deve ao fato de que somente os grupos carboxílicos presentes na superfície da amostra é que efetivamente participam do processo de imobilização da proteína.

6. A hemocompatibilidade de uma superfície não depende somente da sua hidrofiliicidade ou mesmo do percentual de cadeias de PHEMA presentes nesta superfície, como mostrado nos ensaios realizados. Outros fatores como formação de uma superfície difusa com alto grau de mobilidade das cadeias do hidrogel, assim como a presença de microdomínios hidrofílicos e hidrofóbicos da matriz modificada, devem ser também avaliados. A maneira como a amostra é guardada também pode influenciar diretamente nos resultados. Pelas observações realizadas, o ideal seria testar a superfície logo após a sua obtenção e se isto não for possível, esta deve ser estocada em solução fisiológica. Neste trabalho, estes cuidados não foram devidamente tomados, o que de certa forma, pode ter influenciado muito nos resultados obtidos. Foi observado também que a contagem por meio de fotografias obtidas por MEV das plaquetas aderidas à superfície de PDMS modificado com PHEMA não permitiu avaliar adequadamente a hemocompatibilidade destas superfícies, isto porque as irregularidades presentes nestas superfícies se tornaram mais evidentes do que as próprias plaquetas, dificultando e em alguns casos impossibilitando a sua identificação. Já no caso do filme de PET, a contagem das plaquetas aderidas ocorreu sem maiores problemas e foi possível observar que houve melhoria da propriedade hemocompatível desta matriz após modificação com PHEMA, devido ao baixo número de plaquetas presentes nestas superfícies.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçaram que a obtenção de matrizes poliméricas com propriedades hemocompatíveis não é tão simples como aparenta ser. Nem sempre a combinação de uma matriz biocompatível com um hidrogel também biocompatível resultará em uma superfície com propriedades hemocompatíveis. Seria necessário um estudo pormenorizado acerca das características físico-químicas do material candidato e como estas afetam o sangue e seu mecanismo de coagulação. Na passivação da superfície com albumina, um estudo acerca de como as moléculas de albumina se encontram imobilizadas na superfície do material, elucidaria o seu comportamento, pois dependendo do seu arranjo espacial, a proteína pode aumentar ou diminuir o caráter hemocompatível desta superfície.

CAPÍTULO 6



Pierre Renoir

APÊNDICE

CÁLCULOS UTILIZADOS NO ESTUDO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Uma vez de posse dos resultados experimentais o passo seguinte foi dar entrada destes nos programas estatísticos. Neste apêndice estão ilustrados os cálculos realizados para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados ou regressão linear.

Os valores dos coeficientes para o ajuste linear são obtidos a partir de uma equação matricial

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y$$

X corresponde à matriz completa de coeficientes de contraste, ou seja, os valores das variáveis codificadas: 0, -1 ou +1. A matriz **y** contém os valores das respostas médias obtidas nos experimentos. Esta equação dá a solução geral para o ajuste de um modelo por mínimos quadrados, não importando quantas sejam as observações ou quantos parâmetros sejam necessários para caracterizar o modelo, desde que as matrizes **X** e **y** sejam ampliadas de forma adequada.

Uma vez que os ensaios são realizados em duplicatas e com repetições, é interessante saber se a flutuação das respostas introduz incerteza na determinação dos parâmetros e nas previsões feitas a partir deles. Os desvios dos parâmetros são calculados a partir de outra equação matricial:

$$\hat{V}(b) = (X'X)^{-1} s^2$$

s^2 nada mais é do que o desvio padrão observado para as repetições dos ensaios referentes ao ponto central.

Substituindo-se os dados fornecidos pelos programas, chega-se ao valor dos coeficientes.

$$\hat{V}(b) = \begin{pmatrix} 0,067 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,125 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,083 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,083 \end{pmatrix} \times 3,02 = \begin{pmatrix} 0,201 \\ 0,378 \\ 0,251 \\ 0,251 \end{pmatrix}$$

Elevando-se a matriz resultante a 1/2 obtem-se então os erros padrão dos parâmetros b_0 , b_1 , b_2 e b_3 .

A significância estatística do modelo proposto é analisada segundo os valores de uma série de fatores. A tabela a seguir ilustra resumidamente o cálculo e logo adiante encontra-se uma pequena descrição de cada um destes fatores.

Tabela de análise da variância para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados. n_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = SQ_R / (p - 1)$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = SQ_r / (n - p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i \sum_j (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m - p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n - m)$
Total	$SQ_T = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y})^2$		

% de variância explicada: SQ_R / SQ_T

% máxima de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{ep}) / SQ_T$

$SQ_R \Rightarrow$ representa o afastamento da previsão do modelo para o ponto em questão, \hat{y}_i , em relação à média global, \bar{y} .

$SQ_T \Rightarrow$ representa a diferença entre o valor observado, y_i , e o valor previsto, \hat{y}_i . Num modelo bem ajustado essa diferença deve ser pequena, o que significa dizer que as previsões estão em boa concordância com as observações.

$SQ_T \Rightarrow$ soma quadrática total: uma parte da variação total das observações y_i em torno da média é descrita pela equação de regressão, e o restante fica por conta dos resíduos. Quanto maior for a fração descrita pela regressão, SQ_R / SQ_T , melhor é o ajuste do modelo.

$SQ_{ep} \Rightarrow$ reflete a dispersão das respostas repetidas ao redor de suas médias em cada nível; exprime uma medida do erro aleatório afetando as respostas e independe do modelo.

$SQ_{faj} \Rightarrow$ depende do modelo e será tanto maior quanto mais as estimativas para um dado nível, \hat{y}_i , se afastarem do valor médio das respostas determinadas nesse nível, \bar{y}_i . Este termo fornece, portanto, uma medida da falta de ajuste do modelo.

$MQ_R / MQ_T \Rightarrow$ usado para verificar se o modelo proposto é adequado comparando-se o valor calculado com o teste $F_{1, n-2}$. Para que o modelo tenha significância estatística, o valor da razão deve ser maior que o valor tabelado para $F_{1, n-2}$.

$M_{ep} \Rightarrow$ independe do modelo; é uma estimativa da variância σ^2 postulada para as observações, esteja o modelo bem ajustado ou não.

$MQ_{faj} \Rightarrow$ estima σ^2 se o modelo estiver bem ajustado, se isso não ocorrer o seu valor estima σ^2 mais a contribuição da falta de ajuste. Um teste F da razão MQ_{faj} / M_{ep} serve para avaliar se o modelo está ou não bem ajustado às observações \Rightarrow altos valores indicam muita falta de ajuste.

CAPÍTULO 7



Van Gogh

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- ANELLI, P., BACCARO, S.; CARENZA, M.; PALMA, G. Radiation grafting of hydrophilic monomer onto ethylene-propylene rubber. *Radiat. Phys. Chem.* **46**, p. 1030, 1995.
- ARRANZ, F.; CHAVES, M.S. Hemocompatibilidad de polímeros. *Revista de plásticos modernos*, p.3-10, 1989.
- BAXLEY, RV; MILLER, R.W. Effects of suessen heat setting variables on streaks in finished nylon carpet. *Text. Res. J.*, **61** (12), p. 697 – 704, 1991.
- BEDOWS, C.G.; GUTHRIE, J.T. The immobilization of enzymes onto hydrolyzed polyethylene-g-co-2-HEMA. *J. Appl. Polym. Sci.*, **35**, p. 135-144, 1988.
- BEUGELING, T. The interaction of polymer surfaces with blood. *J. Polym. Symposium*, **66**, p. 419-428, 1979.
- BOX, G.E.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by na approximate response function. University of Wisconsin Technical Report. 9, 1973 apud NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: UNICAMP, 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the particle of Protein-Dyue binding. *Anal. Biochem.*, **72**, p. 248-54, 1976.
- BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H. In: Polymer Handbook, Wiley Interscience, (3rd ed.), VII/519 – 557, 1989.
- BRASH, J.L. In: SZYCHER, M. (Ed.). *Biocompatible polymers, metals and composites*. USA.: Technomic Publishing, 1983. p. 35.
- BUCHENŃSKA, J. Modification of polyester fibers by grafting with poly (acrylic acid). *J. Appl. Polym. Sci.*, **65**, p. 967-977, 1997.
- CAMPOS, V. E.; ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; GUEDES, S. M. L.. Proceedings of the 5th. Latin American and 3rd. Ibero American Polymer Symposium, Mar del Plata, Argentina, p. 289-299, December, 1996.
- CARENZA, M. Recent Achievements in the use of radiation polymerization and grafting for medical applications. *Radiat. Phys. Chem.*, **39** (6), p.485-493, 1992.
- CHAPIRO, A. Radiation chemistry of polymeric systems. In: MARK, H. and MARVELL, C.S. (Eds.). *High Polymers*. New York, N.Y.: Interscience, 1962, p. 596 – 691.
- CHAPIRO, A. Radiation induced copolymerization. *Radiat. Phys. Chem.*, **14**, p.101-116, 1979.

- CHAPIRO, A.; DOMURADO, D.; FOËX-MILLEQUANT, M.; JENDRYCHOWSKA-BONAMOUR, A.M. Radiation grafting of N-vinylpyrrolidone into silicone tubes – synthesis of polymers with improved hemocompatibility and implantation tests in lambs. *Radiat. Phys. Chem.*, **18** (6-6), p.1203 – 1206, 1981.
- CHAPIRO, A. Radiation Chemistry in the field of biomaterials. *Radiat. Phys. Chem.*, **46** (2), p.159-160, 1995.
- CHEN, W.; LOFGREN, E.A.; JABARIN, S.A. Microstructure of amorphous and crystalline poly(terephthalate). *J. Appl. Polym. Sci.*, **70**, p. 1965-1976, 1998.
- CÍFKOVÁ, I.; LOPOUR, P.; VONDRÁČEK, P.; JELÍNEK, F. Silicone rubber-hydrogel composites as polymeric biomaterials. I – Biological properties of the silicone rubber-p(HEMA) composite. *Biomaterials*, **11**, p. 393-396, 1990.
- COOKE, F.W.; LEMONS, J.E.; RATNER, B.D. Properties of materials. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SHOEM, F.J. and LEMONS, J.E. (Eds.). *Biomaterials science – an introduction to materials medicine*. USA: Academic, 1996. p. 11.
- DUDLEY, B.; WILLIAMS, J.L.; ABLE, K.; MULLER, B. Synthesis and characterization of blood compatible surfaces. I. Dynamic tube test applied to heparanized surfaces. *Trans. Am. Soc. Artif. Organs*, **22**, pg. 538-544, 1976.
- DURO, R.; VAZQUEZ, M.J.; MARTINEZPACHECO, R.; GOMEZAMOZA, J.L.; CONCHEIRO, A.; SOUTO, C. Stabilization of mebendazole suspensions with cellulose ethers. *Pharmazie*, **48** (8), p. 602 – 605, 1993.
- DYBEK, K.; KUBIS, A.; ROSIAK, J. Studies on dressings for dental surgery use. Part 3. Effect of gamma radiation and of formaldehyde on properties of gelatinous dental dressings. *Pharmazie*, **47**, p.273. 1992.
- ELLEERBE, D.M.; FRODEL, J.L. Comparison of implant materials used in maxillofacial rigid internal-fixation. *Otolaryngologic Clinics of North America*, **28**(2), p. 365 – 72, 1995.
- ENGBERG, K.; KNUTSSON, A.; WERNER, P.E.; GEDDE, U.W. Knit line fractures in injection molded liquid-crystalline polymers. *Polym. Eng. Sci.*, **30** (24), p. 1620 – 1627, 1990.
- FLYNN, J.H. In: KROSCWITZ, J.I. (Ed.). *Concise: Encyclopedia of polymer science and engineering*. USA: John Wiley & Sons, 1990. p.1182 – 1185.
- GARGAN, K.; KRONFLI, E.; LOVELL, K.V. Pre-irradiation grafting of hydrophilic monomers onto PE - I. The influence of homopolymerisation inhibitors. *Rad. Phys. Chem.*, **36**:6, p. 757-761, 1990.
- GARNETT, J.L. Grafting. *Rad. Phys. Chem.* **14**, p. 79-99, 1979.
- GIUSTI, P.; LAZZERI, N.; BARBANI, N.; NARDUCCI, P.; BONARETTI, A.; PALLA, M.; LELLI, L. Hydrogels of poly(vinyl alcohol) and collagen as new bioartificial materials. *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **4**, p. 538, 1993.

- GUPTA, B.D.; TYAGI, P.K.; RAY, A.R.; SINGH, H. Radiation induced grafting of 2-Hydroxyethyl methacrylate onto polypropylene for biomedical applications. 1. Effect of synthesis conditions. *J. Macromol. Sci. Chem.* **27** (7), p. 831 – 840, 1990.
- HANSON, S.; RATNER, B.D. Testing of blood materials interactions. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SHOEM, F.J.; LEMONS, J.E. (Eds.). *Biomaterials science – an introduction to materials medicine*. USA.: Academic, 1996. P. 228.
- HAYASHI, K.; MURATA, K. *Kobunshi Ronbunshu*, **15**, p. 697, 1981.
- HOFFMAN, A.S.; HORBETT, T.A.; RATNER, B.D. Interactions of blood and blood components at hydrogel surfaces. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **283**, p. 372-382, 1977.
- HORBETT, T.A. Protein adsorption to hydrogels. In: PEPPAS, N.A. (Ed.). *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1986. V. 1: Fundamentals. p. 127-168.
- HSIUE, G.; LEE, S.; CHANG, P.C. Surface modification of silicone rubber membrane by plasma induced graft copolymerization as artificial cornea. *Artif. Organs* **20**:11, p. 1196-1207, 1996.
- HSIUE, G.; LEE, S.; WANG, C.C.; CHANG, P.C. The effect of plasma-induced graft copolymerization of pHEMA on silicone rubber towards improving corneal epithelial cells growth. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **5**:3, p. 205-220, 1992.
- HSIUE, G.H.; LEE, S.D.; WANG, CC; SHIUE, M.H.; CHANG, P.C.T. Plasma-induced graft copolymerization of HEMA onto silicone rubber and TPX film improving rabbit corneal epithelial cell attachment and growth. – *Biomaterials*, **15** (3), p. 163 – 171, 1994.
- HUANG, N.; YANG, P.; CHENG, X.; LEONG, Y.X.; ZHENG, X.L.; CAI, G.J.; ZHEN, Z.H.; ZHANG, F.; CHEN, Y.R.; LIU, X.H.; XI, T.F. Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthesized by ion beam enhanced deposition *Biomaterials*, **19** (7-9), p. 771 – 776, 1998.
- IKADA, Y. Membranas as biomaterials. *Polym. J.*, **23**(5), p. 551 – 60, 1991.
- IKADA, Y.; IWATA, H.; HORII, F.; MATSUNAGA, T.; TANIGUCHI, M.; SUZUKI, M. Blood compatibility of hydrophilic polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* **15**, p. 697-718, 1981.
- IMACHI, K. Implant science of artificial organ: Design for success. *Artificial Organs*, **21**(11), p. 1211 – 16, 1997.
- IMAI, Y.; NOSE, Y. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials *J. Biomed. Chem. Mater. Res.* **6**: 165-172, 1972.
- IMRE, K.; ODIAN, G. Diffusion controlled reaction V. Effect of concentration dependent diffusion coefficient on reaction rate in graft polymerization. *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.*, **17**, p. 2601-2626, 1979.

- INTERNATIONAL STANDARD. *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood*. 1992. (ISO 10 993-4)
- INTERNATIONAL STANDARD. *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. 1992. (ISO 10 993-5)
- KABANOV, V.Y. Preparation of polymeric biomaterials with the aid of radiation chemical methods. *Russ. Chem. Ver.*, **67** (9), p.783-816, 1998.
- KAMATH, K.R.; PARK, K. Surface modification of polymeric biomaterials by albumin grafting using gamma irradiation. *J. Appl. Biomater.*, **5** (2), p. 163 – 1732, 1994.
- KHANG, G.; KANG, Y.H.; PARK, J.B.; LEE, H.B. Improved bonding strength of polyethylene/polymethylmetacrylate bone cement – A study preliminary. *Biomed. Mater. And Enginner.*, **6**(5), p. 335 – 44, 1996.
- KHORASANI, M.T.; MIRZADEH, H.; SAMMES, P.G. Laser surface modification of polymers to improve biocompatibility: HEMA grafted PDMS, in vitro assay. *Radiat. Phys. Chem.*, **55** (5-6), p. 685-689, 1999.
- KIRKHAM, S.M.; DANGLE, M.E. The keratoprosthesis: improved biocompatibility through design and surface modification. *Ophthal Surg*, **22**(8), p. 455-61, 1991.
- KLIMENT, K.; STOL, M.; FAHOUN, K.; STOCKAR, B. Use of spongy hydron in plastic surgery. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2**, p. 237 – 243, 1968.
- KODAMA, Y. *Vulcanização do polidimetilsiloxano comercial (SILOPREN® HV 3/522) induzida com radiação ionizante*. São Paulo: 1997. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP).
- KULIK, E.A.; KATO, K.; IVANCHENKO, M.I.; IKADA, Y. Trypsin immobilization on ato polymer surface through grafted layer and its reaction with inhibitors. – *Biomaterials*, **14** (10), p. 763 – 769, 1993.
- LEE, R.G.; KIM, S.W. *J. Biomed. Mater. Res.*, **8**, p. 393-404, 1974 apud WILLIAMS, D.F. Advanced applications of materials implanted within the human body. *Mater. Sci. Technol.*, **3**, p. 797-805, 1987.
- LEE, S.; HSIUE, G.; KAO, C.; CHANG, P.C. Artificial cornea: surface modification of silicone rubber membrane by graft polymerization of pHema via glow discharge. *Biomaterials*, **17**:6, p. 587-595, 1996.
- LOPEZLOPEZ, G.; PASCUAL, A.; PEREA, E.J. Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *J. Med.Microbiol.*, **34**(6), p. 349 – 53, 1991.
- LORA, S.; PALMA, G.; CARENZA, M.; CALICETI, P.; PEZZIN, G. Radiation grafting of hydrophylic monomers onto poly[bis(trifluoroethoxy)phosphazane]. *Biomaterials*, **15** (11), P. 937-943, 1994.

- MANN, K.A.; BHASHYAM, S. Mixed-mode fracture toughness of the cobalt-chromium alloy poly(methyl methacrylate) cement interface. *J. Orthop.Res.* **17**(3), p. 321-328, 1999.
- MANO, E. B. *Polímeros como materiais de engenharia*. Rio de Janeiro: Edgard Blücher, 1991.
- MCINTIRE, L.V.; ADDONIZIO, V.P.; COLEMAN, D.L.; ESKIN, S.G.; HARKER, L.A.; KARDOS, J.L.; RATNER, B.D.; SCHOEN, F.J.; SEFTON, M.V.; PITLICK, F.A. Guidelines for blood-material interactions – devices and technology branch, Division of heart and vascular diseases, National Heart, Lung and Blood Institute, NIH Publication n° 85-2185, revised July 1985, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC apud HANSON, S.; RATNER, B.D. Testing of blood materials interactions. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SHOEM, F.J.; LEMONS, J.E. (Eds.). *Biomaterials science – na introduction to materials medicine*. USA.: Academic, 1996. P. 228.
- MEMETEA, T.; STANNETT, V. Radiation grafting to poly(ethylene terephthalate) fibers. *Polymer*, **20**, p. 465-468, 1979.
- MURAYAMA, T. Dynamic mechanical properties. In: KROSCSWITZ, J.I. (Ed.). *Concise: Encyclopedia of polymer science and engineering*. USA: John Wiley & Sons, 1990. p. 287 – 289.
- NAGY, K.; BORBELY, L.; KOVACS, A.; FAZEKAS, A.; VAJDOVICH, I.; MARI, A. Implant prosthetic rehabilitation after segmental mandibulectomy and bone grafting. *J. Long-term Effects of Med. Implants*, **9**(3), p. 185 – 91, 1999.
- NAKAMURA, A. Biological safety of biomaterials and devices. In: TSURATA, T.; HAYASHI, T.; KATAOKA, K.; ISHIHARA, K.; KIMURA, Y. (Eds.). *Biomedical Applications of Polymeric Materials*. Tokyo (JP): CRC, 1993. Cap. VII, pg. 429.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: UNICAMP, 1993.
- ORR, R.D.; DEBRUIJIN, J.D.; DAVIES, J.E. Scanning electron-microscopy of the bone interface with titanium, titanium alloy and hydroxyapatite. *Cells and Materials*, **2**(3), 241 – 51, 1992.
- OTSUHATA, K. *Syntheses of blood compatible materials by gamma rays*. Tokyo: 1985. Dissertation (PhD) – Department of Nuclear Engineering – University of Tokyo.
- OTSUHATA, K.; RAZZAK, M.T.; CASTAÑARES, R.L.; TABATA, Y.; OHASHI, F.; TAKEUCHI, A. Effect of surface texture of grafted films on antithrombogenicity. *Radiat. Phys. Chem.*, **25** (4-6), p. 537-548, 1985.
- PARK, H.J.; PARK, K-D.; BAE, Y.H. PDMS-based polyurethanes with MPEG grafts: synthesis, characterization and platelet adhesion study. *Biomaterials*, **20**, p. 943-953, 1999.

- PEAN, J.M.; VENIER-JULIENNE, M.C.; FILMON, R.; SERGENT, M.; PHAN-TAN-LUU, R.; BENOIT, J.P. Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles. *Intern. J. Pharm.*, **166** (1); p. 105 – 115, 1998.
- POLITECHNIKA LODZKA; Rosiak, J.; Rucinska-Rybus, A. Pekala, W. *Method of manufacturing hydrogel dressings*. US Pat. 4,871,490. Oct. 3, 1989.
- RATNER, B.D.; HORBETT, T.; HOFFMAN, A.S. Cell adhesion to polymeric materials: implications with respect to biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res.*, **9**, p. 407 – 422, 1975.
- RATNER, B.D. Biomedical applications of hydrogels: Review and critical appraisal. In: WILLIAMS, D.F. (Ed.). *Biocompatibility of clinical implant materials*. USA: CRC, 1981. p. 146-175.
- RATNER, B.D. Hydrogel surfaces. In: PEPPAS, N.A. (Ed.). *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1986. V. 1: Fundamentals. P. 85-92.
- RATNER, B. D. Biomedical applications of synthetic polymers. In: ALLEN, G.; BEVINGTON, J. (Eds). *Comprehensive polymer science*. USA: Pergamon, 1989. p. 201-247.
- RATNER, B.D. Testing biomaterials. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SHOEM, F.J.; LEMONS, J.E. (Eds.). *Biomaterials science – an introduction to materials medicine*. USA.: Academic, 1996. p. 215.
- REFOJO, M.F. Polymers in ophthalmic surgery. *J. Biomed. Mater. Res.*, **5**, p. 113 – 119, 1971.
- ROSIK, J.M.; ULAŃSKI, P.; PAJEWSKI, L.A.; YOSHII, F.; MAKUUCHI, K. Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments. *Radiat. Phys. Chem.*, **46** (2), p.161-168, 1995.
- RUCINSKA, A.; ROSIAK, J.; PEKALA, W. Radiation modification of vascular prostheses. *Radiat. Phys. Chem.*, **24** (5-6), p.495 - 498, 1984.
- SAKAI, K. Blood purification and the role of membranes. *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, **28**(6), p. 427 – 34, 1997.
- SANLI, O.; PULAT, E. Solvent-assisted graft copolymerization of acrylamide on poly(ethylene terephthalate) films using benzoyl peroxide initiator. *J. Appl. Polym. Sci.*, **47**, p. 1-6, 1993.
- SHTANKO, N.I.; KABANOV, V.Y., APEL, P.Y.; YOSHIDA, M. The use of radiation-induced graft polymerization for modification of polymer track membranes. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. Sec. B-beam Interac. With Mat. Atoms*, **151** (1-4), p.416-422, 1999.
- SILVA, M.A.; GIL, M.H.; GUIOMAR, J.; LAPA, E.; MACHADO, E.; MOREIRA, M.; GUTHRIE, J.T.; KOTOV, S. *Radiat. Phys. Chem.* **36**:4, p. 589-593, 1990.

- STANNETT, V.T. Co-polymerization and grafting. Radiation grafting – a state of the art. *J. Rad. Appl. Instrum., Part C*, **35**(1-3), p.82-87, 1990.]
- SUGIYAMA, K.; KATO, K.; KIDO, M.; SHIRAIISHI, K.; OHGA, K.; OKADA, K.; MATSUO, O. Grafting of vinyl monomers on the surface of a poly (ethylene terephthalate) film using Ar plasma post polymerization technique to increase biocompatibility. *Macromol. Chem. Phys.*, **199** (6), p. 1201 – 1208, 1998.
- TAMADA, Y.; KULIK, E.A.; IKADA, Y. Simple method for platelet coating. *Biomaterials*, **16**, p. 259, 1995.
- VERONESE, F.M.; CERIOTTI, G.; CALICETI, P.; LORA, S.; CARENZA, M. Slow release of narciclasine from matrices obtained by radiation-induced polymerization. *J. Controlled Release* **16**, p. 291, 1991.
- WERNER, C.; JÁCOBASCH, H.J. Surface characterization of polymers for medical devices. *Int. J. Artif. Org.*, **22** (3), p. 160 – 176, 1999.
- WILLIAMS, D.F. Review: Tissue-biomaterials interactions. *J. Mater. Sci.*, **22**, p. 3421-3445, 1987.
- WILSON, J.E., *Radiation chemistry of monomers, polymers and plastics*. NY, Marcel Dekker, cap. 5, p. 253-303, 1974.
- WITCHERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, **9**, p.117-147, 1960.
- XUE, T.J.; WILKIE, C.A. The interaction of vinyl monomers and poly(ethylene-terephthalate) in the presence of various initiators produces a physical mixture, not a graft copolymer. *J. Polym. Sci. Part A – Polym. Chem.*, **33** (16), p. 2753 – 2758, 1995.
- ZDRAHALA, R.J. Hydrogels and vascular grafts – State of the art and beyond. *Macromol. Symp.*, **109**, p. 135-143, 1996 (a).
- ZDRAHALA, R.J. Small caliber vascular grafts. Polyurethanes revisited. *J. Biomater. Appl.*, **11**(1), p. 37-61, 1996 (b).
- ZHU, B.; IWATA, H.; KONG, D.L.; YU, Y.T.; KATO, K.; IKADA, Y. Preparation of DNA-immobilized immunoadsorbent for treatment of systemic lupus erythematosus. *J. Biom. Sci. Poym. Ed.*, **10** (3), p. 341-350, 1999.