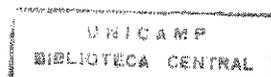


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Enga. Giuliana Piovesan Alves

**RECOBRIMENTO DE SUPERFÍCIES DE PVC COM
FILMES DE LANGMUIR-BLODGETT USANDO
FOSFATIDILETANOLAMINA**

Orientadora
Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**RECOBRIMENTO DE SUPERFÍCIES DE PVC COM
FILMES DE LANGMUIR-BLODGETT USANDO
FOSFATIDILETANOLAMINA**

Giuliana Piovesan Alves
Autora

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas - São Paulo
Agosto de 1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	AL87r
V. Ex.	
TOMADO BC/	39041
PROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/10/99
*: CPO	

CM-00136243-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

AL87r Alves, Giuliana Piovesan
Recobrimento de superficies de PVC com filmes de
Langmuir-Blodgett usando fosfatidiletanolamina. /
Giuliana Piovesan Alves.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadora: Maria Helena Andrade Santana
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipídios. 2. Cloreto de vinila. 3.
Biocompatibilidade. 4. Filmes finos multifolhados. I.
Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. III. Título.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 30 de Agosto de 1999 pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Necésio Gomes Costa



Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Giuliana Piovesan Alves e aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de Agosto de 1999.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'M. H. Santana', is written above a horizontal line.

Orientadora

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Com amor, a José Teodoro,
meus pais Wilson e Rosa Maria,
e irmãos Fabiana, Gustavo e Analiza.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana, pela amizade, incentivo, sugestões e orientação em todas as etapas do trabalho.

À Profa. Dra. Ângela Maria Moraes, pelas sugestões dadas durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana, do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química, e ao Centro de Tecnologia da Unicamp, que permitiram a realização de algumas etapas deste trabalho em seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Necésio Gomes Costa, da Escola Federal de Engenharia de Itajubá, pelo ensino da técnica de Langmuir-Blodgett.

Ao Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, e à Profa. Dra. Mônica Alonso Cotta, do Instituto de Física da Unicamp, pelo ensino das técnicas de caracterização do biomaterial.

Ao Dr. Waldyr Parolari Novello, da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp, pelas informações fornecidas no decorrer do trabalho.

Às minhas irmãs Fabiana e Analiza, pela ajuda e sugestões.

Às amigas: Ana Paula, Denise, Paula e Rosana, pelo companheirismo e ajuda.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos demais professores, funcionários e amigos da Unicamp, que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha aprendizagem e bom andamento do trabalho.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	i
NOMENCLATURA	iii
RESUMO	
ABSTRACT	
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: OBJETIVO	4
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 - Biocompatibilidade, Hemocompatibilidade e Trombogenicidade.....	5
3.2 - Polímeros Biomédicos.....	6
3.3 - Componentes do Sangue e seu Papel na Formação de Trombos.....	8
3.4 - Mecanismos de Resposta à Distúrbios na Circulação do Sangue.....	12
3.5 - Interações do Sangue com Materiais e o Mecanismo de Coagulação.....	12
3.5.1 - Mecanismos de Coagulação.....	14
3.5.1.1 - Mecanismo de Coagulação Intrínseco.....	15

3.5.1.2 - Mecanismo de Coagulação Extrínseco.....	16
3.5.1.3 - Mecanismo Comum.....	17
3.6 - Caracterização das Interações do Sangue com Biomateriais.....	18
3.7 - Modificações nas Superfícies dos Biomateriais.....	20
3.7.1 - Deposição de Filmes de Langmuir-Blodgett.....	23
3.7.1.1 - Técnica de Deposição.....	24
3.7.1.2 - Caracterização do Recobrimento.....	30
3.7.1.2.1 - Ângulo de Contato.....	31
3.7.1.2.2 - Microscopia de Força Atômica.....	33
3.7.1.2.3 - Outras Técnicas de Caracterização.....	36
3.7.1.3 - Tipos de Moléculas Formadoras dos Filmes de LB.....	36
3.7.1.3.1 - Fosfolipídios.....	37
3.7.1.4 - Estudos com Filmes de LB de Fosfolipídios.....	41
3.7.1.5 - Associação de Grupos Químicos de Fosfolipídios por outras Técnicas.....	45
3.8 - Mecanismo da Hemocompatibilidade com Fosfolipídios.....	46
3.9 - Recobrimento com Fosfolipídios Derivatizados com PEG.....	46
3.10 - Miscibilidade de Misturas de Fosfolipídios.....	49
CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 - Materiais.....	51
4.2 - Métodos.....	51
4.2.1 - Preparação das Placas de PVC.....	51
4.2.2 - Limpeza das Placas de PVC.....	52

4.2.3 - Medida da Tensão Superficial da Água.....	52
4.2.4 - Síntese do DMPE-PEG2000.....	52
4.2.5 - Obtenção das Isotermas de Pressão versus Área por Molécula.....	54
4.2.6 - Deposição dos Filmes de LB.....	56
4.2.7 - Caracterização da Superfície das Placas.....	56
4.2.7.1 - Determinação do Ângulo de Contato Dinâmico.....	56
4.2.7.2 - Microscopia de Força Atômica.....	57
4.2.8 - Teste do Tempo de Fibrina.....	57
4.2.9 - Determinação das Variáveis Importantes no Processo de Deposição dos Filmes.....	58
4.2.10 - Estudo da Miscibilidade das Misturas de Fosfolípidios.....	60
 CAPÍTULO 5: RESULTADOS	62
 5.1 - Seleção do Solvente de Lavagem.....	62
 5.2 - Perfis Típicos de Força versus Profundidade para a Determinação do Ângulo de Contato Dinâmico.....	63
 5.3 - Recobrimento com Fosfolípidios Isolados.....	65
5.3.1 - Isotermas de Pressão versus Área Molecular.....	65
5.3.2 - Avaliação das Superfícies Recobertas.....	68
5.3.2.1 - Ângulo de Contato Dinâmico.....	68
5.3.2.2 - Tempo de Fibrina.....	73
5.3.2.3 - Microscopia de Força Atômica.....	76
5.3.2.4 - Comparação do Recobrimento com DMPE Visto pelos Vários Métodos de Caracterização.....	81
5.3.3 - Influência das Variáveis de Processo no Recobrimento de Superfícies.....	82
 5.4 - Recobrimento com Misturas dos Fosfolípidios DMPC-DMPE.....	85

5.5 - Resultados da Síntese e Purificação do DMPE-PEG ₂₀₀₀	90
5.6 - Recobrimento com o Fosfolípido DMPE Derivatizado com Polietilenoglicol.....	91
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES.....	100
CAPÍTULO 7: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	102
CAPÍTULO 8: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ANEXO I.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do poli-cloreto de vinila (PVC).....	7
Figura 2: Interações do sangue com superfícies artificiais.....	13
Figura 3: Mecanismos de interações dos fatores de coagulação. A coagulação é iniciada pelo mecanismo intrínseco ou extrínseco, com subsequente interações de fatores, os quais convergem para um mecanismo final comum.....	15
Figura 4: Representações esquemáticas de métodos de modificação de superfícies.....	23
Figura 5: Cuba para a deposição de filmes de LB.....	24
Figura 6: Arranjo das moléculas anfifílicas na interface ar-água.....	25
Figura 7: Deposição sobre um substrato hidrofóbico.....	26
Figura 8: Deposição sobre um substrato hidrofílico.....	26
Figura 9: Deposição tipo “Y” sobre um substrato hidrofílico.....	27
Figura 10: a) deposição tipo “X”, b) deposição tipo “Z”.....	27
Figura 11: Forças de atração atuando sobre moléculas em solução: a) forças atuando na subfase; b) forças atuando na interface.....	28
Figura 12: Arranjos das moléculas de lipídios sobre a subfase aquosa: a) o filme de lipídios “flutua” sobre a camada aquosa (fase gasosa), b) O filme de lipídios é inicialmente comprimido por uma barreira móvel (fase líquida), c) aumento da compressão e	

empacotamento das moléculas (fase sólida, obtenção da área ocupada por molécula = A_0),
d) colapso do filme de lipídios (obtenção da pressão de colapso = Π_C).....29

Figura 13: Mudança de forma da isoterma de $\Pi \times A$ com o aumento da temperatura para o ácido esteárico.....30

Figura 14: Histerese verdadeira do ângulo de contato.....32

Figura 15: Histerese cinética do ângulo de contato.....32

Figura 16: Diagrama esquemático de um MFA típico.....35

Figura 17: Representação esquemática da distribuição assimétrica dos fosfolipídios das membranas celulares externas das a) plaquetas, b) eritrócitos.....37

Figura 18: Estrutura química da molécula de fosfolipídio. A estrutura do grupamento X difere de acordo com o fosfolipídio.....38

Figura 19: Modelos de empacotamento para algumas moléculas anfifílicas.....39

Figura 20: Estruturas formadas em superfícies enxertadas com misturas: a) a baixas concentrações de polímeros, “mushrooms”; b) a altas concentrações de polímeros, “brush”.....47

Figura 21: Representação esquemática de uma mistura polímero-lipídio/lipídio na interface ar-água como função da pressão de superfície, Π : (a) cadeias de PEG confinadas na superfície; (b) cadeias de PEG confinadas na superfície e expandidas na subfase aquosa; (c) cadeias de PEG totalmente estendidas a partir da superfície.....48

Figura 22: Possíveis distribuições moleculares de misturas: (a) componentes miscíveis; (b) componentes imiscíveis com formação de grupos pequenos de moléculas similares; (c) componentes imiscíveis com separação total das moléculas diferentes.....	49
Figura 23: Rota de síntese do DMPE-PEG ₂₀₀₀	53
Figura 24: Ciclos de medida de força versus profundidade de imersão da placa para a determinação dos ângulos de contato dinâmico. Profundidade mínima de 2mm e máxima de 6mm. Material: placa moldada a partir de tubo comercial de PVC previamente lavada com metanol (placa 106).....	64
Figura 25: Isotermas de pressão versus área por molécula para os lipídios DMPE e DPPE.....	66
Figura 26: Curvas de pressão versus área por molécula para o DMPE nos vários experimentos realizados.....	67
Figura 27: Comparação entre as respostas da variação do ângulo de contato para as mesmas condições de deposição com os lipídios DMPE e DPPE. Condição de deposição: P = 20mN/m, 30 camadas, v = 10mm/min e sem tempo de organização molecular para o início da deposição; condição de deposição: P = 40mN/m, 30 camadas, v = 10mm/min e com tempo de organização molecular de 150min para o início da deposição.....	72
Figura 28: Comparação entre as respostas da variação do tempo de fibrina para as mesmas condições de deposição com os lipídios DMPE e DPPE. Condição de deposição: P = 20mN/m, 30 camadas, v = 10mm/min e sem tempo de organização molecular para o início da deposição; condição de deposição: P = 40mN/m, 30 camadas, v = 10mm/min e com tempo de organização molecular de 150min para o início da deposição.....	75

Figura 29: Microscopia de força atômica da superfície de uma placa de PVC sem recobrimento.....	76
Figura 30: Isoterma de pressão versus área molecular para o DMPE com as microscopias de força atômica. Sem tempo de espera para a organização molecular antes do início da deposição.....	77
Figura 31: Isoterma de pressão versus área molecular para o DMPE com as microscopias de força atômica. Tempo de organização molecular de 150 minutos antes do início da deposição.....	78
Figura 32: Isoterma de pressão versus área molecular para o DPPE com as microscopias de força atômica.....	79
Figura 33: Isotermas obtidas para os fosfolípidios DMPC e DMPE isolados e em misturas.....	86
Figura 34: Área ocupada por molécula a pressão de 20 mN/m (A_{20}) em função da fração molar de DMPE.....	87
Figura 35: Área ocupada por molécula a pressão de 30 mN/m (A_{30}) em função da fração molar de DMPE.....	87
Figura 36: Área ocupada por molécula a pressão de 40 mN/m (A_{40}) em função da fração molar de DMPE.....	88
Figura 37: Microscopias de força atômica das amostras recobertas com: a) 75% DMPE e 25% DMPC; b) 50% DMPE e 50% DMPC; c) 25% DMPE e 75% DMPC.....	90

Figura 38: Cromatografias de camada delgada em fase reversa das frações obtidas na purificação DMPE-PEG ₂₀₀₀ em coluna de sílica. A primeira amostra refere-se ao padrão de PEG ₂₀₀₀ e as demais as frações eluídas de 8 a 16.....	91
Figura 39: Curva de pressão versus área por molécula para os fosfolipídios isolados DMPE e DMPE-PEG, assim como para a mistura DMPE-PEG:DMPE (9:91).....	92
Figura 40: Curvas de pressão versus área por molécula em escala logaritmica para a mistura 9% DMPE-PEG e 91% DMPE e para o DMPE-PEG puro.....	92
Figura 41: Microscopia de força atômica da amostra recoberta com a mistura 91% DMPE e 9% DMPE-PEG.....	94
Figura 42: Curvas de pressão versus área por molécula para as misturas contendo os fosfolipídios DMPC, DMPE-PEG e DMPE e para o DMPE-PEG isolado.....	95
Figura 43: Curvas de pressão versus área por molécula em escala logaritmica para as misturas contendo os fosfolipídios DMPC, DMPE-PEG e DMPE e para o DMPE-PEG isolado.....	96
Figura 44: Área ocupada por molécula a pressão de 20 mN/m (A_{20}) em função da fração molar de DMPE-PEG.....	97
Figura 45: Área ocupada por molécula a pressão de 30 mN/m (A_{30}) em função da fração molar de DMPE-PEG.....	97
Figura 46: Área ocupada por molécula a pressão de 40 mN/m (A_{40}) em função da fração molar de DMPE-PEG.....	97

Figura 47: Microscopias de força atômica das amostras recobertas com: a) 25% DMPC, 4,5% de DMPE-PEG e 70,5% de DMPE; b) 25% DMPC, 9% de DMPE-PEG e 66% DMPE; c) 25% DMPC, 12% DMPE-PEG e 63% DMPE.....99

Figura 48: Pressão de deposição versus variação percentual do ângulo de contato para 30 camadas de deposição (placas 56, 57 e 58).....112

Figura 49: Pressão de deposição versus variação percentual do ângulo de contato para 6 camadas de deposição (placas 59, 60 e 61).....112

Figura 50: Número de camadas depositadas versus variação percentual do ângulo de contato para $P = 30$ mN/m (placas 58, 62 e 63).....113

Figura 51: Número de camadas depositadas versus variação percentual do ângulo de contato para $P = 20$ mN/m (placas 57, 59 e 64).....113

Figura 52: Tempo de espera versus variação percentual do ângulo de contato para $P=30$ mN/m, 30 camadas (placas 58 e 67).....113

Figura 53: Velocidade de deposição versus variação percentual do ângulo de contato para $P=30$ mN/m, 30 camadas (placas 58 , 66 e 68).....114

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Exemplos de modificações físico-químicas de superfícies.....22
- Tabela 2:** Exemplos de modificações biológicas de superfície.....22
- Tabela 3:** Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário.....59
- Tabela 4:** Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}60
- Tabela 5:** Influência do solvente de lavagem das placas na tensão superficial da água e nos ângulos de contato de avanço e de retrocesso.....62
- Tabela 6:** Valores dos ângulos de avanço e de retrocesso da placa 106 limpa. Sendo $a = \gamma p \cos\theta$, $b = \rho_1 L \varepsilon g$, onde: γ é a tensão superficial, p é o perímetro molhado da placa, ρ_1 é a densidade da água, L é a largura da placa, ε é a espessura da placa e g é a aceleração da gravidade.....65
- Tabela 7:** Pressão de colapso e área por molécula obtidas para os lipídios DMPE e DPPE.....66
- Tabela 8:** Influência das condições operacionais no recobrimento de placas com o fosfolipídio DMPE, em termos dos ângulos de contato dinâmico de avanço e retrocesso e variação percentual dos ângulos de contato de avanço e retrocesso em relação às placas não recobertas. γ_{H_2Oa} e γ_{H_2Od} são respectivamente os valores da tensão superficial da água medidos antes e após a imersão das placas para a obtenção dos perfis de força versus profundidade.....69
- Tabela 9:** Influência das condições operacionais no recobrimento de placas com o fosfolipídio DPPE, em termos dos ângulos de contato dinâmico de avanço e retrocesso e variação percentual dos ângulos de contato de avanço e retrocesso em relação às placas não

recobertas. γ_{H_2Oa} e γ_{H_2Od} são respectivamente os valores da tensão superficial da água medidos antes e após a imersão das placas para a obtenção dos perfis de força versus profundidade.....71

Tabela 10: Influência das condições operacionais no recobrimento de placas com o fosfolípido DMPE, em termos dos tempos de fibrina e variação percentual dos tempos de fibrina em relação à placa não recoberta.....73

Tabela 11: Influência das condições operacionais no recobrimento de placas com o fosfolípido DPPE, em termos dos tempos de fibrina e variação percentual dos tempos de fibrina em relação à placa não recoberta.....74

Tabela 12: Comparação do recobrimento com DMPE através dos métodos de caracterização: variação no ângulo de contato, presença de depósitos e variação no tempo de fibrina.....82

Tabela 13: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com as respostas obtidas em termos de variação percentual do ângulo de contato de retrocesso dinâmico e do tempo de fibrina.....83

Tabela 14: Influência das variáveis no processo de recobrimento das placas de PVC.....84

Tabela 15: Valores de área ocupada por molécula (A) para as diferentes isothermas às pressões de 20 (A_{20}), 30 (A_{30}) e 40 (A_{40}) mN/m.....87

Tabela 16: Variação do ângulo de contato dinâmico de retrocesso e do tempo de fibrina para os fosfolípidos DMPC e DMPE puros e em misturas na mesma condição de deposição.....89

Tabela 17: Valores de área por molécula obtidos para as isotermas apresentadas na Figura 39 às pressões de 20, 30 e 40 mN/m. Os valores teóricos foram calculados pela equação [7].....93

Tabela 18: Valores de área ocupada por molécula (A) para as diferentes isotermas às pressões de 20 (A_{20}), 30 (A_{30}) e 40 (A_{40}) mN/m.....96

Tabela 19: Variações percentuais do ângulo de contato e do tempo de fibrina para as placas recobertas com as misturas ternárias contendo DMPC, DMPE-PEG e DMPE na mesma condição de deposição.....98

Tabela 20: Resumo dos resultados para as placas da análise gráfica.....111

ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato
CD: carbonil diimidazol
CMC: concentração de micela crítica
DBP: dibutil ftalato
DLPE: dilinoleoilfosfatidiletanolamina
DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina
DMPE: dimiristoilfosfatidiletanolamina
DOP: di-2-etil hexil ftalato
DOPC: dioleoilfosfatidilcolina
DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPE: dipalmitoilfosfatidiletanolamina
DSPC: distearoilfosfatidilcolina
DSPE: distearoilfosfatidiletanolamina
ESCA: espectroscopia eletrônica para análise química
Fator V: pró acelerina
Fator VII: pró convertina
Fator VIII: fator anti-hemofílico
Fator IX: fator de Christmas
Fator X: fator de Stuart-Prower
Fator XI: antecessor da tromboplastina plasmática
Fator XII: fator de Hageman
Fator XIII: fator estabilizador da fibrina
FDA: Food and Drug Administration
ISM: interações sangue-material
LB: Langmuir-Blodgett
MFA: microscopia de força atômica
PC: fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina
PEG: polietilenoglicol

PET: poliéster termoplástico

PF4: fator plaquetário 4

PS: fosfatidilserina

PVC: policloreto de vinila

TEA: trietilamina

Teflon: politetrafluoretileno

TxA₂: tromboxano A₂

βTG: β-tromboglobulina

NOMENCLATURA

a: área da cabeça polar

A_0 : área ocupada por molécula à pressão de 0 mN/m

A: área por molécula

A_i : área ocupada por molécula do componente “i” da mistura

A_{12} : área ocupada por molécula da mistura

A_f : ângulo de contato final

A_i : ângulo de contato inicial

C: concentração da solução

g: aceleração da gravidade

H_{II} : fase hexagonal tipo II

l: comprimento da cadeia hidrocarbônica

L: largura da placa

m: massa do componente

n_i : fração molar da espécie i

N: número de camadas depositadas

N_i : fração molar do componente “i” da mistura

p: perímetro molhado da placa

P: pressão de deposição

P^* : parâmetro de empacotamento

P_i^* : parâmetro de empacotamento da espécie “i”

R_+ : respostas obtidas nas linhas correspondentes ao sinal positivo do planejamento fatorial fracionário para a variável em questão

R_- : respostas obtidas nas linhas correspondentes ao sinal negativo do planejamento fatorial fracionário para a variável em questão

t: tempo de organização molecular antes do início da deposição

T_{pr} : tempo médio de formação da rede de fibrina para a placa recoberta

T_{psr} : tempo médio de formação da rede de fibrina para a placa sem recobrimento

TR: taxa de transferência

v^* : volume da molécula

v : velocidade de deposição

V : volume da solução

Π : pressão superficial

Π_C : pressão de colapso

Π_{pc} : pressão crítica

ε : espessura da placa

γ : tensão superficial do líquido

γ_0 : tensão superficial do líquido na presença da monocamada de moléculas anfifílicas

θ : ângulo de contato

ρ : densidade do líquido

RESUMO

Alves, G.P. - Recobrimento de superfícies de PVC com filmes de Langmuir-Blodgett usando fosfatidiletanolamina.

Tese (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

Os biomateriais vêm se tornando cada vez mais importantes dentro do cenário médico. Porém, o que restringe suas aplicações são as reações adversas que ocorrem quando essas superfícies entram em contato com os fluidos biológicos. Uma alternativa para reduzir as reações adversas e aumentar a sua hemocompatibilidade é a mimetização das interfaces biologicamente inertes, como a superfície externa de glóbulos vermelhos e plaquetas, que possuem em comum a presença dos fosfolipídios neutros fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomiélinea.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho de pesquisa foi estudar o recobrimento de superfícies comerciais de policloreto de vinila (PVC) com os fosfolipídios isolados dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) e dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE) e com DMPE em misturas com dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e derivatizado com polietilenoglicol (PEG), através do processo de Langmuir-Blodgett (LB).

O recobrimento foi caracterizado através de determinações do ângulo de contato dinâmico em interface ar-água e do tempo de fibrina e através de microscopia de força atômica. Os resultados experimentais indicaram a factibilidade do recobrimento das superfícies com os fosfolipídios isolados ou com suas misturas, e uma boa correlação entre as técnicas de caracterização utilizadas. De uma maneira geral, as superfícies recobertas tornaram-se mais hidrofóbicas e mais hemocompatíveis, se comparadas com as superfícies não recobertas. O recobrimento mostrou-se dependente da composição dos fosfolipídios e das variáveis operacionais do processo. Esses resultados são importantes para aplicações do PVC em utensílios médicos e circuitos extracorpóreos.

Palavras-chave: filmes de LB, fosfolipídios, hemocompatibilidade, policloreto de vinila

ABSTRACT

Alves, G.P. - Coating of PVC surfaces with Langmuir-Blodgett films using phosphatidylethanolamine

Master Thesis - Chemical Engineering School, State University of Campinas, 1999.

Biomaterials have becoming important in modern medicine. However, their applications are limited by the adverse reactions that occur when the foreign surfaces contact blood. An alternative approach to reduce adverse reactions and to increase the hemocompatibility concerns to the mimicry of biologically inert interfaces, such as the external membrane surfaces of erythrocytes and platelets. These surfaces are composed by the zwitterionics phospholipids phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and sphingomyelin.

Based on these concepts, in this work was studied the coating of commercial polyvinylchloride (PVC) surfaces with the pure phospholipids dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) and dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) and with mixtures of DMPE with dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and functionalized with polyethylene glycol (PEG), by Langmuir-Blodgett (LB) process.

The coating was characterized by dynamic contact angle in air-water systems, fibrin time and atomic force microscopy. The experimental results showed that the PVC plates were covered with pure phospholipids and with their mixtures, and that there is a good relationship among the characterization methods. In the majority of the situations, the covered surfaces became more hydrophobic and presented enhanced hemocompatibility. The covering is dependent on the phospholipid composition and the operational variables of the process. These results are important to improve the performance of PVC in medical devices and in extracorporeal circuits.

Key-words: LB films, phospholipids, hemocompatibility, polyvinylchloride.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A aplicação clínica de aparelhos ou materiais que entram em contato com o sangue é de maior importância na prática da medicina moderna. As reações adversas entre superfícies estranhas ou protéticas e os componentes do sangue são os principais fatores que restringem a aplicação desses biomateriais. Nas últimas décadas muita pesquisa e capital tem sido direcionado para o desenvolvimento de materiais que não provoquem a formação de trombos quando expostos ao sangue. Porém, devido à complexidade e interdependência de muitos parâmetros que influenciam a ativação das plaquetas e a coagulação sanguínea, poucos materiais tromboresistentes têm sido satisfatoriamente obtidos.

Nenhuma teoria individual fornece uma explicação satisfatória da tolerância biológica dos vários biomateriais em uso correntemente e muitas hipóteses têm sido propostas para a avaliação da hemocompatibilidade dos novos materiais.

A natureza química inerte era antigamente a propriedade básica para o desenvolvimento de materiais usados no contato com o sangue. Mas, uma vez expostos ao ambiente dinâmico do sangue, as propriedades interfaciais dessas superfícies podem ser modificadas, resultando na formação do trombo.

Várias alternativas têm sido buscadas para reduzir ou até mesmo eliminar a trombogenicidade dos materiais, dentre as quais o acoplamento de agentes anti-plaquetas, biopolímeros e a mimetização de interfaces biologicamente inertes.

O acoplamento de agentes anti-plaquetas às superfícies poliméricas reduz ou até mesmo elimina, como já indicado através de testes *in vitro*, a ativação das plaquetas. Uma classe importante desses agentes são as prostaglandinas. A imobilização de grupos antitrombóticos, tal como heparina, sobre superfícies também tem sido realizada com o objetivo de reduzir a formação de trombos. A aplicação clínica dessa técnica é limitada

pela gradual erosão ou desorção do grupo antitrombótico (Hoffman, 1987). Kim et al., em 1987, mostraram que o acoplamento de biopolímeros como a albumina sobre a superfície polimérica também aumenta a hemocompatibilidade.

A mimetização de interfaces biologicamente inertes, como a membrana celular externa de glóbulos vermelhos e plaquetas, representa um novo método de modificação das superfícies poliméricas. Esse método possui a vantagem de não causar reações adversas.

Neste trabalho foi estudado o recobrimento de superfícies comerciais de polímero de cloreto de vinila (PVC) com o fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE) isolado, em misturas com fosfatidilcolina (PC) e derivatizado com polietilenoglicol (PEG) através de filmes de Langmuir-Blodgett (filmes de LB). Para a avaliação do recobrimento em relação às dimensões relativas entre as porções polares e apolares das moléculas de PE foram realizados experimentos com os fosfolípidos dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) e dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), com 14 e 16 átomos de carbono na porção apolar respectivamente.

O PVC foi o polímero escolhido por ser o principal material termoplástico utilizado em sistemas de tratamento extracorpóreo. Primeiramente foram confeccionadas placas planas de PVC obtidas a partir de tubos comerciais desse polímero. Para o PVC adquirir flexibilidade, são adicionados plastificantes ao material, principalmente ésteres orgânicos. A presença do plastificante aumenta a hidrofobicidade da superfície, fazendo com que ocorra uma deposição preferencial de fibrinogênio à superfície, a principal proteína plasmática causadora da adesão e ativação das plaquetas (Kim et al., 1976). Para reduzir esses efeitos vários solventes de lavagem foram testados para a limpeza das placas de PVC.

As monocamadas foram caracterizadas através das suas isotermas de Langmuir e as superfícies recobertas através de microscopia de força atômica e através de determinações do ângulo de contato dinâmico na interface ar-água e tempo de fibrina. Todos os resultados foram analisados tendo como referência placas sem recobrimento nas mesmas condições.

O desenvolvimento deste trabalho está inserido nos projetos MCT/PRONEX (Grupo de Excelência em Biomateriais) e CNPq/PADCT-III (Membranas de Afinidade: Remoção de Auto-Anticorpos).

Um trabalho semelhante a este foi desenvolvido pela aluna Paula Rulf Marreco, orientada pela Profa. Dra. Ângela Maria Moraes, utilizando o fosfolípido fosfatidilcolina. O conjunto de resultados obtidos permitiu uma melhor contribuição para as pesquisas no campo de mimetização de superfícies biologicamente inertes através do recobrimento com fosfolípidos, visando a hemocompatibilidade.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é contribuir para o desenvolvimento de materiais hemocompatíveis através do recobrimento de superfícies de PVC com fosfolípidios mimetizando a interface biologicamente inerte da membrana celular.

O trabalho foi desenvolvido nas seguintes etapas:

- Identificação das variáveis importantes do processo de recobrimento;
- Avaliação da influência da dimensão das porções hidrofílicas e hidrofóbicas das moléculas dos fosfolípidios nas características do recobrimento e na hemocompatibilidade das superfícies;
- Avaliação do recobrimento e de alguns aspectos da hemocompatibilidade das superfícies tratadas com filmes de Langmuir-Blodgett dos fosfolípidios fosfatidiletanolamina isolado, em mistura com fosfatidilcolina e derivatizado com polietilenoglicol.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - BIOCOMPATIBILIDADE, HEMOCOMPATIBILIDADE E TROMBOGENICIDADE

Os biomateriais constituem uma importante classe de materiais usados em aplicações médicas que envolvem interações com sistemas biológicos. Esses materiais são constituídos por metais, cerâmicas, vidros, polímeros naturais e sintéticos e devem necessariamente ser biocompatíveis. Atualmente, a utilização de biomateriais em dispositivos para implantes e circuitos extracorpóreos é extensa, e o montante anual envolvido em suas vendas é da ordem de bilhões de dólares.

Os principais requisitos para a biocompatibilidade dos materiais são divididos em duas categorias: durabilidade mecânica e biológica, e compatibilidade com os tecidos e com o sangue. Os requisitos para a primeira categoria estão associados às propriedades volumétricas dos materiais e dispositivos, enquanto que a compatibilidade com tecidos e com sangue depende das propriedades das superfícies expostas.

Em termos gerais, compatibilidade com sangue, ou hemocompatibilidade, pode ser definida como a propriedade do material ou dispositivo que permite o seu uso em contato com o sangue sem provocar reações adversas. Embora essa definição seja pouco criteriosa para a descrição do que seja um material hemocompatível, algo mais aprofundado se tornaria muito complexo devido aos vários mecanismos que o organismo tem disponível para responder às reações adversas com o sangue. Um mesmo material pode ser altamente ativo para um determinado mecanismo de resposta, e inativo para outro.

A compatibilidade de materiais com o sangue pode também ser vista pelo lado oposto, considerando a trombogenicidade, ou seja, as reações adversas específicas produzidas quando um material entra em contato com o sangue. Essas reações conduzem à formação de coágulos e seu desprendimento da superfície, podendo resultar em fenômenos tromboembólicos, além da hemólise, ativação do sistema complemento e outras reações

imunológicas. Portanto, ao se projetar materiais hemocompatíveis e dispositivos, o principal objetivo é minimizar essas reações indesejáveis com o sangue.

Embora vários dispositivos já sejam usados com sucesso em pacientes por muitos anos e sejam julgados terapeuticamente benéficos, permanece a necessidade de pesquisa para um melhor conhecimento das interações dos biomateriais com o sangue, bem como o desenvolvimento ou modificações dos materiais já existentes para melhorar a sua hemocompatibilidade. Embora em muitos casos o desempenho desses materiais seja aceitável, isto é, a relação benefício/risco é alta, esses dispositivos poderiam ser melhorados no sentido de reduzir os efeitos adversos das interações com o sangue, e permitir o seu uso por um tempo mais prolongado. Além disso, muitos dispositivos requerem o uso de anticoagulantes, como a heparina, para serem usados com segurança e por tempo prolongado. Modificações nos materiais de modo a reduzir a necessidade de utilização dos anticoagulantes seriam muito benéficas, reduzindo os riscos de sangramento e custos adicionais com o tratamento das complicações resultantes. Para certas aplicações, especialmente aquelas que envolvem o uso por tempo prolongado, não existem dispositivos que desempenhem adequadamente as suas funções, mesmo quando drogas antitrombogênicas são usadas (Ratner et al., 1996).

3.2 - POLÍMEROS BIOMÉDICOS

Os polímeros vêm sendo cada vez mais utilizados na área biomédica. Eles podem apresentar as mais diversas propriedades, variando de rígidos a flexíveis, termoplásticos a termorrígidos, podendo ainda ser naturais ou sintéticos. Dentre os polímeros naturais, destaca-se o uso da borracha natural e da celulose e dentre os sintéticos são muito utilizados o policloreto de vinila (PVC), o polietileno, o politetrafluoretileno (Teflon®), o poliéster termoplástico (PET - Dacron®), o nylon, os poliuretanos e a borracha de silicone (Garcia, 1995).

O PVC, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 1, é um dos polímeros mais utilizados para a obtenção de materiais médicos, sendo usado na confecção de bolsas de

armazenamento de sangue, tubos sangüíneos, próteses e dispositivos extracorpóreos (Chapman e Durrani, 1985). A produção do policloreto de vinila iniciou-se em 1912 mas somente em 1931 foi fabricado o PVC flexível. O PVC é um dos mais antigos termoplásticos e tem se mantido como um dos polímeros mais importantes no decorrer dos últimos 60 anos da história.

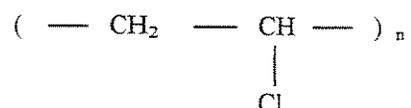


Figura 1: Fórmula estrutural do policloreto de vinila (PVC).

A presença do grupo C-Cl de forma alternada na molécula do PVC produz uma grande polaridade que atua intermolecularmente, tornando o polímero rígido. Para a formulação de compostos de PVC flexíveis são utilizados plastificantes, que, por sua vez, devem possuir grupos polares para interagirem com os grupos C-Cl do polímero, enfraquecendo as forças intermoleculares na cadeia polimérica e tornando o PVC um material flexível. A quantidade de plastificante utilizada depende das propriedades desejadas para a aplicação do polímero.

O plastificante, em geral, é um líquido de alto ponto de ebulição e deve apresentar as seguintes propriedades: longo tempo de vida útil, baixa degradação e resistência às variações químicas e térmicas. Os plastificantes mais utilizados no PVC são os ésteres orgânicos. Dentre esses, os mais empregados são diésteres de anidridos ftálicos com álcoois de carbonos C₄-C₁₀. Em dispositivos médicos, tais como bolsas de sangue e aparelhos de circulação extracorpórea, destaca-se o uso do plastificante di-2-etil hexil ftalato (DOP), por apresentar fácil disponibilidade e baixo custo.

A perda do plastificante para o meio ao qual ele encontra-se exposto é extremamente indesejável, devendo este permanecer no PVC não apenas durante o tempo de vida útil do produto plastificado, mas também resistir a variações químicas e ao contato

com diversos fluidos. O plastificante pode ser removido do polímero através da extração, que é a perda do plastificante de superfícies para líquidos, da volatilização, perda do plastificante para o ar, ou da migração, que é a perda por transferência do plastificante entre duas superfícies em contato. A tendência de eliminação do plastificante depende do tamanho da sua molécula e da sua taxa de difusão no polímero. Quanto maior a molécula, menor é a difusão do plastificante.

Kim et al., em 1976, estudando o efeito do plastificante DOP do PVC na hemocompatibilidade, identificaram sua presença em tecidos de pacientes humanos que sofreram transfusão sanguínea, com o sangue estocado em bolsas de PVC com DOP. Esse estudo demonstrou que o ftalato pode ser extraído do polímero com metanol. Observou-se que a extração ocorria em duas etapas: na primeira havia a dissolução do ftalato da superfície seguida pela difusão do plastificante da região interna do filme para a superfície, devido ao gradiente de concentração. Durante a extração do plastificante o ângulo de contato com a água diminuiu com o tempo, aumentando a molhabilidade da superfície, até que foi alcançado um valor limite. Esse limite correspondeu ao ângulo de contato do PVC puro. Desta forma, a presença do plastificante aumentou a hidrofobicidade da superfície. Superfícies com ftalato apresentaram uma maior adsorção de proteínas do plasma tais como fibrinogênio e γ -globulina. Essas proteínas plasmáticas induzem a adesão e a agregação das plaquetas, iniciando assim, a formação do trombo sobre superfícies. Superfícies de PVC puro adsorveram em maior quantidade albumina, uma proteína sanguínea que não induz a trombogenicidade. Portanto, embora o uso do DOP não se mostrou indicado nesse tipo de aplicação, ele é o único plastificante aprovado pela Food and Drug Administration (FDA/EUA) para entrar em contato com o sangue humano.

3.3 - COMPONENTES DO SANGUE E SEU PAPEL NA FORMAÇÃO DE TROMBOS

O sangue é um fluido complexo composto de plaquetas, hemáceas e leucócitos suspensos em uma porção líquida, o plasma, que consiste de uma solução de proteínas, moléculas inorgânicas e eletrólitos.

As plaquetas são células em forma de disco, não nucleadas, com diâmetro de 3-4 μm e um volume médio de $10 \times 10^{-9} \text{ mm}^3$. São produzidas na medula óssea e circulam à uma concentração média em torno de 250.000 células por microlitro, ocupando aproximadamente 0,3% do volume total do sangue. Em decorrência da sua estrutura, as plaquetas são células extremamente sensíveis, que respondem ao mínimo estímulo e realizam as seguintes funções: impedem inicialmente o sangramento através da formação de tampões plaquetários e estabilizam esses tampões, catalisando reações de coagulação que conduzem à formação de fibrina, a qual adere à superfície da massa de plaquetas. Quando ativadas por estímulos fisiológicos ou externos, as plaquetas iniciam as suas funções tornando-se viscosas ou adesivas, sofrendo em seguida mudanças de forma, acompanhadas de contração interna e liberação de grânulos para o meio dentre os quais a adenosina difosfato (ADP) e a serotonina, que estimulam a agregação irreversível e a formação de trombos de plaquetas fundidas (Hanson e Harker, 1996; Guyton, 1976; Kim et al., 1987).

As hemáceas são geralmente consideradas como participantes passivos no processo de formação de trombos, uma vez que a sua atuação ocorre através do escoamento do sangue em contato com a superfície do vaso já danificado. Por esse motivo, o processo de interação entre as hemáceas e as superfícies artificiais tem sido considerado de menor importância, e portanto recebido pouca atenção nos estudos das interações do sangue com os materiais (Hanson e Harker, 1996).

Os leucócitos possuem várias funções em inflamações, infecções e resposta às interações do sangue com superfícies artificiais. As interações das células brancas com dispositivos com grande área superficial pode ser extensa, resultando na sua expressiva remoção da circulação sanguínea. Em geral a sua importância na formação de trombos em relação às suas outras funções permanece indeterminada (Hanson e Harker, 1996).

As proteínas são moléculas orgânicas construídas a partir de vinte aminoácidos primários que se combinam em sequências diversas para a sua formação, conferindo-lhes grande versatilidade em suas funções. Cada molécula protéica possui uma seqüência linear

própria de aminoácidos porém, tanto o comprimento das cadeias quanto a sequência dos aminoácidos diferem muito de proteína para proteína. Mais importante que a estrutura particular característica da proteína é o fato que existe um único arranjo tri-dimensional da sequência de aminoácidos para cada proteína. Esse arranjo espacial resulta na localização preferencial interna dos resíduos hidrofóbicos, enquanto os resíduos polares e ionizados ficam na porção externa da proteína, em contato com a fase aquosa. Portanto, são estes resíduos externos que interagem inicialmente com a superfície, sendo que as proteínas normalmente envolvidas na adsorção sobre biomateriais são as proteínas solúveis presentes no plasma sanguíneo (Horbett et al., 1996).

A adsorção de proteínas sobre biomateriais é geralmente não específica, em consequência dos numerosos sítios de ligação disponíveis para estabilizar a adsorção. Portanto, a adsorção de proteínas sobre superfícies poliméricas geralmente envolve ligações não específicas com interações dos tipos hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Essas múltiplas possibilidades de ligação podem resultar na desnaturação da proteína adsorvida, a qual é a principal causa para a irreversibilidade termodinâmica do processo de adsorção.

A adsorção de proteínas que ocorre quando os componentes do sangue são expostos às superfícies poliméricas exhibe as seguintes características (Jozefonvicz e Jozefowicz, 1990; Horbett, 1993; Horbett et al., 1996):

- a concentração de proteína na superfície é maior que a do fluido biológico que a contém;

- as diferentes proteínas competem para a adsorção. Essa competição é controlada termodinamicamente ou cineticamente. No último caso, a natureza da camada de proteína adsorvida muda com o tempo. Como cada proteína possui afinidade diferente em relação a cada tipo de superfície, o resultado da competição é diferente em cada superfície;

- a seletividade do processo de adsorção conduz ao enriquecimento da fase superficial de uma proteína versus outra. Essa característica está relacionada com a atividade de superfície intrínseca de cada proteína (consequência da sequência de aminoácidos e da estrutura tri-dimensional);

- a estrutura de cada proteína individual adsorvida sobre a superfície polimérica muda com o tempo como resultado do processo de desnaturação da proteína. Além do mais, a ligação de cada molécula de proteína é diferente, dependendo das regiões de ligação envolvidas no processo de adsorção. Como consequência, a energia livre de adsorção não é constante, variando com o tempo e com os sítios de ligação;

- as isotermas de adsorção não obedecem às leis simples. Elas mudam com a natureza das misturas protéicas, tempo e a natureza dos diferentes sítios de ligação na superfície do polímero e a proteína;

- a adsorção de proteínas sobre superfícies poliméricas é altamente irreprodutível. É uma função do processamento do material o qual, por sua vez, controla a distribuição das heterogeneidades locais dos sítios de ligação;

- normalmente a monocamada de proteína adsorvida é a quantidade limite que pode ser adsorvida;

- a proteína adsorvida pode causar a adesão das células, através de ligações específicas entre receptores celulares-proteína, como por exemplo a ligação entre receptores de plaquetas-fibrinogênio.

A cinética da adsorção de proteínas sobre superfícies sólidas geralmente consiste de uma fase inicial muito rápida que é limitada pela difusão, seguida por uma fase lenta próxima ao valor do estado-estacionário.

A adsorção predominante de proteínas tais como cininogênio de alto peso molecular e seus complexos é responsável pela ativação do processo de coagulação sanguínea. A ativação do sistema de complemento seguido pela resposta imune celular e humoral também pode resultar do processo inicial de adsorção de proteínas.

As interações entre as plaquetas e as superfícies são controladas pela natureza da camada de proteína adsorvida. As proteínas de adesão do plasma para as plaquetas são: fibrinogênio, fibronectina e vitronectina; no caso dos materiais poliméricos a principal proteína de ligação é o fibrinogênio. Quando as proteínas de adesão estão dissolvidas no plasma a ligação só ocorre se as plaquetas forem estimuladas, entretanto proteínas

adsorvidas sobre superfícies podem se ligar mesmo a plaquetas não estimuladas. Acredita-se que a adsorção seletiva dessas proteínas às superfícies sintéticas, em competição com as outras proteínas não adesivas que também tendem a adsorver, medie a adesão das plaquetas às superfícies (Jozefonvicz e Jozefowicz, 1990; Horbett, 1993; Horbett et al., 1996).

3.4 – MECANISMOS DE RESPOSTA À DISTÚRBIOS NA CIRCULAÇÃO DO SANGUE

Três são os mecanismos de resposta à distúrbios na circulação do sangue: hemostase, trombogênese e coagulação. A hemostase é a interrupção espontânea do sangramento ou hemorragia de vasos sanguíneos danificados, que se contraem imediatamente, promovendo em segundos a adesão de plaquetas pela ligação de trombócitos ao colágeno exposto, e a formação do tampão plaquetário.

A trombogênese é um estado alterado da hemostase, que compreende a formação de trombos. O trombo vermelho se assemelha ao coágulo sanguíneo formado *in vitro* e é composto, em sua maior parte, de uma rede de fibrina misturada com plaquetas e células vermelhas do sangue.

A coagulação do sangue ocorre em uma seqüência de reações proteolíticas, conhecida como cascata de coagulação. Em cada passo, um fator coagulante sofre proteólise, tornando-se ativo e subsequentemente ativando o próximo fator até que finalmente um coágulo de fibrina insolúvel seja formado. A coagulação do sangue pode ocorrer através de dois mecanismos: intrínseco e extrínseco. No primeiro caso a formação de trombos ocorre através de reações de superfícies. O mecanismo extrínseco é iniciado por fatores derivados dos tecidos. Os dois mecanismos convergem para uma trajetória comum, que leva à formação da rede insolúvel de fibrina (Hanson e Harker, 1996).

3.5 - INTERAÇÕES DO SANGUE COM MATERIAIS E O MECANISMO DE COAGULAÇÃO

Quando superfícies artificiais são colocadas em contato com o sangue, o mesmo processo benéfico que atua impedindo a hemorragia de vasos sanguíneos danificados na

hemostase, agora atua produzindo conseqüências adversas, como a coagulação sangüínea. O estágio inicial é a adsorção de proteínas solúveis do plasma, seguido da deposição e agregação das plaquetas. O trombo formado em superfícies artificiais possui os mesmos componentes que o formado em superfícies naturais, ou seja: plaquetas, fibrina, células vermelhas e células brancas. Entretanto, o tamanho, a estrutura e a relação entre os componentes podem ser diferentes. A formação e o crescimento dos trombos são influenciados pelo tipo de superfície e pela taxa do fluxo sangüíneo.

As interações entre o sangue e os materiais envolvem um conjunto complexo de reações interdependentes entre a superfície e componentes do sangue, tais como plaquetas e proteínas de coagulação. O processo é localizado na superfície por sistemas complexos de ativação e inibição, tal que a fluidez do sangue em circulação é mantida. A Figura 2 ilustra o processo de coagulação que ocorre em decorrência do contato inicial do sangue com superfícies artificiais.

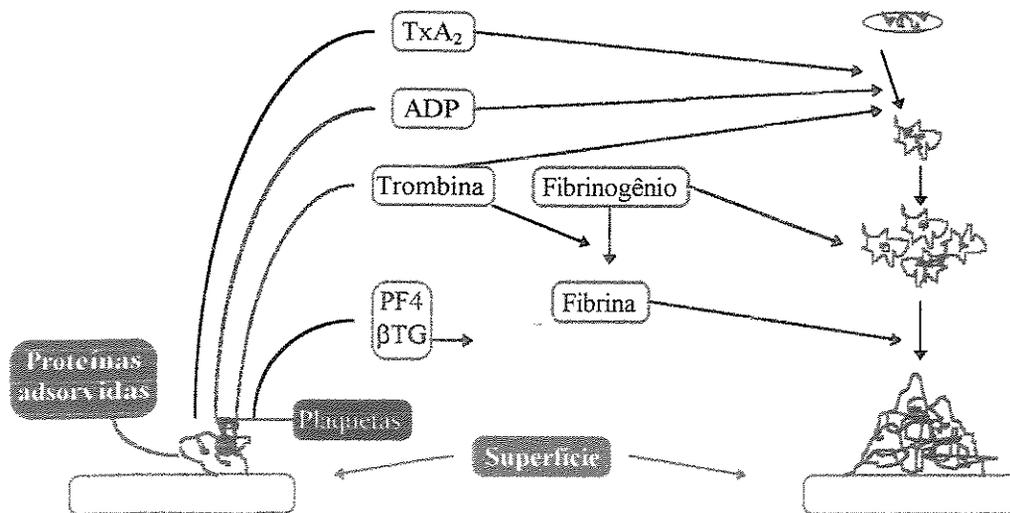


Figura 2: Interações do sangue com superfícies artificiais. (Adaptação de Hanson e Harker, 1996).

O processo de coagulação do sangue é iniciado pela adsorção de proteínas do plasma sobre a superfície artificial. A adsorção predominante de proteínas tais como o cininogênio de alto peso molecular e seus complexos é responsável pela ativação do processo de coagulação (Jozefonvicz e Jozefowicz, 1990). Seguindo a adsorção de proteínas, ocorre a adesão de plaquetas e liberação de seus componentes tais como os grânulos, que incluem proteínas específicas tais como o fator plaquetário 4 (PF4) a β -tromboglobulina (β TG), bem como a adenosina difosfato, ADP (Hanson e Harker, 1996).

Após a adesão das plaquetas, uma série de reações é iniciada, envolvendo a liberação de ADP, formação de pequenas quantidades de trombina e geração da proteína tromboxano A_2 (TxA_2). ADP, trombina e TxA_2 promovem a agregação das plaquetas, produzindo a atividade coagulante, a qual inclui a expressão dos fosfolipídios de membrana, o que acelera o processo de coagulação e a formação da trombina. Neste estágio, a trombina também ativa diretamente as plaquetas, e gera, a partir do fibrinogênio, a fibrina, a qual adere à superfície das plaquetas, estabilizando a massa do agregado plaquetário (Hanson e Harker, 1996).

3.5.1 – MECANISMOS DE COAGULAÇÃO

A cascata de coagulação é composta de reações nas quais os fatores inativos, designados por algarismos romanos, tornam-se enzimaticamente ativos pelo contato com a superfície ou após a clivagem por outras enzimas. Os fatores ativados são designados pela letra “a” após o algarismo romano (por exemplo Fator Xa).

A figura 3 apresenta um esquema das interações entre os fatores de coagulação envolvidos em ambos os mecanismos intrínseco e extrínseco, seguido da trajetória comum, compondo assim a chamada cascata de coagulação.

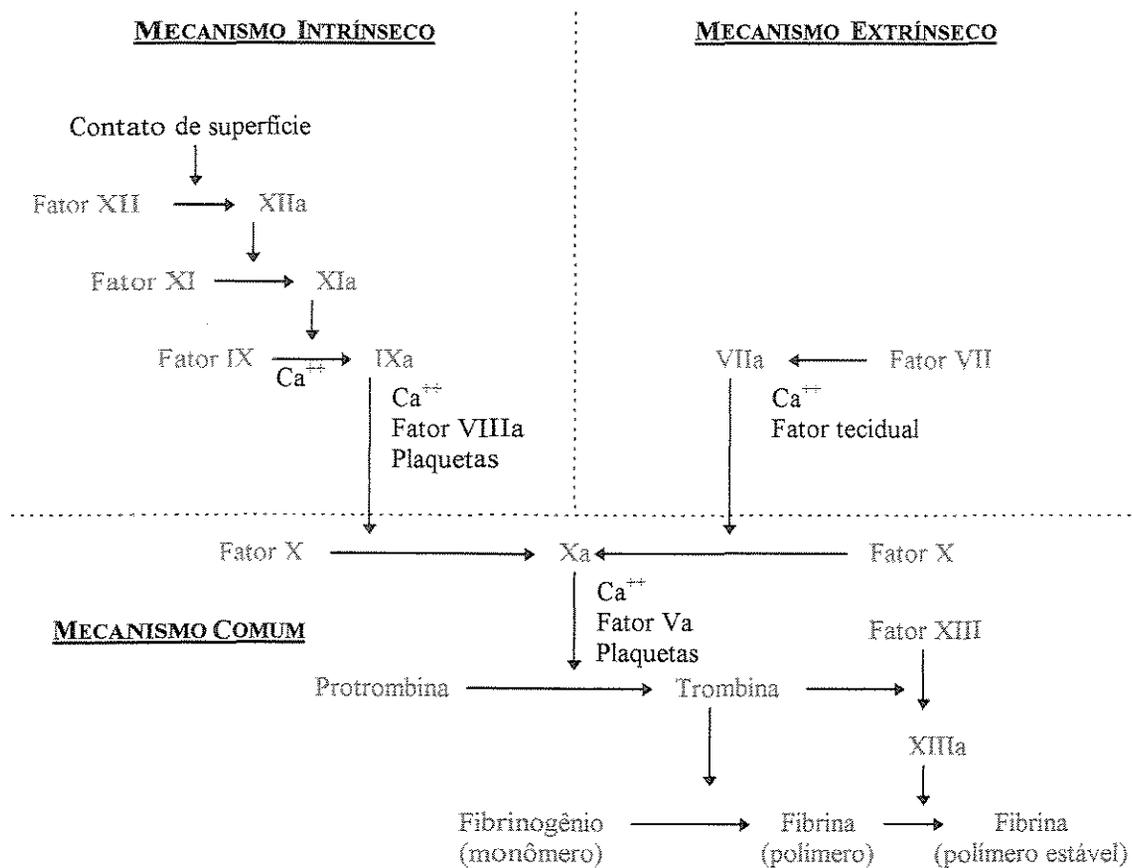


Figura 3: Mecanismos de interações dos fatores de coagulação. A coagulação é iniciada pelo mecanismo intrínseco ou extrínseco, com subsequente interações de fatores, os quais convergem para um mecanismo final comum (Adaptação de Hanson e Harker, 1996).

3.5.1.1 – MECANISMO DE COAGULAÇÃO INTRÍNSECO

A ativação da cascata intrínseca é acionada pela exposição de superfícies não compatíveis aos componentes do sangue. O Fator XII é capaz de se ligar às superfícies e sofrer uma transição conformacional a Fator XIIa, o qual possui um centro de serina ativo. Alternativamente, o Fator XII pode se converter a Fator XIIa através de quebras proteolíticas, produzindo diversos produtos. Uma vez que essa enzima é formada, ela é capaz de hidrolisar o Fator XI, o plasminogênio e a pré-caliceína, desta forma ativando os mecanismos de coagulação, fibrinolítico e de produção de cinina respectivamente.

A pré-caliceína circula no sangue ligada ao cofator cininogênio de alto peso molecular na proporção 1:1. O Fator XIIa cliva a pré-caliceína, sendo esta convertida na serina protease caliceína. A presença do cofator é essencial para a ligação da pré-caliceína a uma superfície carregada negativamente e, na presença do Fator XIIa, ocorre a rápida produção de caliceína. Uma vez que essa enzima é formada, ela quebra a cadeia polipeptídica simples do cininogênio de alto peso molecular, liberando uma substância potente, a bradicinina, que age como vasodilatador, aumenta a permeabilidade capilar e reduz a pressão arterial.

O Fator XI circula no sangue ligado ao cininogênio de alto peso molecular na proporção 1:1. O Fator XIIa age sobre ele, convertendo-o na serina protease Fator XIa. A transformação é realizada através da cisão de ligações específicas nas cadeias polipeptídicas. A presença do cofator é essencial para a ligação do Fator XI a uma superfície carregada negativamente para que, na presença do Fator XIIa, ocorra rapidamente a produção do Fator XIa. Uma vez que essa enzima é formada, ela interage com o Fator IX, convertendo-o no Fator IXa.

A ativação do Fator X pelo Fator IXa ocorre a uma taxa rápida e é realizada através da ação do cofator Fator VIIIa na presença de íons Ca^{+2} e sobre uma superfície celular plaquetária.

O plasminogênio é também ativado pelo Fator XIIa, formando a serina protease plasmina. A plasmina é capaz de provocar a lise do coágulo de fibrina, iniciando a fibrinólise sistêmica (Soff e Rosenberg, 1993).

3.5.1.2 - MECANISMO DE COAGULAÇÃO EXTRÍNSECO

A ativação da cascata extrínseca é iniciada através do contato dos componentes do sangue com os fatores teciduais. O fator tecidual é uma proteína de membrana presente principalmente sobre as superfícies das células musculares lisas e fibroblastos subendoteliais. As superfícies celulares que normalmente estão em contato com os

componentes do sangue, tais como células endoteliais e leucócitos, também possuem fatores teciduais, mas esses são inacessíveis, a menos que uma enzima proteolítica ou um dano à membrana torne-os disponíveis.

O fator tecidual é capaz de formar um complexo estável com a proteína plasmática Fator VII. O que ocorre é uma alteração conformacional do Fator VII quando ele se liga aos fatores teciduais, formando o Fator VIIa. Esta interação aumenta a afinidade do Fator VII pelo Fator X e intensifica a habilidade daquela proteína em provocar a proteólise do Fator X. É também possível que o Fator VII seja clivado proteoliticamente para produzir uma serina protease ativa. Subsequentemente, o Fator X é ligado ao complexo Fator VII-fator tecidual via interação dos fosfolípidios teciduais na presença de íons Ca^{+2} . O Fator X é então convertido a Fator Xa, resultando no mecanismo comum de coagulação do sangue (Soff e Rosenberg, 1993).

3.5.1.3 - MECANISMO COMUM

Uma vez que as cascatas de coagulação produziram quantidades suficientes do Fator Xa, essa enzima converte a protrombina em trombina. A molécula da protrombina possui um sítio para a ligação com o Fator Va, que permite que ela se ligue à superfície das plaquetas ativadas. A cadeia leve hidrofóbica do Fator Va se liga ao fosfolípido da membrana das plaquetas, facilitando assim a formação do complexo com o Fator Xa; a cadeia pesada, por sua vez, liga-se a protrombina. É importante observar que a ativação das plaquetas não é necessária para a ligação do complexo Fator Va-Fator Xa à superfície delas, mas é essencial para a ligação da protrombina a esses elementos celulares. O efeito líquido de todas estas interações leva ao desenvolvimento de dois eventos: a formação de uma significativa concentração local de enzima e substrato próxima ou sobre a superfície das plaquetas, e o aumento na taxa de transformação quando há a formação do complexo Fator Va-Fator Xa se comparado com a taxa obtida quando o Fator Xa se encontra livre na solução.

Subseqüentemente, a protrombina deve ser ligada ao complexo enzimático em uma configuração que permita a ela ser convertida em trombina. A concentração de reagentes e a alta eficiência catalítica do complexo protrombinase (Fator Va-Fator Xa e Ca^{+2}) parece ser suficiente para acelerar em até 300.000 vezes a taxa de conversão da protrombina em trombina, fazendo com que este processo ocorra em segundos. Imagina-se que o efeito estimulante seja manifestado devido a exposição de um sítio adicional de ligação da protrombina, adjacente ao complexo Fator Va - Fator Xa, ou devido a disponibilidade da protrombina, causada pela sua imobilização, para o complexo protrombinase. A taxa de produção de trombina é também fortemente relacionada com a extensão de ativação das plaquetas, que é o substrato sólido onde ocorre essa reação.

Com a formação da trombina ocorre a conversão do fibrinogênio, uma proteína plasmática, em fibrina. A fibrina pode se ligar ao fibrinogênio e formar o complexo solúvel fibrina-fibrinogênio. As interações também podem ocorrer entre as moléculas de fibrina. Os polímeros resultantes das interações fibrina-fibrina podem crescer gradualmente e tornarem-se insolúveis. Essa rede de fibrina é mantida através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. O modelo fraco dos polímeros de fibrina pode ser facilmente desfeito pela adição de agentes tais como uréia ou ácido monocloroacético. Em uma etapa subsequente do mecanismo de coagulação o Fator XIII é ativado através da ação da trombina. Essa enzima age sobre as moléculas da rede de fibrina, fazendo com que elas sejam ligadas através de ligações cruzadas covalentes, sendo esta estrutura não mais susceptível a ação de desnaturantes (Soff e Rosenberg, 1993).

3.6 - CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES DO SANGUE COM BIOMATERIAIS

Diariamente, milhares de dispositivos feitos de materiais sintéticos ou materiais naturais processados são colocados em contato com o sangue humano, nos quais os requisitos de hemocompatibilidade são indispensáveis. Esses dispositivos incluem bombas de oxigenação extracorpórea usada em procedimentos cirúrgicos, hemodialisadores, catéteres, próteses e implantes. A avaliação da hemocompatibilidade dos materiais não é simples, sendo dificultada por vários fatores tais como: a complexidade das

respostas sangüíneas ainda não completamente elucidadas, a geometria dos dispositivos, a carência de métodos sistemáticos de avaliação da trombose local e o alto custo dos testes envolvidos. Além disso, a maioria dos testes *in vitro* ou *in vivo* que propõe a avaliação da hemocompatibilidade leva em consideração somente algumas das interações sangue-material, dificultando as interpretações dos dados obtidos quer pelo número de interações consideradas, ou pela carência de entendimento físico e biológico mais profundo de tais interações.

As interações sangue-material (ISM), tais como adsorção, absorção, adesão, desnaturação e ativação, ocorrem sob condições definidas de tempo de exposição, composição e fluxo sangüíneo. Como cada uma dessas variáveis influencia as interações, geralmente não se pode extrapolar resultados obtidos sob determinadas condições de teste para outras condições diferentes, usar testes de curta duração para prever resultados de longa duração e prever o desempenho *in vivo* de um dispositivo baseado somente em testes de hemocompatibilidade do material.

Apesar das limitações, de uma maneira geral, os estudos das ISM têm fornecido informações úteis para a construção de dispositivos e, de forma limitada, permitem a predição do seu desempenho em humanos. Nenhum material pode ser considerado simplesmente hemocompatível ou não trombogênico, visto que esta característica dependerá muito das particularidades dos testes utilizados. De fato, sob condições de fluxo sangüíneo lento (baixo cisalhamento), ou estase, a maioria, senão todos os materiais poliméricos, podem estar associados a coagulação sangüínea local e, desta forma, serem considerados trombogênicos. Isto ocorre porque materiais sintéticos, ao contrário do endotélio, não conseguem inibir a trombose e a coagulação através da produção e liberação de inibidores ou através da inativação das substâncias pró-coagulantes.

Para a caracterização das interações *in vitro* e *in vivo* deve-se inicialmente possuir um conhecimento aprofundado das propriedades do material. Em geral, os testes *in vitro* envolvem a deposição de sangue ou plasma em um recipiente composto do material a ser testado ou a circulação do sangue através de um dispositivo no qual ocorra o contato com o

material sob condições bem definidas de fluxo, semelhantes às condições de fluxo fisiológicas. Esses estudos têm fornecido informações sobre como proteínas e plaquetas são transportadas e interagem com superfícies artificiais. Os testes *in vitro* são normalmente de curta duração e são altamente influenciados pela fonte do sangue, métodos de manuseio e o uso de anticoagulantes. Testes mais simples podem ser feitos através da adsorção de proteínas purificadas do plasma na superfície dos materiais.

Nos testes *in vivo* os materiais são inseridos por um pequeno período de tempo nas artérias ou veias de animais. Como as respostas sangüíneas diferem tanto qualitativa quanto quantitativamente para humanos e também a hemodinâmica do modelo não pode ser controlada ou medida, a maioria desses testes são de relevância limitada. Outro problema que pode ocorrer é um trauma no vaso sangüíneo ou um dano ao tecido, causando a formação do trombo no local através do mecanismo de coagulação extrínseco. Desta forma, esses testes também fornecem pouca informação para a seleção de materiais para uso em humanos. Uma alternativa para os testes *in vivo* é colocar uma tubulação com uma região do material a ser testado entre uma artéria e um vaso ou entre artérias de um animal. Uma vez implantados, esses tubos podem permanecer por longos períodos de tempo sem o uso de anticoagulantes. Estes sistemas apresentam vantagens tais como: controle e medição do fluxo sangüíneo, possibilidade de utilização do sangue nativo ou anticoagulado, e avaliação dos testes de curta e longa duração, incluindo os efeitos locais e sistêmicos. Assim, a utilização desses modelos, particularmente usando primatas, os quais são hematologicamente similares ao homem, pode predizer as interações sangue-materiais em humanos (Hanson e Ratner, 1996).

3.7 - MODIFICAÇÕES NAS SUPERFÍCIES DOS BIOMATERIAIS

Propriedades importantes e fatores do sistema podem influenciar a adsorção de proteínas e subseqüente interações de células na interface biológica dos biomateriais. Em situações em que o fluido encontra-se estático ou em escoamento à baixas vazões, a composição da superfície é o principal fator que influencia a composição e a organização da camada inicial de proteína adsorvida. Para vazões de escoamento mais elevadas, a

topografia e o movimento molecular na superfície podem tornar-se mais importantes, influenciando a resposta às interações com o sangue. Portanto, a superfície do material polimérico exerce uma influência dominante sobre as interações iniciais com o sangue, quer seja através de sua composição, movimentos moleculares ou topografia. Por tempos mais prolongados, a porosidade, a sorção de água ou de lipídios podem tornar-se fatores importantes nas interações do sangue com os materiais em ambos os regimes de baixas ou altas vazões (Hoffman, 1987).

No decorrer dos últimos 10 anos, uma substancial quantidade de pesquisa vem sendo desenvolvida para melhorar a biocompatibilidade de materiais poliméricos em contato com o sangue. Entretanto, uma relação precisa entre a natureza da superfície, a compatibilidade com o sangue e o mecanismo de trombose induzido pela superfície ainda não estão completamente elucidados. Em geral, as modificações na superfície devem ter a espessura mínima necessária para uniformidade, durabilidade e funcionalidade, a fim de não modificar as propriedades funcionais e mecânicas dos materiais (Ratner e Hoffman, 1996).

As superfícies dos materiais podem ser modificadas usando métodos biológicos ou fisico-químicos. As modificações fisico-químicas envolvem a cobertura da superfície com filmes, a interpenetração de moléculas, aditivos com atividade de superfície, ou reação química. Exemplos generalizados das modificações fisico-químicas das superfícies são ilustrados esquematicamente na Tabela 1.

As modificações biológicas envolvem principalmente a ligação de compostos tais como a heparina, albumina, prostaglandinas, etc. A Tabela 2 exemplifica as várias modificações biológicas nas superfícies dos biomateriais.

Tabela 1: Exemplos de modificações físico-químicas de superfícies (Adaptação de Hoffman, 1987).

1. Deposição física de camadas
Poliuretanos, sabões catiônicos, óxidos de polietileno
2. Modificação química
Grupos como heparina, grupos lipofílicos, óxidos de polietileno, esterificação de grupos -OH
3. Enxertos de copolimerização
Hidrogéis, polieletrólitos, copolímeros hidrofílicos/hidrofóbicos, grupos lipofílicos
4. Descarga de plasma
Silanos, fluorcarbonos

Tabela 2: Exemplos de modificações biológicas de superfície (Adaptação de Hoffman, 1987).

1. Pressorção de proteínas
Albumina, fibronectina
2. Imobilização de drogas ou enzimas
Heparina, prostaglandinas, enzimas
3. Cultivo de células
Células endoteliais
4. Pré recobrimento
Sangue fresco

A figura 4 ilustra esquematicamente os vários métodos de modificações nas superfícies dos biomateriais.

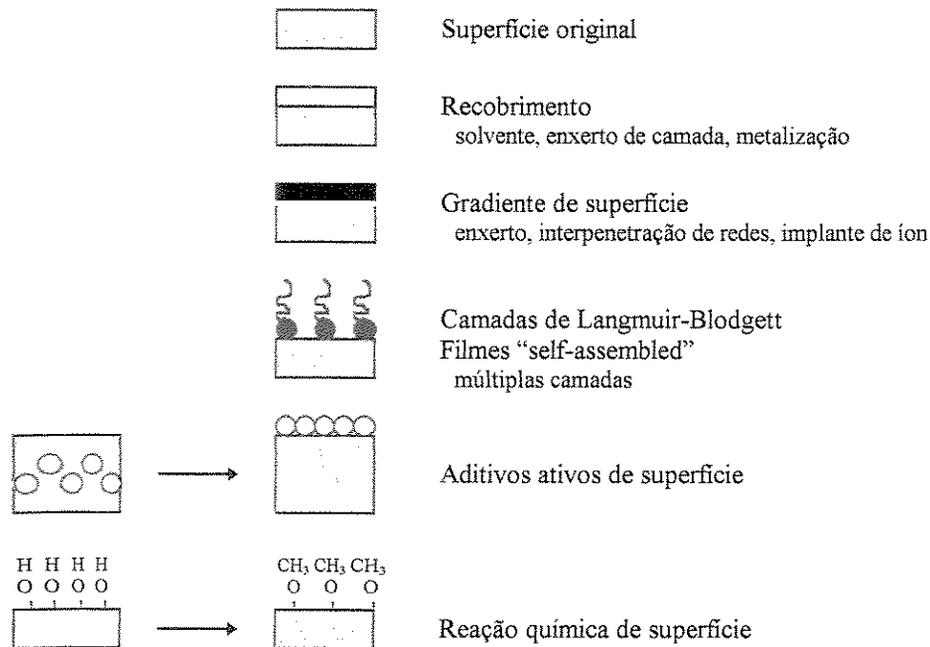


Figura 4: Representações esquemáticas de métodos de modificação de superfícies (Adaptação de Ratner e Hoffman, 1996).

As modificações de superfície com os filmes de Langmuir-Blodgett (filmes de LB) possuem elementos de ambas as técnicas biológica e físico-química. Na última década tem havido um interesse especial por essa técnica, principalmente devido ao surgimento de novos métodos de caracterização do recobrimento.

3.7.1 - DEPOSIÇÃO DE FILMES DE LANGMUIR-BLODGETT

Os filmes de LB cobrem a superfície com uma camada de moléculas altamente organizada. Cada molécula nessa camada contém um grupo de cabeça polar e uma região não polar. As vantagens dos filmes depositados sobre as superfícies por esse método são o elevado grau de ordem e uniformidade. Por outro lado, desde que uma vasta gama de estruturas químicas podem formar os filmes de LB, há muitas opções de incorporação de novos compostos sobre as superfícies. A estabilidade dos filmes pode ser melhorada através de ligações cruzadas ou polimerização das moléculas após a formação do filme.

Vários grupos de pesquisa têm investigado os filmes de LB para aplicações biomédicas (Hayward e Chapman, 1984; Bird et al., 1989; Cho et al., 1990). Estas modificações tem sido amplamente exploradas para melhorar a biocompatibilidade de dispositivos biomédicos e melhorar outros aspectos do seu desempenho.

3.7.1.1 – TÉCNICA DE DEPOSIÇÃO

A técnica para depositar sucessivas monocamadas de moléculas anfifílicas sobre um substrato sólido foi inicialmente demonstrada por Blodgett. O procedimento envolve a imersão e a retirada do substrato a ser revestido em um líquido que contém a monocamada desejada e é geralmente chamado de método de Langmuir-Blodgett. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para várias aplicações e estudos fundamentais, tais como estudos biofísicos e bioquímicos das interações entre células e componentes da membrana (Schürch e Wallace, 1989).

Este método envolve a utilização de uma cuba de teflon que contém barreiras móveis e um medidor de tensão superficial previamente calibrado (Figura 5). Durante o movimento das barreiras ocorre um arranjo das moléculas anfifílicas, formando assim uma monocamada na interface ar-água, com a porção hidrofilica em contato com a água e a porção hidrofóbica em contato com o ar (Figura 6).

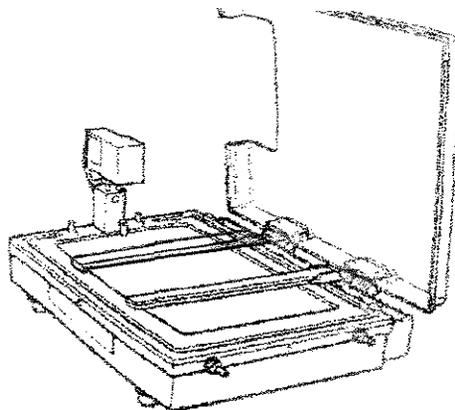


Figura 5: Cuba para a deposição de filmes de LB (Adaptação de Szablewski e Martin, 1995).

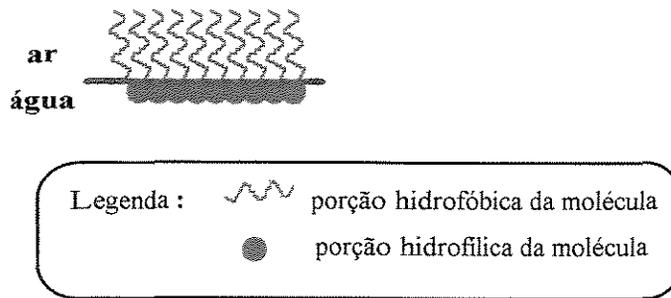


Figura 6: Arranjo das moléculas anfífilas na interface ar-água.

Com o fechamento das barreiras e o empacotamento das moléculas a monocamada pode então ser transferida para o substrato através da imersão e retirada deste do líquido.

A qualidade da superfície e a composição do substrato controlam a natureza das camadas depositadas. A deposição da primeira camada é muito importante devido ao fato dela determinar a maneira através da qual as camadas subseqüentes serão depositadas. Para uma boa qualidade do filme, a monocamada deve ser mantida a uma pressão constante, mesmo quando a transferência está sendo efetuada. Isto é realizado através de um ajuste automático da área entre barreiras, mantendo, deste modo, a pressão de deposição praticamente constante (Szablewski e Martin, 1995).

Algumas vantagens desta técnica de deposição são: geralmente aplicável para a formação de monocamadas sobre estruturas de formas e tamanhos variados, não requer a presença de um solvente adicional e permite o controle da densidade do lipídio na monocamada (Osborn e Yager, 1995).

Em substratos hidrofóbicos a deposição ocorre durante a primeira imersão destes através da interface ar-água. Quando moléculas ativas de superfície estão presentes, suas cadeias hidrocarbônicas alinham-se na superfície do substrato e, deste modo, as caudas são depositadas primeiro (Figura 7).

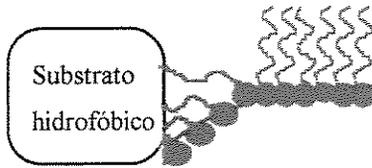


Figura 7: Deposição sobre um substrato hidrofóbico.

Após a deposição satisfatória da primeira monocamada, monocamadas subsequentes podem ser depositadas. São formadas multicamadas mantendo grupos de ligação similares adjacentes isto é, cabeça hidrofílica com cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica com cauda hidrofóbica.

A deposição sobre um substrato hidrofílico não ocorre durante a primeira imersão devido ao seu diferente ângulo de molhabilidade. Normalmente o menisco fica acima do nível da superfície durante esta imersão (Figura 8a), e o ângulo entre o substrato e o líquido é de 90° (Figura 8b,c), não permitindo a deposição das moléculas anfifílicas. Assim sendo, a primeira deposição ocorre durante a retirada do substrato da fase líquida, já que a direção do menisco favorece a cabeça hidrofílica a se ligar à superfície (Figura 8d).

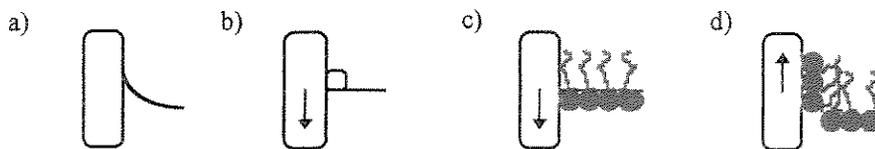


Figura 8: Deposição sobre um substrato hidrofílico.

A maioria das deposições dos filmes de LB segue um modelo cabeça hidrofílica com cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica com cauda hidrofóbica, resultando em estruturas tipo “Y” (Figura 9). Existem outros dois tipos de deposição que foram observadas, tipos “X” e “Z” (Figura 10). A deposição tipo “X” só ocorre na imersão de substratos hidrofóbicos na subfase aquosa, enquanto a tipo “Z” só ocorre na retirada de

substratos hidrofílicos da subfase aquosa. Acredita-se que este último tipo de deposição seja influenciada pelo pH.

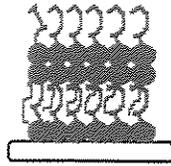


Figura 9: Deposição tipo “Y” sobre um substrato hidrofílico.



Figura 10: a) deposição tipo “X” , b) deposição tipo “Z”.

A taxa de transferência é uma medida importante de quão eficiente um filme está sendo transferido para um substrato. A taxa de transferência (TR) é dada por:

$$TR = (\text{Área da monocamada removida da subfase a pressão cte.}) / (\text{Área do subst. imersa na fase líquida}) \quad [1]$$

Esta taxa é normalmente medida em cada passagem do substrato na interface ar-água. Entretanto, deve-se lembrar que a medida da TR é um valor total de toda superfície imersa. É possível, por exemplo, medir uma TR de 0% se 100% de deposição ocorre em uma face do substrato e 100% do filme é retirado da outra face (Szablewski e Martin, 1995).

Moléculas em solução estão sujeitas a forças de atração. Na subfase aquosa essas forças são iguais, entretanto, em interfaces as forças são diferentes, e o efeito líquido é a atração das moléculas para a subfase aquosa, como pode ser observado na Figura 11. Esse efeito dá origem à tensão de superfície.

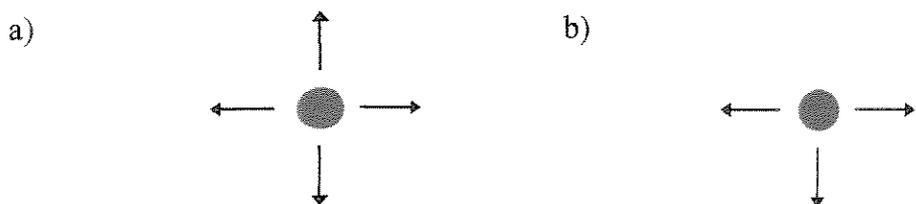


Figura 11: Forças de atração atuando sobre moléculas em solução: a) forças atuando na subfase; b) forças atuando na interface.

A tensão de superfície pode ser definida como o trabalho necessário para expandir a superfície isotermicamente por unidade de área. A tendência de acúmulo em interfaces das moléculas ativas de superfície diminui a tensão superficial, favorecendo a expansão da interface. Essa redução da tensão superficial é conhecida como pressão superficial (Π), e é dada por:

$$\Pi = \gamma - \gamma_0 \quad [2]$$

onde: γ é a tensão superficial do líquido na ausência da monocamada e γ_0 é a tensão superficial do líquido com a monocamada.

Desta forma, o comportamento superficial das moléculas ativas de superfície torna possível o monitoramento da pressão de superfície (Π) em função da área ocupada por molécula (A). As características da monocamada sobre a superfície aquosa podem ser estudadas através de medidas das mudanças na tensão superficial durante a compressão da monocamada.

A isoterma normalmente consiste de três regiões distintas, tal como apresentado na Figura 12. Na ausência de pressão externa à monocamada, essa comporta-se como um gás bi-dimensional. Com o início da compressão da monocamada, inicia-se um maior ordenamento molecular e, neste caso, as moléculas comportam-se como um líquido bi-dimensional. Com o contínuo fechamento das barreiras, o aumento da pressão provoca um maior ordenamento molecular e as moléculas apresentam-se bem orientadas e empacotadas, comportando-se de forma semelhante a um sólido. Esse estado é

normalmente caracterizado por uma relação linear entre a pressão e a área molecular. Através da extrapolação da inclinação da reta correspondente a fase sólida até o ponto onde a pressão é zero e a reta intercepta o eixo das abscissas, pode-se obter a área hipoteticamente ocupada por uma molécula (A_0).

Com o contínuo aumento da pressão, pode-se obter a pressão de colapso (Π_C), na qual o filme perde irreversivelmente sua forma monomolecular. A força exercida torna-se muito grande para o confinamento em duas dimensões e as moléculas são ejetadas do plano da monocamada para dentro da subfase aquosa (moléculas mais hidrofílicas) ou para fora, na superfase (moléculas mais hidrofóbicas).

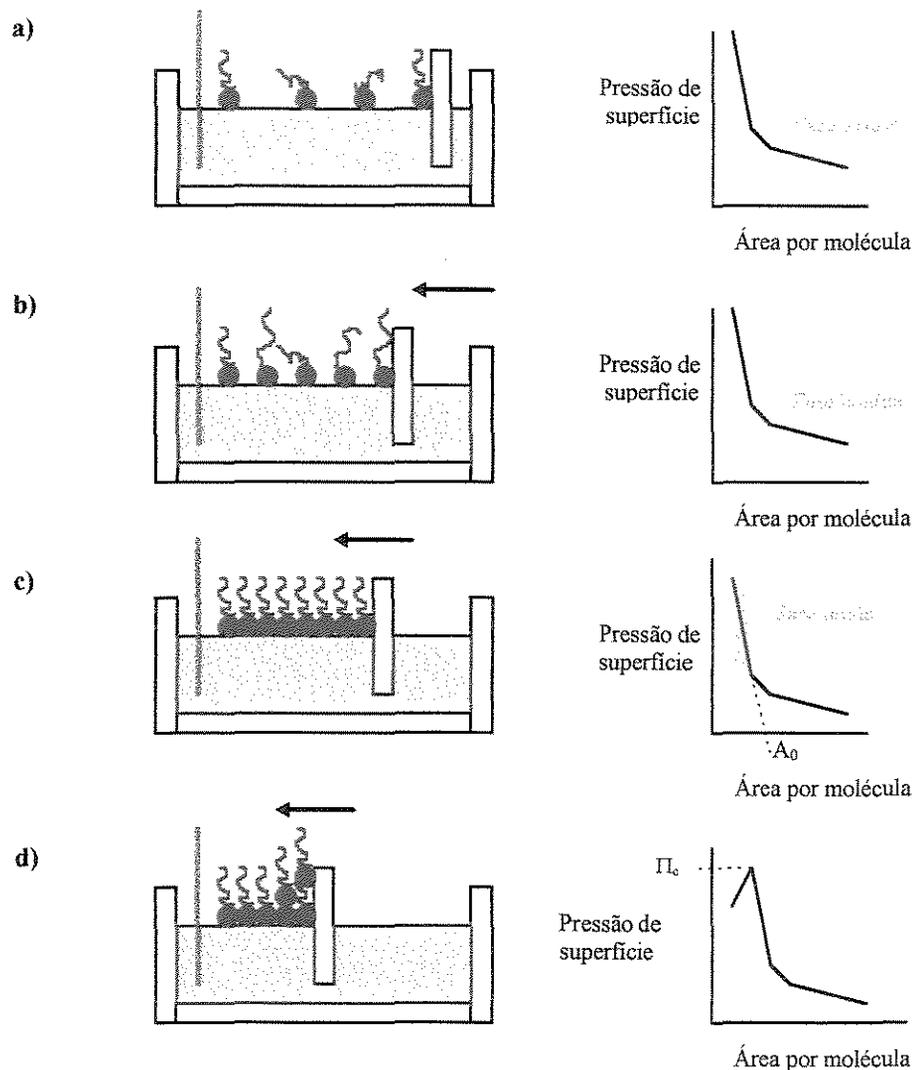


Figura 12: Arranjos das moléculas de lipídios sobre a subfase aquosa: a) o filme de

lipídios “flutua” sobre a camada aquosa (fase gasosa), b) O filme de lipídios é inicialmente comprimido por uma barreira móvel (fase líquida), c) aumento da compressão e empacotamento das moléculas (fase sólida, obtenção da área ocupada por molécula = A_0), d) colapso do filme de lipídios (obtenção da pressão de colapso = Π_C).

As isotermas dependem fortemente da temperatura e transições de fase diferentes podem ser observadas com a sua variação. Um exemplo típico é apresentado na Figura 13 para o ácido esteárico, onde observa-se as diferenças entre as isotermas com a variação da temperatura.

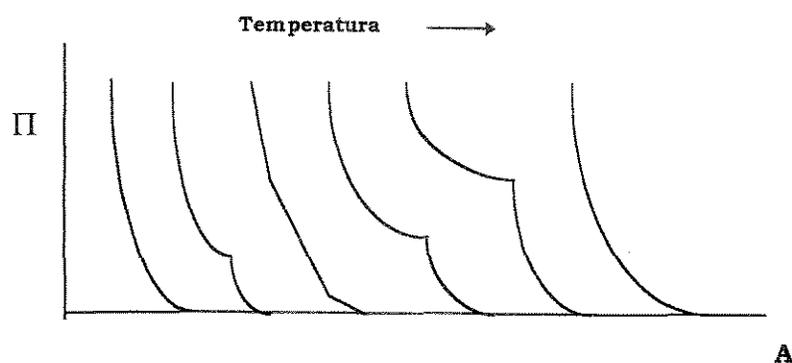


Figura 13: Mudança de forma da isoterma de $\Pi \times A$ com o aumento da temperatura para o ácido esteárico. (Adaptado de Hann, 1990)

3.7.1.2 - CARACTERIZAÇÃO DO RECOBRIMENTO

A principal dificuldade na caracterização dos filmes de LB é que não existe um método simples para analisar quantitativamente a deposição dos fosfolipídios sobre as superfícies (Regen et al., 1983), principalmente devido a pequena quantidade de material depositado. Algumas técnicas utilizadas para a caracterização dos filmes de LB são revistas a seguir. Os estudos apresentados na literatura mostram a caracterização do recobrimento principalmente através de medidas do ângulo de contato e microscopias de força atômica e eletrônica de varredura (Desai e Hubbell, 1991; Hui et al., 1995; Osborn e Yager, 1995;

Regen et al., 1983; Schürch e Wallace, 1989; Van der Heiden et al., 1998; Zasadzinski et al., 1991).

3.7.1.2.1 - ÂNGULO DE CONTATO

As medidas de ângulo de contato sobre as superfícies antes e após o recobrimento podem fornecer uma indicação de modificação na hidrofiliabilidade da superfície analisada.

Um dos métodos mais utilizados para a determinação do ângulo de contato é o da praca de Wilhelmy. A base dessa técnica é o equilíbrio que ocorre no ponto de contato na interface sólido/líquido/vapor ou sólido/líquido/líquido. A medida do ângulo de contato pode ser feita através do método estático ou dinâmico. No método estático não há movimento da interface sólido/líquido durante a medida. O método dinâmico é composto de medidas do ângulo de avanço, obtido com a imersão da amostra na fase líquida, e de retrocesso, obtido com a retirada da amostra da fase líquida. Ambos os ângulos são calculados através dos perfis de força versus distância de imersão da placa. A partir desses perfis é feita uma regressão linear para cada um dos ciclos de avanço e retrocesso, dando origem aos parâmetros “a” e “b”, coeficientes linear e angular respectivamente, de onde podem ser calculados o ângulo de contato θ e a espessura da placa ε . Os parâmetros “a” e “b” são definidos como:

$$a = \gamma p \cos\theta \quad [3]$$

$$b = \rho L \varepsilon g \quad [4]$$

onde: γ é a tensão superficial, p é o perímetro molhado da placa, θ é o ângulo de contato, ρ é a densidade do líquido, L é a largura da placa, ε é a espessura da placa e g é a aceleração da gravidade.

Quando ocorre uma diferença entre a força medida na imersão e na emersão da amostra, ocasionando diferentes ângulos de contato de avanço e de retrocesso, diz-se que

há a histerese do ângulo de contato. Existem duas classes de histerese, a verdadeira ou termodinâmica e a cinética. Na histerese verdadeira a curva de histerese é reprodutível através de muitos ciclos e é independente do tempo ou frequência. Nesse caso, as curvas são independentes do nível de imersão ou condições (Figura 14). Na histerese cinética a curva muda com o tempo ou frequência e os múltiplos ciclos de medidas não são repetidos (Figura 15). Um exemplo para a histerese cinética é um polímero inicialmente seco que sofre hidratação com o tempo, mudando seu peso e sua molhabilidade.

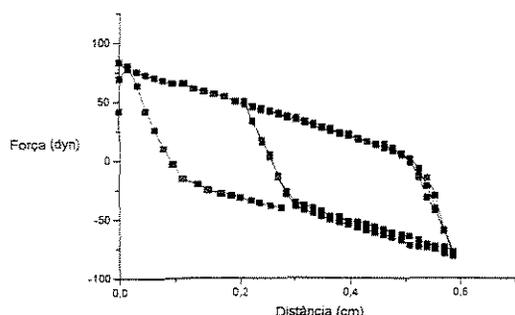


Figura 14: Histerese verdadeira do ângulo de contato.

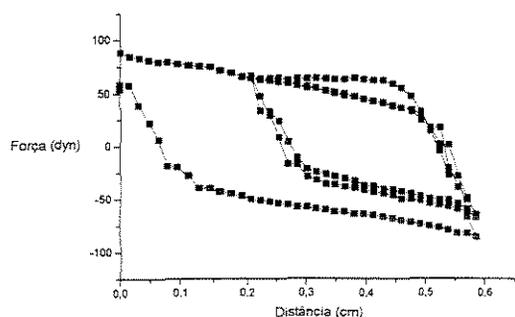


Figura 15: Histerese cinética do ângulo de contato.

Se a interação entre as fases líquida e sólida é muito rápida ou extremamente lenta em comparação com o tempo de medida, então não há diferença entre os ângulos de contato e a histerese não será observada.

Num sistema ideal, onde não é observada a histerese, as seguintes condições devem ser obedecidas (Andrade et al., 1985):

- a superfície do sólido deve ser rígida e não deformável. Na prática isto significa que o módulo de elasticidade do sólido deve ser maior que $3,5 * 10^5 \text{ dyn/cm}^2$. Deformações na superfície podem resultar na histerese do tipo verdadeira ou tipo cinética;

- a superfície sólida deve ser altamente lisa (regular). Estudos experimentais sugerem que se a superfície é regular ao nível de $0,1 \mu$ este efeito é desprezível. A rugosidade da superfície provoca a histerese do tipo termodinâmica;

- a superfície sólida deve ser uniforme e homogênea, isto é, não deve possuir regiões com grandes variações de energia livre de superfície (tal como algumas regiões hidrofílicas e outras hidrofóbicas). A heterogeneidade da superfície provoca a histerese do tipo termodinâmica;

- a tensão superficial do líquido deve ser conhecida e constante e não mudar durante o experimento;

- a superfície do sólido não deve interagir com a fase líquida, isto é, o líquido não deve hidratar a superfície sólida nem mesmo na região superficial. O líquido não deve causar a extração do material da fase sólida para a fase líquida, a qual causaria uma mudança na tensão superficial do líquido ou na tensão interfacial sólido/líquido. Quanto maior a penetração do líquido na superfície sólida, maior é a histerese, e é do tipo cinética;

- a superfície sólida deve ser rígida e imóvel para que os grupos de superfície não possam se reorientar ou reequilibrar em resposta a mudanças no ambiente. A histerese aumenta com o aumento da tendência de reorientação das moléculas da superfície e é do tipo cinética.

Normalmente quando são utilizadas as medidas do ângulo de contato para polímeros, elas apresentam histerese, provocando dificuldade na interpretação dos resultados (Andrade et al., 1985).

3.7.1.2.2 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As interações de curto e longo alcance entre macromoléculas e grupos macromoleculares são de grande importância para o entendimento do comportamento

dinâmico de sistemas biológicos. Muitas interações têm sido estudadas detalhadamente usando aproximações termodinâmicas e cinéticas. Entretanto, há pouca informação sobre como a energia de interação entre duas estruturas é distribuída no espaço devido a dificuldade de medir explicitamente a energia de interação como função da distância de separação. O modo mais direto de obtenção desse tipo de dado é medindo a força (derivada da energia em relação a distância) entre duas estruturas, o que pode ser feito através do microscópio de força atômica (MFA).

A microscopia de força atômica é uma técnica relativamente nova, inventada pelos físicos Gerd Binnig e Heinrich Rohrer na década de 80, e usada para medir forças intermoleculares entre objetos na escala nanométrica através de uma cerâmica piezoelétrica, e produzir imagens topográficas de superfícies. O princípio envolvido no MFA é a utilização de uma sonda com raio de curvatura tipicamente da ordem de 10 a 100 nm, que mede interações locais com alta resolução espacial, podendo ser aplicado à superfícies altamente heterogêneas. Devido a sua relativa facilidade de uso e disponibilidade comercial é uma das técnicas mais utilizadas atualmente.

Basicamente, o MFA consiste de um bloco ótico e de uma base. Um diagrama esquemático de um MFA típico pode ser observado na Figura 16. O motor, os parafusos de alinhamento e o dispositivo de varredura são instalados na base, e a amostra é colocada na parte superior do dispositivo de varredura. O bloco ótico contém uma janela na parte superior, um feixe de laser, espelhos e um fotodetector. Uma alavanca flexível é fixada na parte superior da base com uma ponta afiada posicionada sobre a amostra. A alavanca e a ponta podem ser microfabricadas de silício, óxido de silício ou nitrato de silício. Um microscópio ótico ou uma câmera ótica ligada à janela permite a observação da alavanca para o alinhamento do feixe de laser e para o posicionamento da ponta sobre as áreas de interesse na amostra.

Com relação ao contato com a amostra, o sistema opera nos modos contato e não contato. No modo contato é medida a força de repulsão entre a ponta e a amostra através da deflexão da alavanca. Essa deflexão é controlada pela constante elástica da alavanca e pela

magnitude da força. A deflexão pode ser medida através de vários métodos, mas o mais utilizado é o da deflexão ótica. Através dessa técnica um feixe de laser é refletido da alavanca para um fotodetector, o qual transforma o sinal em imagem. A rugosidade da superfície da amostra causa diferenças na leitura do sinal, produzindo a imagem topográfica da superfície.

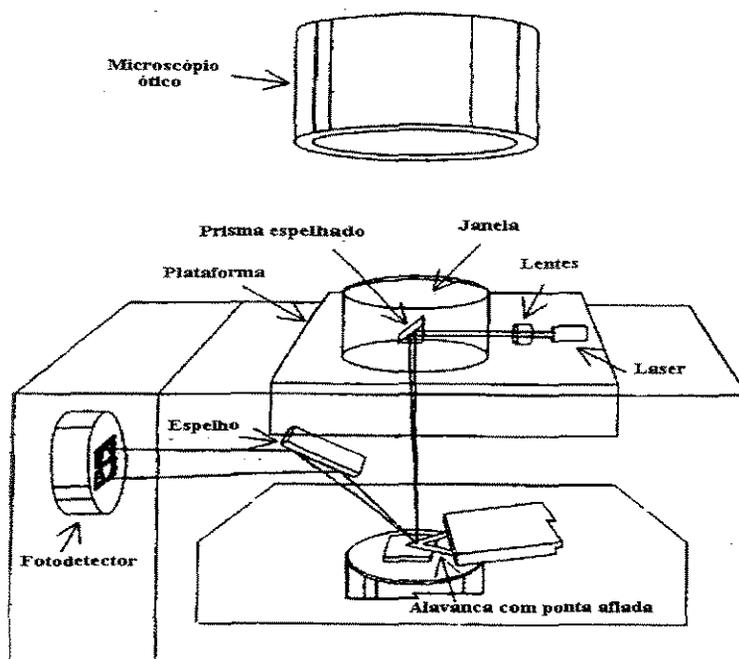


Figura 16: Diagrama esquemático de um MFA típico (Adaptado de Magonov e Whangbo, 1996).

O MFA pode também produzir imagens e medir interações de longo alcance, tais como de van der Waals, eletrostáticas e magnéticas, com a ponta a uma distância relativamente grande da amostra, através do modo não contato.

A microscopia de força atômica é um importante instrumento para a representação e observação das características da superfície. Nenhuma outra técnica fornece imagens com resolução similar para tal variedade de superfícies, sendo inclusive empregada para análise de amostras não condutoras, como é o caso dos polímeros. Além disso, as medidas podem

ser feitas em ambientes secos, líquidos ou no vácuo (Di Nardo, 1994; Magonov e Whangbo, 1996; Cooke et al., 1996; Heinz e Hoh, 1999).

3.7.1.2.3 - OUTRAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Uma rápida avaliação da estrutura em um filme de LB pode ser feita através da observação deste filme entre polarizadores cruzados em um microscópio ótico. Para a obtenção de uma sensibilidade razoável, essa técnica requer que a espessura do filme seja de pelo menos 500 nm. Em tais filmes, somente o empacotamento e a orientação dos cristais podem ser determinados.

Técnicas de microscopia eletrônica também têm sido utilizadas para caracterizar o recobrimento de superfícies com os filmes de LB. A difração eletrônica foi primeiro utilizada para investigar mono e multicamadas de filmes de ácidos graxos e seus sais. Trabalhos mais recentes utilizam essa técnica para estudo de materiais poliméricos e biológicos, e filmes de LB contendo grupos aromáticos. Têm-se utilizado a difração eletrônica de transmissão e a difração eletrônica de alta energia de reflexão. Alguns trabalhos utilizam simplesmente técnicas de varredura ou transmissão.

A espectroscopia fotoeletrônica de raio-X também pode ser utilizada. Nessa técnica a superfície da amostra é irradiada por uma fonte de raios-X de baixa energia. Desta forma realiza-se a fotoionização na amostra produzindo fotoelétrons de uma distribuição de energia característica. Devido ao fato dos raios-X normalmente não causarem muito dano à superfície, essa técnica é escolhida como técnica analítica para materiais orgânicos (Petty, 1990).

3.7.1.3 - TIPOS DE MOLÉCULAS FORMADORAS DOS FILMES DE LB

Os filmes de LB são formados por um arranjo ordenado de moléculas, normalmente capazes de formar monocamadas insolúveis na interface ar-água. Essas moléculas são chamadas de anfífilicas ou anfipáticas. As moléculas anfífilicas possuem uma porção

hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar) que são suficientemente grandes para que cada uma apresente um comportamento próprio relativo à solubilidade em diversos solventes.

A estrutura biológica mais estudada pela técnica de LB é a membrana celular. O entendimento de sua composição, estrutura e dinâmica tem sido usado para elucidar suas funções *in vivo*. Por esse motivo, a maioria dos estudos envolvendo a técnica de Langmuir-Blodgett utiliza moléculas semelhantes às encontradas na membrana celular tais como: ácidos graxos, fosfolipídios, esteróis e proteínas.

3.7.1.3.1 - FOSFOLIPÍDIOS

A membrana celular externa que fica em contato com o sangue é composta por fosfolipídios agregados em bicamadas. A representação esquemática da distribuição dos principais fosfolipídios nas membranas das plaquetas e dos eritrócitos pode ser vista na Figura 17.

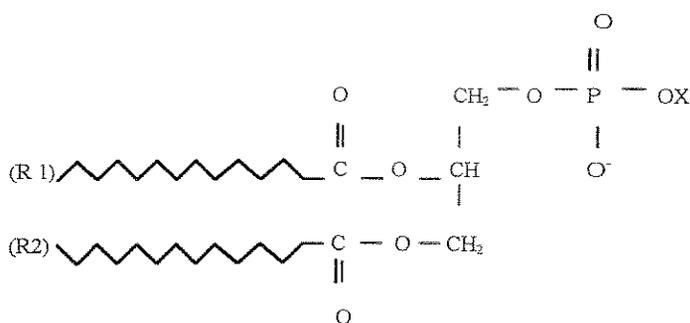


onde: PE = fosfatidiletanolamina, PC = fosfatidilcolina, SM = esfingomielina
* = fosfatidilserina e fosfatidilinositol

Figura 17: Representação esquemática da distribuição assimétrica dos fosfolipídios das membranas celulares externas das a) plaquetas, b) eritrócitos (Adaptação de Hayward e Chapman, 1984).

Os fosfolipídios possuem um caráter anfipático e a sua molécula apresenta uma ponte glicerol fazendo a ligação entre um par de cadeias hidrofóbicas e a cabeça polar hidrofílica (Figura 18).

Os fosfolípidios mais utilizados são os derivados dos ácidos graxos mirístico, palmítico e esteárico, com comprimentos de cadeia de hidrocarboneto de 14, 16 e 18 respectivamente. Estes fosfolípidios são usados tanto na forma de colina como de etanolamina, formando moléculas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE).



Nome comum	Grupo X
fosfatidilcolina (PC)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Fosfatidiletanolamina (PE)	$ \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^+ \text{H}_3 $

Figura 18: Estrutura química da molécula de fosfolípido. A estrutura do grupamento X difere de acordo com o fosfolípido.

Devido às várias geometrias moleculares e diferentes propriedades de solubilidade, as moléculas anfífilicas formam estruturas muito variadas em misturas aquosas. As fases dependem predominantemente da concentração da molécula anfífilica, sua estrutura molecular e temperatura. Além disso, esses sistemas são conhecidos por exibir a coexistência de diferentes fases dependendo da composição.

A Figura 19 ilustra os vários modelos de empacotamento para as moléculas anfifílicas.

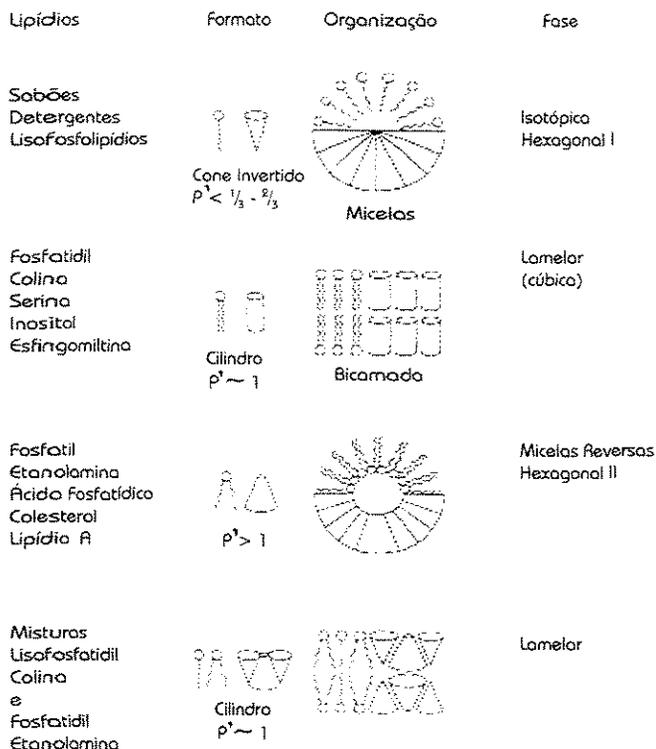


Figura 19: Modelos de empacotamento para algumas moléculas anfifílicas (Adaptação de Lasic, 1993).

Em soluções aquosas, a agregação das moléculas inicia-se na concentração de micela crítica (CMC). Essa é a concentração mínima na qual o primeiro agregado aparece. Na CMC, tensoativos de cadeias simples agregam-se em micelas, que são estruturas esféricas nas quais as extremidades apolares das moléculas agregam-se umas às outras no interior, enquanto as extremidades polares projetam-se da periferia dos agregados para o interior do solvente polar, normalmente água (Figura 19).

Em contraste com a maioria dos tensoativos de cadeia simples, os lipídios de cadeia hidrocarbônica dupla (com mais de 8 átomos de carbono) não formam micelas porque ela é muito volumosa para ser acomodada dentro da região central relativamente pequena. Desta

forma, essas moléculas agregam-se normalmente em estruturas de bicamadas lamelares (Figura 19).

Uma forma para prever o tipo de estrutura formada na agregação das moléculas anfífilas é dada por:

$$P' = (v') / (a \cdot l) \quad [5]$$

$$\text{e para misturas: } P' = \sum n_i P'_i \quad [6]$$

onde: “P’” é o parâmetro de empacotamento, “v’” é o volume da molécula, “a” é a área da cabeça polar, “l” é o comprimento da cadeia hidrocarbônica, “n_i” é a fração molar da espécie i.

Para lipídios de cadeia simples a cabeça polar é relativamente grande em relação a parte não polar, assim sendo, $v' < a \cdot l$, e eles arranjam-se em micelas esféricas ou em forma de hastes. Lipídios de cadeia hidrocarbônica dupla são caracterizados por $v' \sim a \cdot l$, arranjando-se melhor em estruturas lamelares, tais como lamelas, micelas em formato de disco ou grandes lipossomas. Para os lipídios com cabeças polares relativamente pequenas (por exemplo a fosfatidiletanolamina), $v' > a \cdot l$, isto é, $P' > 1$, e eles tendem a arranjar-se em estruturas inversas (Figura 19).

As moléculas de fosfatidilcolina arranjam-se em bicamadas lamelares e a área da superfície da sua cabeça polar é 71 \AA^2 (Israelachvili e Mitchell, 1975).

As moléculas de fosfatidiletanolamina arranjam-se preferencialmente em fases tipo hexagonal II (H_{II}). Esta fase é caracterizada por um arranjo hexagonal de cilindros, os quais são formados com os grupos de cabeça da molécula localizados na região interna do cilindro e as cadeias laterais hidrocarbônicas direcionadas radialmente para fora desta superfície. A água preenche a região central do cilindro (Figura 19). A formação da fase hexagonal II é favorecida pelos aumentos da temperatura e da concentração da fosfatidiletanolamina. Os cilindros da estrutura H_{II} possuem 56 \AA de diâmetro (Litman,

1973). A fosfatidiletanolamina pode também se arranjar em bicamadas lamelares, sendo que este arranjo é mais instável. A área de superfície da sua cabeça polar em estruturas hexagonais invertidas totalmente hidratadas é de aproximadamente 41 \AA^2 a 55°C , podendo esse valor diminuir a temperaturas mais baixas (Israelachvili e Mitchell, 1975).

Com relação ao empacotamento, os lipídios podem ainda ser classificados como não condensáveis, isto é, quando a área de superfície da cabeça polar é maior que a área apolar, ou condensáveis, quando a porção apolar é maior que a polar. Segundo Israelachvili e Mitchell, 1975, as fosfatidiletanolaminas formaram estruturas altamente instáveis e compressíveis, caracterizando empacotamentos do tipo condensáveis, enquanto que as fosfatidilcolinas foram consideradas do tipo não condensáveis, por formarem estruturas mais rígidas, resistindo à compressão das suas moléculas.

3.7.1.4 - ESTUDOS COM FILMES DE LB DE FOSFOLIPÍDIOS

As pesquisas com filmes de Langmuir-Blodgett de fosfolipídios são relativamente recentes, datando da década de 70.

Alguns estudos foram realizados envolvendo as moléculas de fosfatidiletanolamina. Em 1973, Green et al. estudaram a deposição de multicamadas de lipídios sobre teflon ou vidro através da difração de raios-X e espectroscopia de infravermelho. As camadas somente foram depositadas em pressões de superfície altas, de forma que a monocamada encontrava-se no estado condensado, e as multicamadas depositadas foram do tipo "X". Os resultados indicaram que o grau de orientação molecular nos filmes depende da classe de lipídio utilizado e do comprimento da cadeia de hidrocarboneto. As multicamadas de PE depositadas apresentaram-se extremamente regulares.

Hasmonay et al., em 1979, estudaram a deposição de multicamadas de ácido fosfatídico e suas misturas com o DPPE sobre vidro. A transferência das camadas foi realizada com sucesso na presença de íons Ca^{+2} , à pressão de 25 dina/cm. Essas camadas

apresentaram-se regulares quando obtidas através de misturas com composições de 55-45% e 40-60% de ácido fosfatídico e DPPE respectivamente.

Zasadzinski et al., em 1991, estudaram a deposição de bicamadas de DMPE sobre mica. Imagens obtidas por microscopia de força atômica em água das regiões polares da bicamada formada mostraram que a bicamada possui uma alta ordem orientacional de longo alcance. Observou-se também que as moléculas foram depositadas em blocos ou fileiras espaçadas por aproximadamente 0,7 a 0,9 nm, com vários defeitos e buracos. A área ocupada por molécula foi de 0,4 nm².

Em 1995, dois outros estudos foram realizados. Hui et al. estudaram a estrutura, estabilidade e defeitos das bicamadas de LB de DSPC, DPPE e DLPE (dilinoleoil-fosfatidilcolina) sobre mica. O lipídio escolhido para formar a primeira camada foi o DPPE devido a sua estabilidade sobre esse substrato. A caracterização do recobrimento através de microscopia de força atômica mostrou que as monocamadas de DPPE apresentaram elevações paralelas com periodicidade de aproximadamente 0,49 nm, correspondente aos grupos de cabeças polares alinhadas. As monocamadas de DSPC e DLPE não apresentaram nenhum ordenamento molecular.

Knapp et al., 1995, também realizaram microscopias de força atômica sobre substratos de mica (superfície hidrofílica), monocamada de DPPE sobre mica (superfície hidrofóbica) e monocamada de DPPC sobre monocamada de DPPE sobre mica, em condições de umidade controlada. Através de imagens obtidas por microscopias de força atômica, observou-se que a monocamada de DPPE sobre mica é relativamente estável e homogênea, com a presença de poucas falhas. A monocamada formada pode ser removida somente a altas forças de varredura (~ 100 mN). A camada depositada de DPPC sobre a monocamada inicial de DPPE sofreu colapso durante a sua transferência, causando a formação, nessas regiões, de bicamadas de DPPC, resultando em 3 camadas sobre a mica. Os resultados também demonstraram que as camadas com as caudas hidrofóbicas expostas são mais estáveis, uma vez que o contato com a ponteira do microscópio de força atômica as manteve intactas. Por outro lado, a ponteira penetrou na superfície polar, danificando-a.

A terceira camada pode ser facilmente removida, mesmo com o uso de baixa força de varredura, da ordem de nN. O uso de ponteiros hidrofóbicos mostrou-se de grande utilidade, já que elas permitiram a diferenciação entre áreas hidrofílicas e hidrofóbicas da amostra, auxiliando na identificação das camadas lipídicas.

Outros estudos foram feitos envolvendo as moléculas de fosfatidilcolina. Em 1985 Tamm e McConnell estudaram a deposição de bicamadas de DMPC, DPPC e DOPC (dioleoilfosfatidilcolina) sobre substratos de vidro, quartzo e silício. Eles observaram que as bicamadas formadas eram fisicamente muito parecidas com mono e bicamadas de lipídios de sistemas já conhecidos. As bicamadas formadas em condições de temperatura e pressão adequadas mostraram-se uniformes e contínuas quando observadas através de microscópio ótico. Pequenos defeitos foram visualizados somente através de técnicas de maior resolução.

Em 1989, Schurch e Wallace estudaram a deposição de mono e bicamadas de filmes de DPPC através da técnica de LB sobre substratos de vidro. A qualidade dos filmes formados foi avaliada através de medidas do ângulo de contato. Os resultados mostraram que as monocamadas formadas eram de alta qualidade e homogêneas, e que uma característica importante da deposição era a emersão do substrato da fase aquosa sob baixa velocidade. As pressões de deposição estudadas para a monocamada foram de 25, 15 e 10 mJ/m². Foi observado que não houve deposição quando a pressão de 10 mJ/m² foi utilizada. A bicamada foi depositada sobre a monocamada homogênea inicialmente depositada e observou-se que a exposição da cabeça polar do fosfolípido ao ar, mesmo que por uma fração de segundos, causava a reorientação das moléculas sobre a superfície, tornando-a hidrofóbica. Através de medidas do ângulo de contato foi concluído que ou a bicamada era muito menos homogênea que a monocamada ou que o fluido utilizado para a medida, o dibutil ftalato (DBP), causava a destruição da bicamada.

Okamura et al., em 1993, estudaram a deposição de filmes de monocamadas e de cinco camadas de DPPC sobre substratos de vidro. As imagens obtidas por microscopia eletrônica indicaram que as monocamadas depositadas em pressões de até 30 mN/m

apresentaram-se homogêneas. À pressão de 45mN/m observou-se heterogeneidades, talvez devido a colapsos locais causados pela alta pressão. As imagens obtidas para cinco camadas mostraram a formação de estruturas do tipo cristais, muito diferentes daquelas obtidas para a monocamada, permitindo-se concluir que a microestrutura da superfície depende da espessura do filme e da pressão aplicada ao filme.

Saint Pierre e Dupeyrat, em 1983, propuseram uma nova técnica a qual utiliza a medida da energia do processo de transferência durante a deposição da monocamada sobre o substrato. A medida consiste no registro da força em função da imersão e emersão do substrato sólido, definido como ciclo do processo de transferência. Através dessas medidas pode-se avaliar qual o tipo de deposição que está sendo realizada e se as camadas estão fortemente ligadas.

Em 1995 Osborn e Yager estudaram a energia de transferência de duas monocamadas de fosfolipídios sobre dióxido de silício (SiO_2). Foram realizadas medidas do ângulo de contato e microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que a bicamada pode ser depositada com reprodutibilidade somente em um intervalo limitado de pressão de superfície, próximo à pressão de colapso. As microscopias mostraram também que a bicamada apresentou muitos defeitos de ponto e de linha, indicando que a transferência da segunda camada foi incompleta.

Chapman forneceu uma grande contribuição para os estudos do recobrimento de superfícies com fosfolipídios neutros. Em 1984, juntamente com Hayward, propuseram o aumento da biocompatibilidade das superfícies através da mimetização das superfícies externas das membranas celulares. A mimetização foi realizada através da polimerização de fosfatidilcolinas sobre diversos materiais. A polimerização dos grupos PC ocorria através de radiação ultra violeta após eles serem depositados sobre o substrato através da técnica de Langmuir-Blodgett. Em 1993, Chapman descreveu a estrutura das biomembranas, a matriz lipídica e estudos das monocamadas de LB de lecitina e PE.

3.7.1.5 - ASSOCIAÇÃO DE GRUPOS QUÍMICOS DE FOSFOLIPÍDIOS POR OUTRAS TÉCNICAS

Grupos químicos de fosfolipídios foram também posicionados em superfícies de polímeros através de enxerto e ligação covalente. Em 1986, Chapman e outros pesquisadores, em uma série de artigos, descreveram a síntese de espécies reativas que continham o grupo fosforilcolina e a ligação covalente dessas sobre várias superfícies poliméricas (Durrani et al., 1986); a caracterização da superfície de vidro e sílica recobertas com os grupos fosforilcolina através de medidas de ângulo de contato e espectroscopia de infravermelho (Hayward et al., 1986(a)); a análise da superfície de vários polímeros recobertos com grupos de fosforilcolina através de ESCA (espectroscopia eletrônica para análise química) (Hayward et al., 1986(b)). Em 1992, Chapman e Charles novamente propuseram o recobrimento de polímeros com fosfolipídios neutros, mimetizando as interfaces biologicamente inertes. Foi também observado que somente a cabeça polar hidrofílica do fosfolipídio neutro era essencial para a biocompatibilidade e que superfícies recobertas com os grupos de fosforilcolina não apresentaram ativação do mecanismo intrínseco da coagulação por contato.

Em 1995, Malmsten estudou a adsorção de proteínas sobre superfícies de sílica recobertas com fosfolipídios. O recobrimento da superfície foi feito através da técnica de “spin coating”. Ele observou que a adsorção protéica depende muito da cabeça de grupo polar do fosfolipídio. Em geral, superfícies recobertas com os fosfolipídios neutros PC, PE e esfingomiéline apresentaram uma baixa adsorção de proteínas, enquanto que superfícies recobertas com o fosfolipídio carregado fosfatidilserina (PS) resultou em uma alta adsorção, principalmente de fibrinogênio. Superfícies recobertas com o polímero solúvel em água polietilenoglicol (PEG) também apresentaram uma baixa adsorção protéica, causada pelo chamado mecanismo de estabilização estérico.

Em 1998, Ishihara et al. também estudaram a adsorção de proteínas sobre superfícies recobertas com fosfolipídios. Eles observaram que as superfícies que continham grupos de PC apresentaram uma baixa adsorção protéica se comparados com superfícies poliméricas sem a presença do fosfolipídio. Eles concluíram que esse fato estava

relacionado ao estado das moléculas de água ao redor da superfície, que hidratavam o polímero, minimizando a adsorção de proteínas sobre a superfície.

Van der Heiden et al., em 1998, estudaram o efeito do enxerto de grupos de PC sobre polieteruretano na adsorção de proteínas. Eles observaram um aumento na hidrofobicidade da superfície recoberta com os grupos de PC através de medidas do ângulo de contato. A presença dos grupos de PC produziu um pequeno efeito na adsorção das proteínas à superfície, mas essa adsorção foi consideravelmente menor sobre superfícies pré adsorvidas com vesículas de DOPC. Foi concluído que a presença dos grupos de PC enxertados não foi suficiente para inibir a adsorção das proteínas, sendo necessária a estrutura altamente ordenada das bicamadas dos fosfolípidios naturais para suprimir a adsorção.

3.8 - MECANISMO DA HEMOCOMPATIBILIDADE COM FOSFOLIPÍDIOS

Embora os mecanismos que conduzam à hemocompatibilidade ainda não estejam elucidados, em todos os trabalhos descritos anteriormente foi verificado que as superfícies recobertas com fosfolípidios neutros, quando em contato com o sangue, apresentavam uma baixa adsorção protéica. A ocorrência da baixa adsorção foi atribuída a força de hidratação exercida pelos fosfolípidios. Embora essa força seja tipicamente de curto alcance, nessas situações mostrou-se muito forte, efetivamente reduzindo a proximidade de resíduos peptídicos à superfície dos materiais. As moléculas de água ligam-se à superfície através dos fosfolípidios formando uma barreira, que reduz a energia de adsorção total por molécula de proteína, aumentando assim a hemocompatibilidade (Malmsten, 1995; Ishihara et al., 1998).

3.9 - RECOBRIMENTO COM FOSFOLIPÍDIOS DERIVATIZADOS COM PEG

Atualmente, a associação de polímeros solúveis em água, tal como polietilenoglicol (PEG), adsorvidos ou enxertados na interface entre biofluidos e biomateriais é de grande interesse, devido à sua capacidade de criação de uma barreira estérica que impede a

aproximação de outras macromoléculas e células. Quanto maior for a extensão da concentração das cadeias de PEG, maior é a proteção estérica na superfície. A concentração de PEG na superfície depende das interações laterais entre as suas cadeias. Para aplicações *in vivo* esses polímeros são usados em misturas do tipo polímero-lipídio/lipídio, por exemplo DMPE-PEG/DMPC, em concentrações de polímero-lipídio menores que 15%.

Quando as cadeias poliméricas são enxertadas na superfície pode-se identificar dois regimes de concentração, os quais produzem características físicas diferentes nas superfícies. Se a concentração de polímero for baixa, as cadeias formam estruturas separadas, designadas como “mushrooms”. Para altas concentrações, as cadeias sobrepõem-se lateralmente, formando uma estrutura contínua denominada “brush”. Esses arranjos podem ser observados na Figura 20.

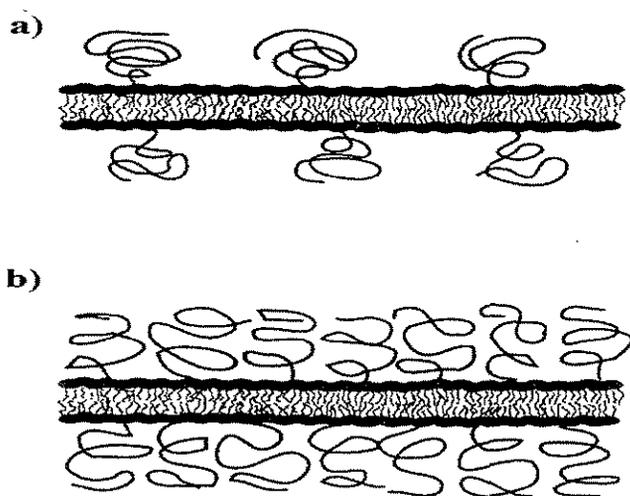


Figura 20: Estruturas formadas em superfícies enxertadas com misturas: a) a baixas concentrações de polímeros, “mushrooms”; b) a altas concentrações de polímeros, “brush” (Adaptado de Hristova e Needham, 1995).

Em processos de adsorção, as misturas do tipo polímero-lipídio/lipídio podem ser transferidas para substratos através da técnica de LB. O recobrimento de superfícies pelas cadeias poliméricas pode ser quantitativamente controlado através da variação da fração

molar dos componentes ou através da área de superfície por molécula na interface ar-água. À baixas pressões, ou baixa densidade de superfície, o polímero permanece na interface misturado com os lipídios. Com o aumento da pressão é alcançada a pressão crítica, na qual o polímero passa de um confinamento em duas dimensões, na interface ar-água, para três dimensões, com as cadeias expandidas para dentro da subfase aquosa. As configurações do PEG na interface ar-água podem ser observadas na Figura 21. Quando as isotermas de pressão versus área por molécula das misturas com PEG são plotadas em um gráfico do tipo logarítmico, observa-se um ponto de inflexão, o qual corresponde à pressão crítica (Π_{pc}) na qual as cadeias do polímero deixam de permanecer na interface e expandem-se na subfase aquosa. Desta forma, acima da pressão crítica torna-se energeticamente mais favorável para as cadeias do polímero estenderem-se na solução aquosa do que permanecerem na interface.

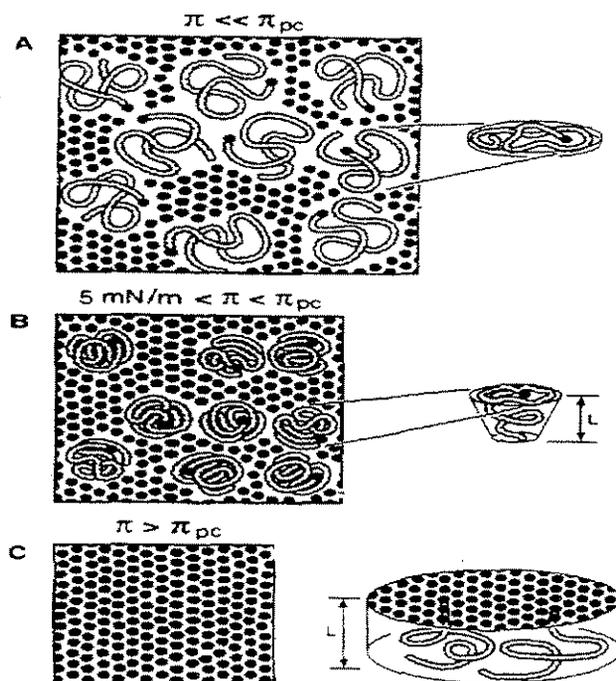


Figura 21: Representação esquemática de uma mistura polímero-lipídio/lipídio na interface ar-água como função da pressão de superfície, Π : (a) cadeias de PEG confinadas na superfície; (b) cadeias de PEG confinadas na superfície e expandidas na subfase aquosa;

(c) cadeias de PEG totalmente estendidas a partir da superfície (Adaptado de Kuhl et al., 1995).

Estudos mostraram que o recobrimento de superfícies com polietilenoglicol é o método mais efetivo para a prevenção da adsorção de proteínas, e também indicaram que sua eficácia depende do grau de polimerização e da densidade do enxerto destes grupos à superfície. Por exemplo, a inclusão de PEG 18500 Da sobre superfícies foi mais efetiva na prevenção da adsorção de proteínas que as cadeias com peso molecular de 5000, 10000 ou 100000. Isto pode ser explicado em termos de volume excluído da interface, mobilidade de superfície, inabilidade do PEG em formar ligações de hidrogênio com solutos e a ausência de interações hidrofóbicas (Lasic, 1993).

3.10 - MISCIBILIDADE DE MISTURAS DE FOSFOLIPÍDIOS

Quando dois compostos são misturados, a miscibilidade entre eles é caracterizada pela interação entre suas moléculas. De acordo com Gaines, 1966, três regimes podem ser considerados, tal como ilustrado na Figura 22.

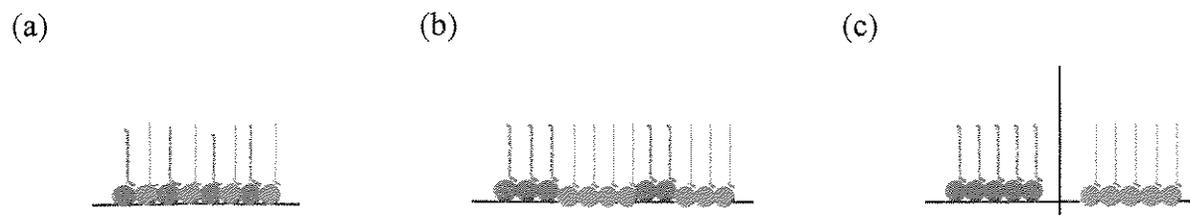


Figura 22: Possíveis distribuições moleculares de misturas: (a) componentes miscíveis; (b) componentes imiscíveis com formação de grupos pequenos de moléculas similares; (c) componentes imiscíveis com separação total das moléculas diferentes (Adaptado de Gaines, 1966).

Na situação de miscibilidade, moléculas diferentes arranjam-se lado a lado em um filme homogêneo, como visualizado na Figura 22 (a). Componentes imiscíveis, por sua vez, formam grupos de monocamadas de moléculas iguais distribuídos na monocamada do

outro componente. As monocamadas de cada componente podem estar completamente separadas, como observado na Figura 22 (c). Entretanto, na maioria dos casos, os grupos de monocamadas são muito pequenos, contendo de centenas a poucos milhares de moléculas; a Figura 22 (b) ilustra essa situação.

A situação de imiscibilidade total, na qual não há interação entre as moléculas, é descrita por equação análoga à de misturas ideais. No caso de filmes de Langmuir-Blodgett à uma determinada pressão, a área por molécula da mistura será a soma das áreas das moléculas isoladas, a qualquer composição da mistura:

$$A_{12} = A_1 * N_1 + A_2 * N_2 \quad [7]$$

onde: A_{12} é a área ocupada por molécula da mistura a pressão desejada, N_1 e N_2 são as frações molares dos componentes na mistura e A_1 e A_2 são as áreas ocupadas por molécula dos componentes isolados à pressão desejada.

Nesta situação, a pressão de colapso é independente da fração molar dos componentes na mistura, e igual à do componente puro de menor pressão de colapso.

A verificação experimental da miscibilidade pode ser feita através das curvas de pressão versus área por molécula características das isotermas de Langmuir. A partir dessas isotermas são construídas curvas de área molecular versus fração molar de um dos componentes da mistura, à pressão constante. Os desvios das curvas obtidas em relação à forma linear da equação [7] indicam miscibilidade e interação entre as moléculas da mistura. Desvios positivos ou negativos em relação à reta caracterizam respectivamente repulsão ou atração entre as moléculas.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - MATERIAIS

- Tubos de PVC comerciais de diâmetro de 1/4", fornecidos pela Braile.
- Lipídios obtidos da Sigma Co.: dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) , dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).
- Dimiristoilfosfatidiletanolamina-poli(etilenoglicol) 2000 (DMPE-PEG₂₀₀₀), sintetizado no desenvolvimento deste trabalho, a partir dos reagentes: polietilenoglicol metil éter (PEG), obtido da Aldrich; 1,1-carbonil diimidazol (CD), obtido da Sigma; trietilamina (TEA), obtido da Analar; DMPE, obtido da Sigma; diclorometano, obtido da Merck.
- Clorofórmio obtido da Synth.
- Metanol obtido da Merck.
- Isopropanol obtido da Synth.
- Detergente isento de fosfato, Extran, obtido da Merck.
- Álcool etílico comercial.
- Água bidestilada e deionizada em sistema milli-Q.

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE PVC

As placas planas foram preparadas a partir de tubos comerciais de PVC de 1/4" de diâmetro interno e espessura de 2 mm. Os tubos de PVC foram cortados em comprimentos de aproximadamente 8 cm e cortados novamente longitudinalmente. Foram então lavados durante dois minutos em água destilada e secos em estufa a 50°C, quando foram colocados no interior de duas placas de vidro presas por presilhas. O sistema foi mantido em estufa a 175±5°C por 10 minutos, quando então foi retirado e resfriado a temperatura ambiente. Em seguida as placas foram cortadas sobre moldes de aproximadamente 2 cm de lados (área de 3,8 cm²). Também foi medida a espessura das placas através de um micrômetro e somente

as placas com espessura entre 0,07 e 0,09 cm foram utilizadas nos experimentos a fim de se minimizar a influência dessa variável no processo de recobrimento. Esses valores foram fixados porque eram os normalmente obtidos segundo a metodologia descrita (Marreco, 1999).

4.2.2 - LIMPEZA DAS PLACAS DE PVC

Foram testados o desempenho de quatro solventes: isopropanol, metanol, etanol e água. As placas de PVC foram primeiramente esfregadas com o auxílio de um papel livre de fibras ou uma gaze, ambos embebidos nos solventes testados para a limpeza, a seguir lavadas com o mesmo solvente por aproximadamente 2 minutos e em seguida com água deionizada durante 3 minutos. Durante os tempos de lavagem as placas eram agitadas no solvente ou na água com o auxílio de uma pinça. A seleção do melhor solvente foi feita através da determinação do grau de hidrofobicidade das placas após a limpeza. O grau de hidrofobicidade foi obtido através de determinações do ângulo de contato antes e após a limpeza, segundo procedimento descrito no item 4.2.7.1.

4.2.3 - MEDIDA DA TENSÃO SUPERFICIAL DA ÁGUA

Foram realizadas medidas na tensão superficial da água a temperatura ambiente com uma placa de platina antes e após as medidas de ângulo de contato para cada placa, a fim de verificar se houve liberação de material da superfície do PVC. Desta forma, para cada nova placa foi realizada a limpeza do recipiente e a troca de água. O equipamento utilizado foi um tensiômetro do tipo K12, fabricado pela Kruss.

4.2.4 - SÍNTESE DO DMPE-PEG₂₀₀₀

A síntese do lipídio DMPE derivatizado com PEG₂₀₀₀ foi feita baseada na patente americana 5.013.556 de 7 de maio de 1991 (Woodle et al., 1991), utilizando a rota química via carbonil diimidazol (CD), com modificações introduzidas por Ribas em 1997.

A rota catalítica de preparação do DMPE-PEG₂₀₀₀ consiste de duas etapas de reação e utiliza o CD como agente de ligação e trietilamina (TEA) como catalisador. A rota de síntese é apresentada na Figura 23.

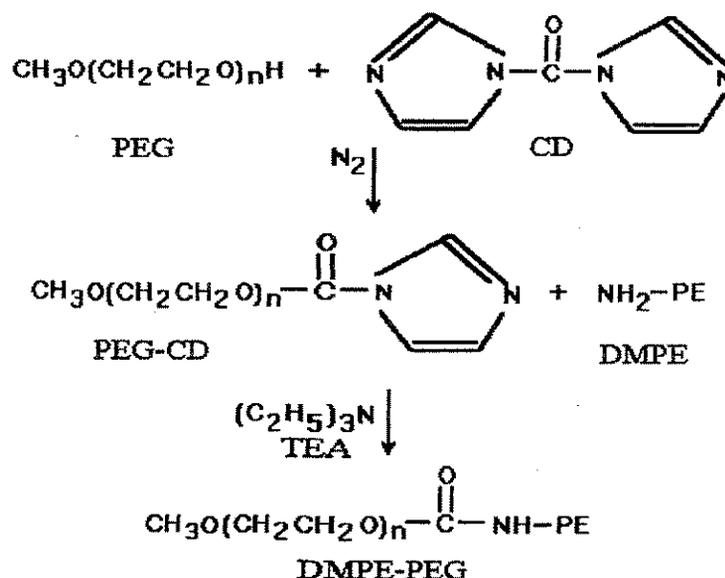


Figura 23: Rota de síntese do DMPE-PEG₂₀₀₀.

Na primeira etapa é obtido, a partir do PEG e do CD, o composto intermediário carbonil diimidazol-polietilenoglicol metil éter, PEG-CD. As condições de reação foram: razão molar 1:1,1 (PEG:CD), temperatura de reação de 75°C e tempo de reação de 16 horas.

Na segunda etapa o composto intermediário é acoplado ao DMPE através da perda de um dos hidrogênios do grupo amina da molécula de DMPE, na presença do catalisador TEA, formando o composto desejado, designado como DMPE-PEG₂₀₀₀. As condições dessa etapa foram: razão molar 2:1 (PEG-CD:DMPE), temperatura de reação de 95°C e tempo de reação de 6 horas.

A etapa posterior é a de purificação do produto, realizada através de cromatografia em coluna de vidro (L=51 cm e D=1,4 cm). A coluna foi empacotada com sílica-gel 60 com tamanho de partícula de 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM), e inicialmente lavada com diclorometano. O produto foi aplicado no topo da coluna e a seguir foi realizada a lavagem da coluna com o seguinte gradiente de solventes (fração volumétrica de diclorometano: metanol com 2% de ácido acético): 100:0 (100 ml), 95:5 (200 ml), 90:10 (200 ml), 85:15 (200 ml), 60:40 (200 ml) e 100:0 (100 ml). As frações foram coletadas em volumes de aproximadamente 50 ml e concentradas em evaporador rotatório. Posteriormente, as frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada para a identificação das frações que continham DMPE-PEG₂₀₀₀ (Ribas, 1997).

As frações contendo o produto desejado foram misturadas e levadas a evaporador rotatório para a remoção do solvente sob vácuo. Ao produto final foi adicionado benzeno e a solução foi congelada e liofilizada. O DMPE-PEG₂₀₀₀ obtido foi pesado e o rendimento foi calculado em relação ao DMPE, que é o reagente limite.

4.2.5 - OBTENÇÃO DAS ISOTERMAS DE PRESSÃO VERSUS ÁREA POR MOLÉCULA

As isotermas de Langmuir, que relacionam pressão versus área por molécula, foram obtidas para os lipídios usados neste trabalho: DMPE, DPPE, DMPC e DMPE-PEG, assim como para as suas misturas. Os experimentos foram realizados em cuba de Langmuir-Blodgett do tipo 611, fabricada pela Nima Technology, Coventry, Inglaterra, descrita no item 3.7.1.1.

Antes dos ensaios a cuba de LB foi limpa cuidadosamente com um papel livre de fibras embebido em clorofórmio e então preenchida com água. As barreiras móveis eram fechadas para a retirada de qualquer espécie de contaminante (fiapos, partículas, etc), detectado através de um aumento na pressão superficial. Foi considerada uma limpeza adequada quando a pressão superficial não excedeu 0,5 mN/m. Após a limpeza as barreiras eram abertas.

Os lipídios foram solubilizados em clorofórmio em uma concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 50 μL de solução era gotejada através de uma microseringa na região central da cuba de LB previamente preenchida com água. Após a evaporação do solvente, detectada pela estabilização na pressão superficial, aproximadamente dois minutos, as barreiras eram automaticamente fechadas a uma velocidade constante de 100 cm^2/min , reduzindo a área ocupada por molécula. Um sistema de aquisição de dados, com interface computacional, registrava continuamente a pressão obtida em função da área entre barreiras. Para a obtenção das isotermas de pressão versus área ocupada por molécula, os valores de área entre barreiras foram divididos pelo número de moléculas presente na monocamada. O número de moléculas presente na monocamada é calculado a seguir utilizando o fosfolipídio DMPE como exemplo. Primeiramente é calculada a massa (m) de fosfolipídio a partir da concentração (C) e do volume (V) da solução:

$$m = C \cdot V = 1 \text{ mg/ml} \cdot 0,05 \text{ ml} = 0,05 \text{ mg}$$

A seguir, o número de moléculas é obtido sabendo-se que o massa molecular do DMPE é de 635,9 g/gmol:

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol} & - & 635,9 \text{ g} & - & 6,02 \cdot 10^{23} \text{ moléculas} \\ & & 0,05 \cdot 10^{-3} \text{ g} & - & x \end{array}$$

$$x = 4,73 \cdot 10^{16} \text{ moléculas}$$

A área entre barreiras é então dividida pelo número de moléculas, no caso do DMPE por $4,73 \cdot 10^{16}$, e também multiplicada por $1 \cdot 10^{16}$ para que sua unidade passe de cm^2 para \AA^2 , resultando nos valores de área ocupada por molécula em $\text{\AA}^2/\text{molécula}$. Cálculos similares foram realizados para os demais fosfolipídios e suas misturas. No caso das misturas o massa molecular foi obtida através da soma de todas as massas moleculares em relação a fração molar utilizada na mistura. Através das isotermas de pressão versus área por molécula foram obtidas a pressão de colapso, Π_c , e a área ocupada por molécula, A_0 , segundo metodologia descrita no item 3.7.1.1.

4.2.6 - DEPOSIÇÃO DOS FILMES DE LANGMUIR-BLODGETT

A deposição dos filmes de LB nas placas de PVC foi feita em cuba do tipo LB descrita no item 3.7.1.1. Antes dos ensaios a cuba era limpa de acordo com procedimento descrito no item 4.2.5.

Os lipídios e suas misturas foram solubilizados em clorofórmio em uma concentração de 1mg/mL. Uma alíquota de 50 μ L de solução era gotejada através de uma microseringa na região central da cuba de LB previamente preenchida com água. Após a evaporação do solvente, detectada através da estabilização da pressão superficial, aproximadamente dois minutos, e o fechamento das barreiras até a pressão desejada, o substrato era imerso e removido da água, dando início aos ciclos de recobrimento da placa com monocamadas de lipídio.

4.2.7 - CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS PLACAS

4.2.7.1 - DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO DINÂMICO

Foram realizados 3 ciclos de medidas para a determinação do ângulo de contato dinâmico das placas em sistemas ar-água, utilizando-se a profundidade mínima de imersão de 2mm e máxima de 6mm e com velocidade máxima de penetração da placa na fase líquida, no caso a água. Essa medida foi realizada à temperatura ambiente, antes e após o recobrimento com os filmes de lipídios. O cálculo dos ângulos de avanço e de retrocesso foram feitos de acordo com metodologia descrita no item 3.7.1.2.1. Como variável resposta foi usada a diferença percentual dos ângulos de contato antes e após o recobrimento, obtida segundo a equação:

$$\text{Variação do ângulo de contato} = [(A_f - A_i) / A_i] * 100 \quad [\%] \quad [8]$$

onde: A_f é o ângulo após o recobrimento e A_i é o ângulo antes do recobrimento.

Na limpeza das placas, descrita no item 4.2.2, a variação percentual do ângulo de contato foi calculada com os ângulos de contato antes e após a limpeza das placas.

Nestes experimentos foi usado um tensiômetro do tipo K12, fabricado pela Kruss.

4.2.7.2 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A técnica de microscopia de força atômica de não contato foi utilizada para a visualização das características das superfícies das placas antes e após o recobrimento.

As placas de PVC foram coladas em um suporte metálico através de uma fita de dupla-face. Esse sistema foi colocado no microscópio de força atômica e a ponta e a alavanca, com o feixe de laser incidindo sobre a ponta, foram aproximados da amostra, no modo não contato, em áreas de 5 por 5, 10 por 10, 20 por 20, 40 por 40 e 80 por 80 μm^2 . Através desse método não há o contato entre a extremidade da ponta e a superfície da amostra, sendo portanto o mais indicado na caracterização de materiais biológicos, uma vez que não produz destruição na superfície da amostra (Zasadzinski et al., 1994). A ponta ficou suspensa a uma distância de 50-100 Å da superfície da amostra e a sua vibração foi realizada a uma frequência constante de 100 a 400 kHz, com amplitude de dezenas de ângstroms. A ponta era microfabricada de tungstênio e a alavanca de nitreto de silício.

O equipamento utilizado foi um microscópio do tipo Autoprobe cp, fabricado pela Park Scientific Instruments. O microscópio era dotado de um sistema de aquisição de dados com interface computacional, cujas imagens eram registradas continuamente.

4.2.8 - TESTE DO TEMPO DE FIBRINA

O aparecimento da rede de fibrina é um dos primeiros eventos na formação de trombos que pode ser observado a olho nu. Quanto mais hemocompatível é a superfície, maior é o tempo decorrido até a formação da rede de fibrina.

Inicialmente as placas foram cortadas em duas partes para que os testes fossem realizados em duplicata. Para esses ensaios foi utilizado sangue humano fresco, obtido através de um furo com lanceta picadora esterilizada descartável, em dedos da mão. Uma gota de sangue de aproximadamente 0,5 ml era depositada rapidamente na placa a ser avaliada. Deixou-se o sangue um minuto em repouso, para um maior contato inicial com a superfície, e após esse tempo a gota era revolvida com a própria lanceta, em movimentos ascendentes, até a verificação, a olho nu, da formação inicial da rede de fibrina. O tempo era medido através de cronômetro. O tempo de fibrina foi determinado como o intervalo a partir do primeiro minuto de contato do material com a superfície, até a formação da rede de fibrina. Um ensaio em branco foi realizado com placas previamente limpas, porém sem recobrimento. Os ensaios foram realizados em ambiente com temperatura controlada.

Como variável resposta foi usada a diferença percentual do tempo de fibrina em relação à superfície não recoberta segundo a equação:

$$\text{Variação do tempo de fibrina} = [(T_{pr} - T_{psr}) / T_{psr}] * 100 \quad [\%] \quad [9]$$

onde: T_{pr} é o tempo médio de formação da rede de fibrina para a placa recoberta e T_{psr} é o tempo médio de formação da rede de fibrina para a placa sem recobrimento.

4.2.9 - DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS IMPORTANTES NO PROCESSO DE DEPOSIÇÃO DOS FILMES

Para a determinação das variáveis mais importantes no processo de deposição dos filmes de LB nas superfícies das placas de PVC, foi realizado um planejamento fatorial fracionário em dois níveis do tipo 2^{4-1} . Foi analisada a influência das variáveis pressão de deposição (P), número de camadas depositadas (N), velocidade de imersão e emersão do substrato da fase líquida (v) e tempo de organização molecular antes do início da deposição (t). A descrição dessas variáveis com seus respectivos níveis inferiores e superiores encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário.

Variável	Limite inferior (-)	Limite superior (+)
Pressão, P [mN/m]	20	40
Número de camadas, N	6	30
velocidade, v [mm/min]	5	10
tempo, t [min]	0	150

Para o planejamento fatorial completo são calculados os efeitos das variáveis mas, no caso do planejamento fatorial fracionário, são calculados contrastes (t). Os valores dos contrastes são obtidos apenas com metade dos experimentos necessários para o fatorial completo, reduzindo, desta forma, tempo e custo no laboratório. O planejamento fatorial fracionário utilizado encontra-se na Tabela 4. Sua geratriz é dada por $I = +1234$, isto significa que a coluna 4 da Tabela 4, correspondente a variável “t”, é dada pela multiplicação das colunas 1, 2 e 3. O emprego da meia fração confunde os efeitos principais com as interações de terceira ordem, por exemplo, o contraste calculado para a variável pressão (t_p) é na verdade a soma do efeito principal P com o efeito de interação Nvt, já que sua geratriz é positiva. Isso não é problemático pois, normalmente, os efeitos de terceira ordem não são significativos, sendo que os contrastes calculados para as variáveis são boas estimativas dos valores reais dos efeitos (Barros Neto et al., 1996). Os contrastes são calculados a partir das respostas obtidas, segundo a equação abaixo:

$$t = 1/4 (R_+) - 1/4 (R_-) \quad [10]$$

onde: R_+ e R_- são respectivamente as respostas obtidas nas linhas correspondentes ao sinal positivo (+) e ao sinal negativo (-) do planejamento fatorial fracionário para a variável em questão.

Tabela 4: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Ensaio	Variáveis			
	P	N	v	t
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

Como variáveis resposta foram usadas a diferença percentual dos ângulos de contato, R_1 , e a variação percentual do tempo de fibrina, R_2 , ambas em relação à superfície não recoberta segundo as seguintes equações:

$$R_1 = [(A_f - A_i) / A_i] * 100 \quad [\%] \quad [11]$$

onde: A_f é o ângulo de retrocesso após o recobrimento e A_i é o ângulo de retrocesso antes do recobrimento. Os valores dos ângulos de contato de retrocesso foram usados por apresentarem um menor desvio, quando comparados com os ângulos de avanço.

$$R_2 = [(T_{pr} - T_{psr}) / T_{psr}] * 100 \quad [\%] \quad [12]$$

onde: T_{pr} é o tempo médio de formação da rede de fibrina para a placa recoberta e T_{psr} é o tempo médio de formação da rede de fibrina para a placa sem recobrimento.

4.2.10 - ESTUDO DA MISCIBILIDADE DAS MISTURAS DE FOSFOLIPÍDIOS

A miscibilidade dos fosfolipídios DMPE, DMPC e DMPE-PEG foi avaliada mediante as curvas de área por molécula versus fração molar de um dos componentes na mistura ($A \times \% \text{molar}$). Os dados de área por molécula foram obtidos através das isotermas

de Langmuir das misturas à uma dada pressão, conforme descrito em 3.10. As curvas de $A \times \%molar$ foram comparadas com a reta obtida de acordo com a equação [7], reescrita abaixo, que representa o comportamento de uma solução ideal, onde não há interação entre as moléculas, e que caracterizam imiscibilidade total:

$$A_{12} = N_1 * A_1 + N_2 * A_2 \quad [7]$$

Outro estudo que pode ser feito através da observação das isotermas de Langmuir das misturas é com relação à pressão de colapso. Se a pressão de colapso das misturas for a mesma e igual a do componente puro que apresenta a menor pressão de colapso, então há a indicação de imiscibilidade entre as moléculas da mistura, como já discutido em 3.10.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - SELEÇÃO DO SOLVENTE DE LAVAGEM

Os resultados das determinações dos ângulos de contato para as superfícies das placas antes e após a lavagem com os quatro solventes testados, metanol, isopropanol, extran e água, são apresentados na Tabela 5. Essa tabela também apresenta os dados de tensão superficial da água medidos com placa de platina antes e após a imersão das placas de PVC para a obtenção dos perfis de força versus profundidade.

Tabela 5: Influência do solvente de lavagem das placas na tensão superficial da água e nos ângulos de contato de avanço e de retrocesso.

Amostra	①		Lavagem	②		[(A _r -A _i)/A _i]*100 [%]
	γ _{H2O} antes γ _{H2O} depois [mN/m]	θ _{avanço} θ _{retrocesso} [°]		γ _{H2O} antes γ _{H2O} depois [mN/m]	θ _{avanço} θ _{retrocesso} [°]	
1	74,53	93,73±0,22	H ₂ O milli-Q	73,94	92,09±0,96	-1,75
	54,67	74,91±0,44		59,48	77,62±0,32	3,62
2	73,35	87,97±0,51	H ₂ O milli-Q	73,67	89,18±0,17	1,38
	55,51	70,17±0,15		54,11	72,37±0,43	3,14
3	73,82	91,05±0,23	isopropanol 70% e H ₂ O milli-Q	73,80	88,40±1,94	-2,91
	54,79	74,84±0,16		54,55	71,23±0,93	-4,82
4	73,80	91,03±0,84	isopropanol 70% e H ₂ O milli-Q	73,82	88,11±0,40	-3,21
	54,62	75,53±0,25		54,82	72,68±0,16	-3,77
5	73,13	92,24±0,39	metanol e H ₂ O milli-Q	73,92	91,93±0,64	-0,34
	54,18	77,26±0,05		55,90	72,56±0,24	-6,08
6	73,62	92,80±0,89	metanol e H ₂ O milli-Q	74,02	91,32±2,52	-1,59
	54,50	75,36±0,19		57,69	71,65±1,03	-4,92
7	73,97	95,64±1,84	extran 20% e H ₂ O milli-Q	73,82	91,67±0,34	-4,15
	54,67	81,18±0,10		54,84	68,63±1,37	-15,46
8	74,19	95,31±0,65	extran 20% e H ₂ O milli-Q	73,67	94,13±0,52	-1,24
	54,77	84,74±6,81		54,70	75,11±0,51	-11,36

① Medidas feitas antes da lavagem das placas.

② Medidas feitas após a lavagem das placas.

Os resultados de tensão superficial apresentados na Tabela 5, independentemente da limpeza das placas, variaram de aproximadamente 74 mN/m, antes da imersão das placas, para aproximadamente 54 mN/m, após a imersão. Isso indica que não há uma relação entre esse efeito e a limpeza das placas, sendo provavelmente causado pela extração de algum material da superfície das placas de PVC.

De acordo com os resultados obtidos, a variação percentual do ângulo de retrocesso antes e após a lavagem das placas decresceu para todos os solventes utilizados, com exceção da água. Isso significa que a superfície tornou-se mais hidrofílica após a limpeza com os solventes metanol, isopropanol e extran. A hidrofílicidade da superfície é por vezes apontada como favorável à hemocompatibilidade do material. De acordo com estudos realizados (Kim et al., 1976), o metanol torna a superfície de PVC menos hidrofóbica, fazendo com que esta adsorva preferencialmente albumina, aumentando assim a hemocompatibilidade do biomaterial. Desta forma, o solvente metanol foi selecionado para a lavagem das placas antes da deposição dos filmes de LB.

5.2 - PERFIS TÍPICOS DE FORÇA VERSUS PROFUNDIDADE PARA A DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO DINÂMICO

A Figura 24 apresenta os perfis típicos dos ciclos de medida de força versus profundidade da placa (2 a 6 mm). Esses dados foram usados para a determinação do ângulo de contato dinâmico de avanço e de retrocesso. A utilização do método dinâmico é mais indicada, se comparada com o método estático, devido às irregularidades da superfície das placas de PVC.

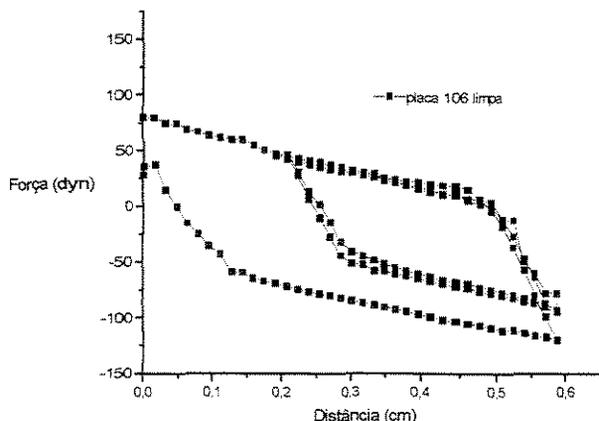


Figura 24: Ciclos de medida de força versus profundidade de imersão da placa para a determinação dos ângulos de contato dinâmico. Profundidade mínima de 2mm e máxima de 6mm. Material: placa moldada a partir de tubo comercial de PVC previamente lavada com metanol (placa 106).

Como pode ser observado a histerese, mais acentuada no primeiro ciclo, está também presente em todos os outros ciclos de avanço e retrocesso. A maior diferença entre o primeiro e os demais ciclos deve-se provavelmente à hidratação da placa de PVC. A utilização de água nas medidas do ângulo de contato é problemática, pois devido ao seu baixo volume molecular, $18 \text{ cm}^3/\text{gmol}$, as suas moléculas penetram facilmente na superfície e nas multicamadas lipídicas (Andrade et al., 1985). Por essas razões, o primeiro ciclo foi desprezado no cálculo dos ângulos de contato.

Na Tabela 6 são apresentados os valores dos parâmetros usados nos cálculos dos ângulos de avanço e de retrocesso, e os seus respectivos valores para a mesma placa cujos perfis foram apresentados na Figura 23.

Tabela 6: Valores dos ângulos de avanço e de retrocesso da placa 106 limpa. Sendo $a = \gamma p \cos\theta$, $b = \rho_l L \varepsilon g$, onde: γ é a tensão superficial, p é o perímetro molhado da placa, ρ_l é a densidade da água, L é a largura da placa, ε é a espessura da placa e g é a aceleração da gravidade.

Ciclo	a_{av}	b_{av}	a_{ret}	b_{ret}	ε_{av} [cm]	ε_{ret} [cm]	θ_{av}	θ_{ret}
2	-8,73	-141,21	76,64	-146,38	0,076	0,078	92,31	69,30
3	2,22	-157,40	75,77	-147,78	0,084	0,079	89,41	69,54
Valores médios	-	-	-	-	0,080±0,004		90,86±2,05	69,42±0,17

Pode-se observar que, devido à histerese, para o segundo e terceiro ciclos há variações significativas entre os ângulos de avanço e retrocesso. Para esses ciclos, os ângulos de retrocesso mantiveram-se aproximadamente constantes, comparados aos ângulos de avanço.

O fator já apresentado de facilidade de hidratação da placa acrescido à irregularidades e deformabilidade da superfície das placas foram responsáveis pelo comportamento apresentado nos vários ciclos de avanço e retrocesso, dando origem à histerese. Outro fator importante foi a variação observada nas medidas de tensão superficial da água antes e após os ciclos de imersão das placas, como pode ser observado nas Tabelas 5 do item 5.1, e 8 e 9 do item 5.3.2.1. Esse fator mostrou-se independente da limpeza ou do recobrimento das placas, sendo provavelmente decorrente da extração do plastificante, que ocorria logo após o contato da placa com a água.

5.3 - RECOBRIMENTO COM FOSFOLIPÍDIOS ISOLADOS

5.3.1 - ISOTERMAS DE PRESSÃO VERSUS ÁREA MOLECULAR

Antes de cada deposição de filme de LB foi obtida a isoterma correspondente ao lipídio a ser depositado, para assegurar as condições de deposição. Na Figura 25 são

apresentadas isotermas típicas de pressão versus área por molécula para os fosfolipídios DMPE e DPPE.

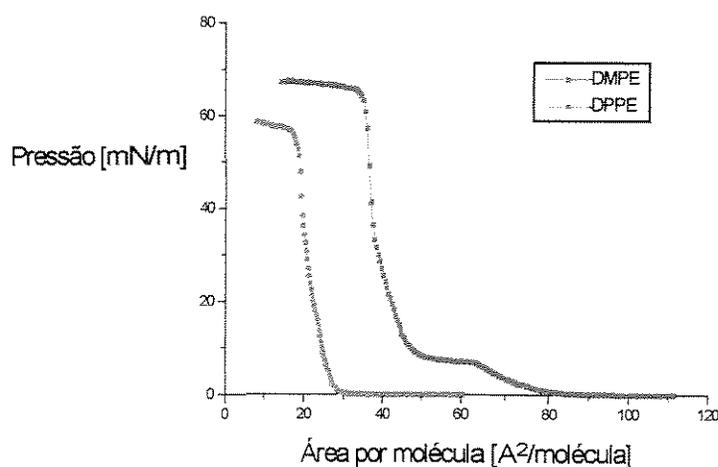


Figura 25: Isotermas de pressão versus área por molécula para os lipídios DMPE e DPPE.

As curvas mostram a presença das várias fases: gasosa, líquida e sólida, até o colapso do filme. A nitidez e extensão de cada fase é uma característica do lipídio, e depende da dimensão relativa entre as regiões polares e apolares da molécula (Figura 18, item 3.7.1.3.1). Tomando-se uma média entre as isotermas, os valores obtidos para a pressão de colapso e área ocupada por molécula foram determinados, os quais são mostrados na Tabela 7 para os fosfolipídios considerados.

Tabela 7: Pressão de colapso e área por molécula obtidas para os lipídios DMPE e DPPE.

Lipídio	Área ocupada por molécula [Å ² /molécula]	Pressão de colapso [mN/m]
DMPE	40	67
DPPE	21	60

Comparando esses resultados pode-se verificar que quanto menor o tamanho da cadeia hidrocarbônica, maior é a área ocupada por molécula. Isso pode ser explicado através das dimensões relativas entre a área polar e apolar de cada molécula. A molécula de

DMPE, por possuir uma menor diferença entre a área polar e apolar, resiste à compressão e portanto a sua área por molécula é maior se comparada a da molécula de DPPE (maior cadeia hidrocarbônica).

A compressão do fosfolípido DSPE (18 carbonos na cadeia hidrocarbônica) em filmes de LB não apresentou resultados consistentes de área por molécula nos nossos experimentos. A sua elevada compressibilidade dificultou os experimentos, por envolver uma quantidade de material muito maior comparada aos outros fosfolípidos. Assim, experimentos envolvendo essa molécula mostraram-se inviáveis tanto experimental quanto economicamente e, por essa razão, a isoterma para o DSPE não foi incluída neste trabalho. De acordo com os resultados de Bürner et al., 1994, a molécula de DSPE é do tipo condensável, ou seja, menos resistente à compressão.

Na Figura 26 são apresentadas as várias isotermas obtidas antes dos ensaios de recobrimento das placas. Como pode-se observar, as isotermas não sofreram variações muito grandes de ensaio para ensaio, e as diferenças obtidas podem ter sido causadas provavelmente pela variação na temperatura ambiente, como revisto no item 3.7.1.1 para o ácido esteárico.

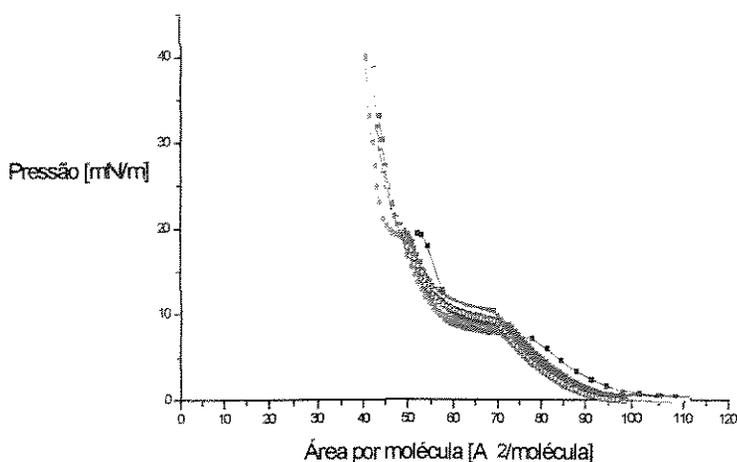


Figura 26: Curvas de pressão versus área por molécula para o DMPE nos vários experimentos realizados.

5.3.2 - AVALIAÇÃO DAS SUPERFÍCIES RECOBERTAS

Os resultados da caracterização das superfícies recobertas, de acordo com as variações do ângulo de contato dinâmico, topografia da superfície e tempo de fibrina, em relação às superfícies não recobertas, são apresentados nos itens 5.3.2.1, 5.3.2.2 e 5.3.2.3.

5.3.2.1 - ÂNGULO DE CONTATO DINÂMICO

Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos para a variação do ângulo de contato dinâmico das placas recobertas com o fosfolípido DMPE em relação às placas não recobertas. Para uma melhor interpretação dos resultados são apresentados também os valores das medidas de tensão superficial da água antes e após as imersões das placas para a obtenção dos perfis de força versus profundidade.

Tabela 8: Influência das condições operacionais no recobrimento de placas com o fosfolipídio DMPE, em termos dos ângulos de contato dinâmico de avanço e retrocesso e variação percentual dos ângulos de contato de avanço e retrocesso em relação às placas não recobertas. γ_{H_2Oa} e γ_{H_2Od} são respectivamente os valores da tensão superficial da água medidos antes e após a imersão das placas para a obtenção dos perfis de força versus profundidade.

Ensaio	❶		Deposição	❷		Espessura da placa [cm]	[(Af-Ai)/Ai]*100 [%]
	$\gamma_{H_2O a}$ $\gamma_{H_2O d}$ [mN/m]	$\theta_{avanço}$ $\theta_{retrocesso}$ [°]		$\gamma_{H_2O a}$ $\gamma_{H_2O d}$ [mN/m]	$\theta_{avanço}$ $\theta_{retrocesso}$ [°]		
1**	73,97	90,86±2,05	P=20mN/m 6 camadas v=5mm/min	73,43	92,19±1,93	0,079±0,005	1,46
	55,16	69,42±0,17		54,67	69,27±0,21		-0,22
2*	73,84	96,45±8,08	P=40mN/m 6 camadas v=5mm/min	73,75	90,69±2,21	0,080±0,005	-5,97
	56,78	65,61±0,78		53,25	66,43±0,35		1,25
3*	73,01	91,49±1,20	P=20mN/m 30 camadas v=5mm/min	74,06	88,01±0,28	0,077±0,006	-3,80
	54,84	68,18±1,56		54,75	70,10±0,95		2,82
4**	74,11	90,73±0,93	P=40mN/m 30 camadas v=5mm/min	73,40	92,23±0,54	0,078±0,002	1,65
	55,19	67,51±0,06		53,50	68,93±0,18		2,10
5*	73,97	92,61±6,24	P=20m/m 6 camadas v=10mm/min	73,28	89,78±1,28	0,070±0,009	-3,06
	54,99	64,20±0,41		54,72	67,85±0,66		5,69
6**	74,24	98,94±1,46	P=40mN/m 6 camadas v=10mm/min	74,16	92,26±1,25	0,087±0,003	-6,75
	54,87	74,54±1,60		53,27	61,53±0,77		-17,45
7**	73,94	88,35±1,30	P=20mN/m 30 camadas v=10mm/min	74,46	89,61±1,36	0,075±0,002	1,43
	54,84	65,62±0,43		54,97	69,89±0,34		6,51
8*	73,94	92,10±2,06	P=40mN/m 30 camadas v=10mm/min	73,84	94,91±1,20	0,076±0,011	3,05
	54,84	71,18±0,54		53,15	72,70±0,18		2,14

* Gotejamento da solução lipídica, espera de 30 minutos; fechamento das barreiras até a pressão desejada, espera de 2 horas, início da deposição.

** Gotejamento da solução lipídica, fechamento das barreiras até a pressão desejada, início da deposição.

❶ Medidas feitas antes do recobrimento das placas.

❷ Medidas feitas após o recobrimento das placas.

Pode-se observar através dos resultados apresentados na Tabela 8 que há, de uma maneira geral, uma tendência das amostras de se tornarem mais hidrofóbicas após o recobrimento com o fosfolípido DMPE, o que pode ser observado através dos valores positivos da variação percentual do ângulo de contato na maioria das situações. O aumento da hidrofobicidade é compreensível, visto que as placas de PVC são hidrofóbicas e, recobertas com 6 ou 30 camadas, teriam como última deposição a porção hidrofóbica da molécula. Além disso, há a orientação preferencial das caudas hidrofóbicas em contato com o ar.

Considerando os ângulos de retrocesso somente, e os seus valores em módulo, pode-se classificar os recobrimentos realizados nas várias condições em três níveis: baixo (-0,22 e 1,25), intermediário (2,82; 2,10; 5,69; 6,51 e 2,14) e alto (-17,45).

Na mesma Tabela 8 pode-se também observar as variações da tensão superficial da água antes e após a limpeza ou a deposição. Esses valores, independentemente da limpeza ou do recobrimento das placas, variaram de aproximadamente 74 mN/m, antes da imersão das placas, para aproximadamente 54 mN/m, após a imersão. Isso indica que não há uma relação entre essa variação e a limpeza ou o recobrimento das placas, sendo provavelmente causado pela extração do plastificante, o que justifica os perfis típicos apresentados no item 5.2.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos com a variação da pressão de deposição e tempo de organização molecular na variação do ângulo de contato dinâmico das placas recobertas com o fosfolípido DPPE em relação às placas não recobertas. Para uma melhor interpretação dos resultados são apresentados também os valores das medidas de tensão superficial da água antes e após as imersões das placas para a obtenção dos perfis de força versus profundidade.

Tabela 9: Influência das condições operacionais no recobrimento de placas com o fosfolipídio DPPE, em termos dos ângulos de contato dinâmico de avanço e retrocesso e variação percentual dos ângulos de contato de avanço e retrocesso em relação às placas não recobertas. γ_{H_2Oa} e γ_{H_2Od} são os valores da tensão superficial da água medidos antes e após a imersão das placas para a obtenção dos perfis de força versus profundidade.

Ensaio	①		Deposição	②		Espessura da placa [cm]	[(Af-Ai)/Ai]*100 [%]
	γ_{H_2Oa} γ_{H_2Od} [mN/m]	$\theta_{avanço}$ $\theta_{retrocesso}$ [°]		γ_{H_2Oa} γ_{H_2Od} [mN/m]	$\theta_{avanço}$ $\theta_{retrocesso}$ [°]		
7 ^{**}	73,84	87,53±0,77	P=20mN/m 30 camadas v=10mm/min	73,45	89,68±1,69	0,087±0,003	2,46
	54,97	67,18±0,68		54,57	71,74±0,36		6,79
8 [*]	73,75	90,00±1,16	P=40mN/m 30 camadas v=10mm/min	73,48	92,40±0,65	0,081±0,004	2,67
	54,77	68,50±0,16		54,35	74,10±1,00		8,18

7^{*} e 8^{*} indicam ensaios respectivamente semelhantes aos ensaios 7 e 8 do planejamento fatorial fracionário.

* Gotejamento da solução lipídica, espera de 30 minutos; fechamento das barreiras até a pressão desejada, espera de 2 horas, início da deposição.

** Gotejamento da solução lipídica, fechamento das barreiras até a pressão desejada, início da deposição.

① Medidas feitas antes do recobrimento das placas.

② Medidas feitas após o recobrimento das placas.

Tal como ocorrido com o fosfolipídio DMPE, as superfícies tornaram-se mais hidrofóbicas após o recobrimento com o fosfolipídio DPPE. Também pode ser observado através da Tabela 9 que o ângulo de retrocesso aumentou com a pressão de deposição e com o tempo de organização molecular.

Na Figura 27 é apresentada uma comparação entre as respostas da variação percentual do ângulo de contato obtidas para os dois lipídios, DMPE e DPPE, em função da pressão e tempo de organização molecular antes da deposição.

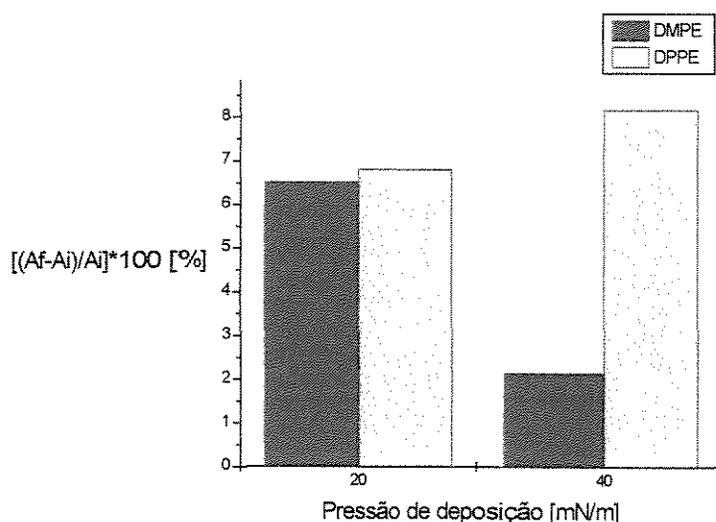


Figura 27: Comparação entre as respostas da variação do ângulo de contato para as mesmas condições de deposição com os lipídios DMPE e DPPE. Condição de deposição: $P = 20\text{mN/m}$, 30 camadas, $v = 10\text{mm/min}$ e sem tempo de organização molecular para o início da deposição; condição de deposição: $P = 40\text{mN/m}$, 30 camadas, $v = 10\text{mm/min}$ e com tempo de organização molecular de 150min para o início da deposição.

Pode-se observar que, em ambos os casos, a resposta foi maior quando utilizado o fosfolipídio DPPE, indicando provavelmente um maior recobrimento nessas amostras.

Embora os ângulos de contato variem com as condições operacionais, a avaliação do recobrimento através dos seus valores deve ser considerada com reservas. Segundo Andrade et al., 1985, as medidas de ângulo de contato em superfícies não ideais não são adequadas para avaliar o recobrimento de superfícies. Foi observado que, em alguns casos, 10% e 90% de recobrimento forneceram aproximadamente o mesmo valor de ângulo de contato. Por essas razões, outros métodos de caracterização, tais como microscopia de força atômica e tempo de fibrina, foram também usados para uma melhor avaliação das superfícies recobertas.

5.3.2.2 - TEMPO DE FIBRINA

Os resultados obtidos de tempo de fibrina, em testes com as placas recobertas com o fosfolipídio DMPE realizados nas condições operacionais da Tabela 8, são apresentados na Tabela 10, onde T_{pr} e T_{psr} são os valores obtidos para as placas recobertas e sem recobrimento respectivamente.

Tabela 10: Influência das condições operacionais no recobrimento de placas com o fosfolipídio DMPE, em termos dos tempos de fibrina e variação percentual dos tempos de fibrina em relação à placa não recoberta.

Amostra	Tempo de coagulação 1 [seg]	Tempo de coagulação 2 [seg]	Valor médio das medidas [seg]	Desvio das medidas [seg]	$[(T_{pr}-T_{psr})/T_{psr}] * 100$ [%]
placa sem recobri/o	488	360	424	90	-
ensaio 1	365	281	323	59	-23,8
ensaio 2	465	466	466	1	9,9
ensaio 3	760	652	706	76	66,5
ensaio 4	660	727	693	47	63,4
ensaio 5	838	1104	971	188	129,0
ensaio 6	817	600	708	153	67,0
ensaio 7	610	337	473	193	11,6
ensaio 8	557	973	765	294	80,4

Com exceção do ensaio 1, todas as placas recobertas apresentaram um tempo de coagulação maior que o obtido para a placa sem recobrimento. Isso indica que há uma tendência de maior hemocompatibilidade para as placas recobertas. Os melhores resultados foram obtidos para o ensaio 5, que apresentou um tempo médio de fibrina maior que o dobro da placa não recoberta. Em outras quatro amostras o recobrimento apresentou uma variação percentual de 60 a 80 % em relação à placa não recoberta, o que indica também uma maior hemocompatibilidade.

Sabendo-se que quanto maior o tempo de coagulação mais hemocompatível é a amostra, através dos valores obtidos nestes testes pode-se observar que a mais hemocompatível é a amostra correspondente ao ensaio 5. As condições de deposição desta placa foram: $P = 20\text{mN/m}$, 6 camadas, $v = 10\text{mm/min}$ e com tempo de organização molecular para o início da deposição de 150min. As outras amostras que apresentaram tempo de coagulação alto com as respectivas condições de deposição foram: ensaio 6 ($P=40\text{mN/m}$, 6 camadas, $v=10\text{mm/min}$, e sem tempo de organização molecular para o início da deposição), ensaio 4 ($P=40\text{mN/m}$, 30 camadas, $v=5\text{mm/min}$, e sem tempo de organização molecular para o início da deposição), ensaio 8 ($P=40\text{mN/m}$, 30 camadas, $v=10\text{mm/min}$, e com tempo de organização molecular de 150 minutos para o início da deposição), e ensaio 3 ($P=20\text{mN/m}$, 30 camadas, $v=5\text{mm/min}$, e com tempo de organização molecular de 150 minutos para o início da deposição).

Os resultados obtidos de tempo de fibrina em relação à placa não recoberta e às placas recobertas com o lipídio DPPE encontram-se na Tabela 11, onde T_{pr} e T_{psr} são os valores obtidos para as placas recobertas e sem recobrimento respectivamente.

Tabela 11: Influência das condições operacionais no recobrimento de placas com o fosfolipídio DPPE, em termos dos tempos de fibrina e variação percentual dos tempos de fibrina em relação à placa não recoberta.

Amostra	Tempo de coagulação 1 [seg]	Tempo de coagulação 2 [seg]	Valor médio das medidas [seg]	Desvio das medidas [seg]	$[(T_{pr}-T_{psr})/T_{psr}] * 100$ [%]
placa sem recobri/o	680	730	705	35	-
ensaio 7	1605	782	1194	582	69,4
ensaio 8	626	640	633	10	-10,2

O ensaio 7 apresentou um aumento no tempo de fibrina indicando que, neste caso, houve um aumento da hemocompatibilidade. Já a amostra correspondente ao ensaio 8 apresentou uma variação negativa, indicando um decréscimo da hemocompatibilidade.

Os desvios altos encontrados nas Tabelas 10 e 11 podem ter sido causados devido à diferença no volume de sangue depositado nas placas em duplicatas, o qual era de difícil controle, também à velocidade e força de agitação da gota, ao estado do doador do sangue e à irregularidades no recobrimento. Vale ressaltar que a cada ensaio com as placas recobertas era também feito um ensaio em uma placa sem recobrimento, por isso os valores de tempo de fibrina para as placas sem recobrimento das Tabelas 10 e 11 são diferentes.

Na Figura 28 é apresentada uma comparação entre as respostas da variação percentual do tempo de fibrina para os dois lipídios, DMPE e DPPE, em função da pressão e tempo de organização molecular antes da deposição.

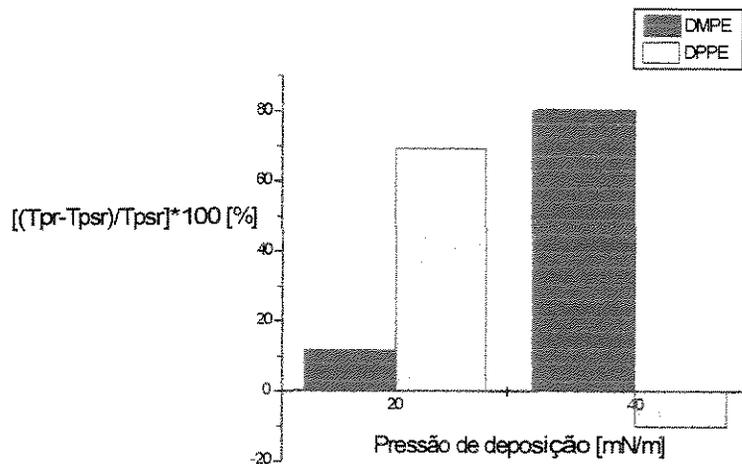


Figura 28: Comparação entre as respostas da variação do tempo de fibrina para as mesmas condições de deposição com os lipídios DMPE e DPPE. Condição de deposição: $P = 20\text{mN/m}$, 30 camadas, $v = 10\text{mm/min}$ e sem tempo de organização molecular para o início da deposição; condição de deposição: $P = 40\text{mN/m}$, 30 camadas, $v = 10\text{mm/min}$ e com tempo de organização molecular de 150min para o início da deposição.

Comparando-se os resultados obtidos para os fosfolipídios DMPE e DPPE correspondentes ao mesmo ensaio, na Figura 30, pode-se observar que, provavelmente, não houve uma relação entre a condição de deposição ou a cadeia de hidrocarboneto e a hemocompatibilidade.

5.3.2.3 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Foram realizadas microscopias de força atômica nas placas depositadas e em uma placa sem recobrimento, para efeito comparativo. As melhores imagens foram obtidas em áreas de 20 por 20 μm^2 , as quais podem ser observadas nas Figuras 29 a 32, onde as escalas indicam a variação topográfica da superfície. As cores mais escuras representam depressões na superfície e as mais claras elevações na superfície.

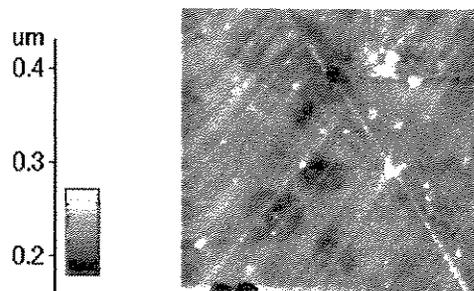


Figura 29: Microscopia de força atômica da superfície de uma placa de PVC sem recobrimento.

A Figura 29 representa a imagem obtida por microscopia de força atômica da superfície da placa sem recobrimento. Pode-se observar a presença de ranhuras distribuídas uniformemente por toda a placa, decorrentes possivelmente do processo de fabricação do tubo. Além disso, observa-se a presença de depressões localizadas na região central da placa, indicando a não uniformidade da superfícies das placas de PVC.

As Figuras 30, 31 e 32 ilustram as imagens obtidas em diferentes regiões da isoterma de adsorção para os lipídios DMPE e DPPE. As microscopias localizadas a esquerda da curva representam deposições realizadas à pressão de 40 mN/m, as localizadas a direita representam deposições realizadas à pressão de 20 mN/m. Em todos os casos pode-se observar a presença do lipídio depositado, visto que as ranhuras encontradas na placa sem recobrimento não são mais visíveis.

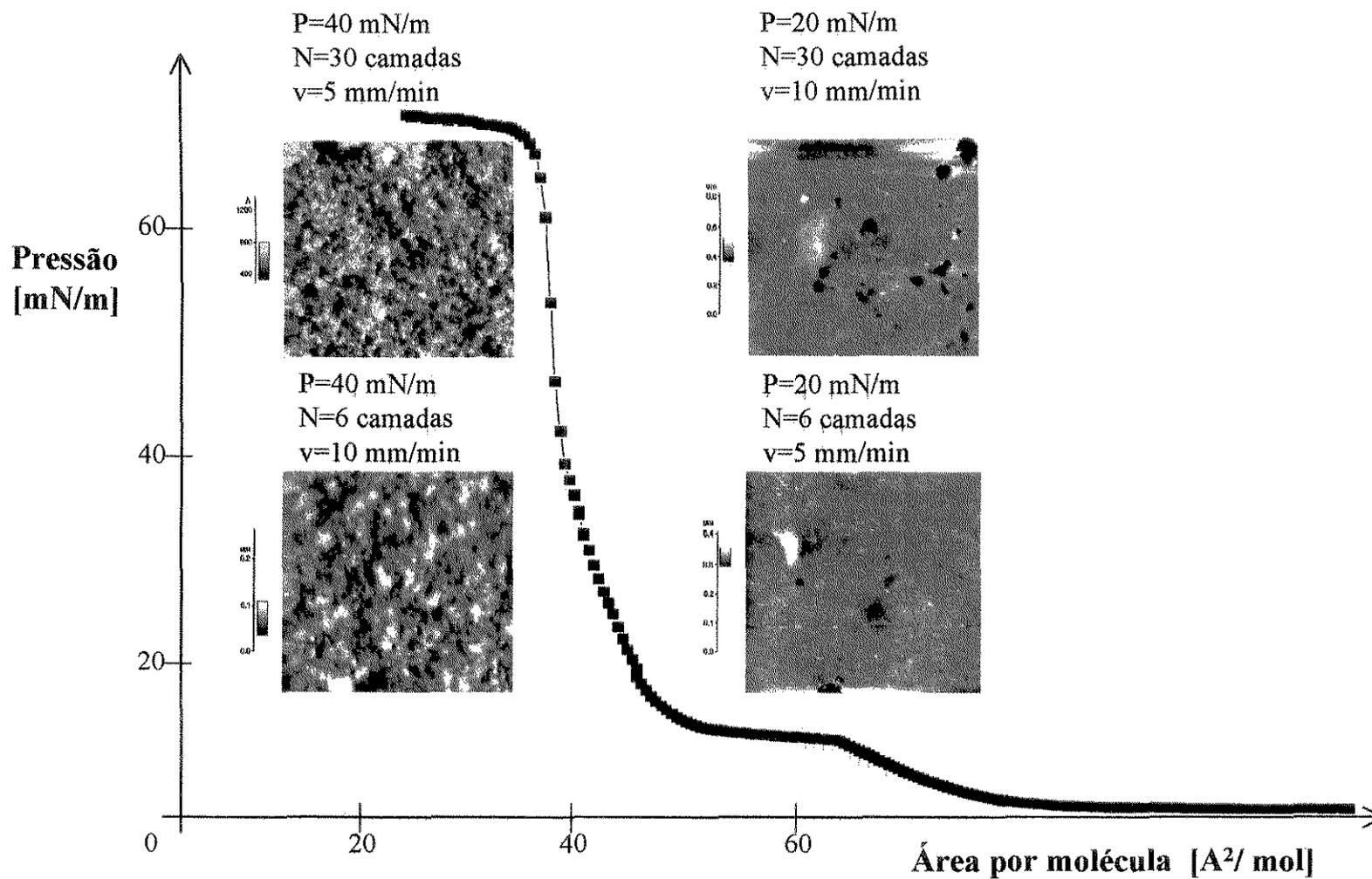


Figura 30: Isotherma de pressão versus área molecular para o DMPE com as microscopias de força atômica. Sem tempo de espera para a organização molecular antes do início da deposição.

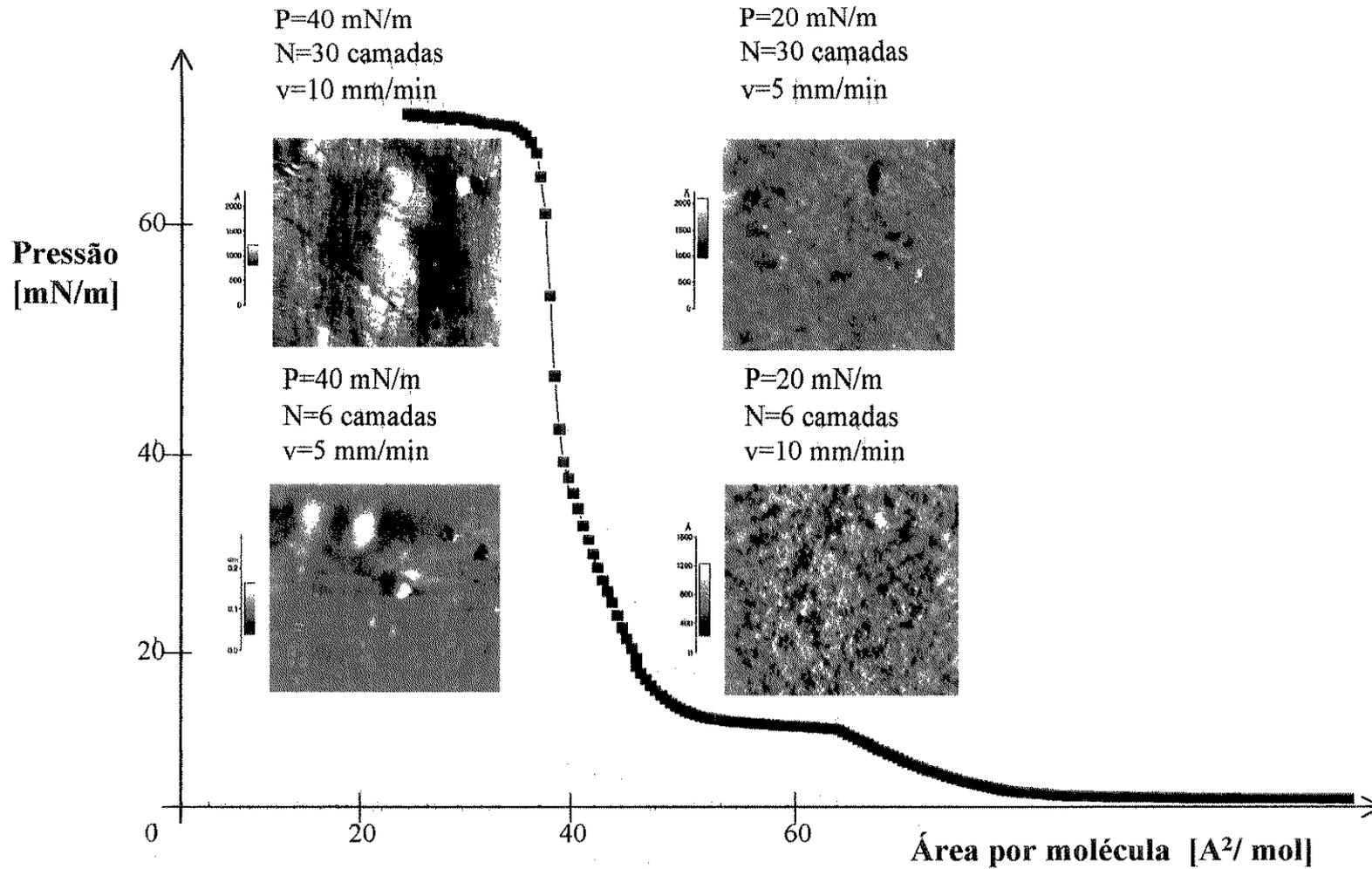


Figura 31: Isoterma de pressão versus área molecular para o DMPE com as microscopias de força atômica. Tempo de organização molecular de 150 minutos antes do início da deposição.

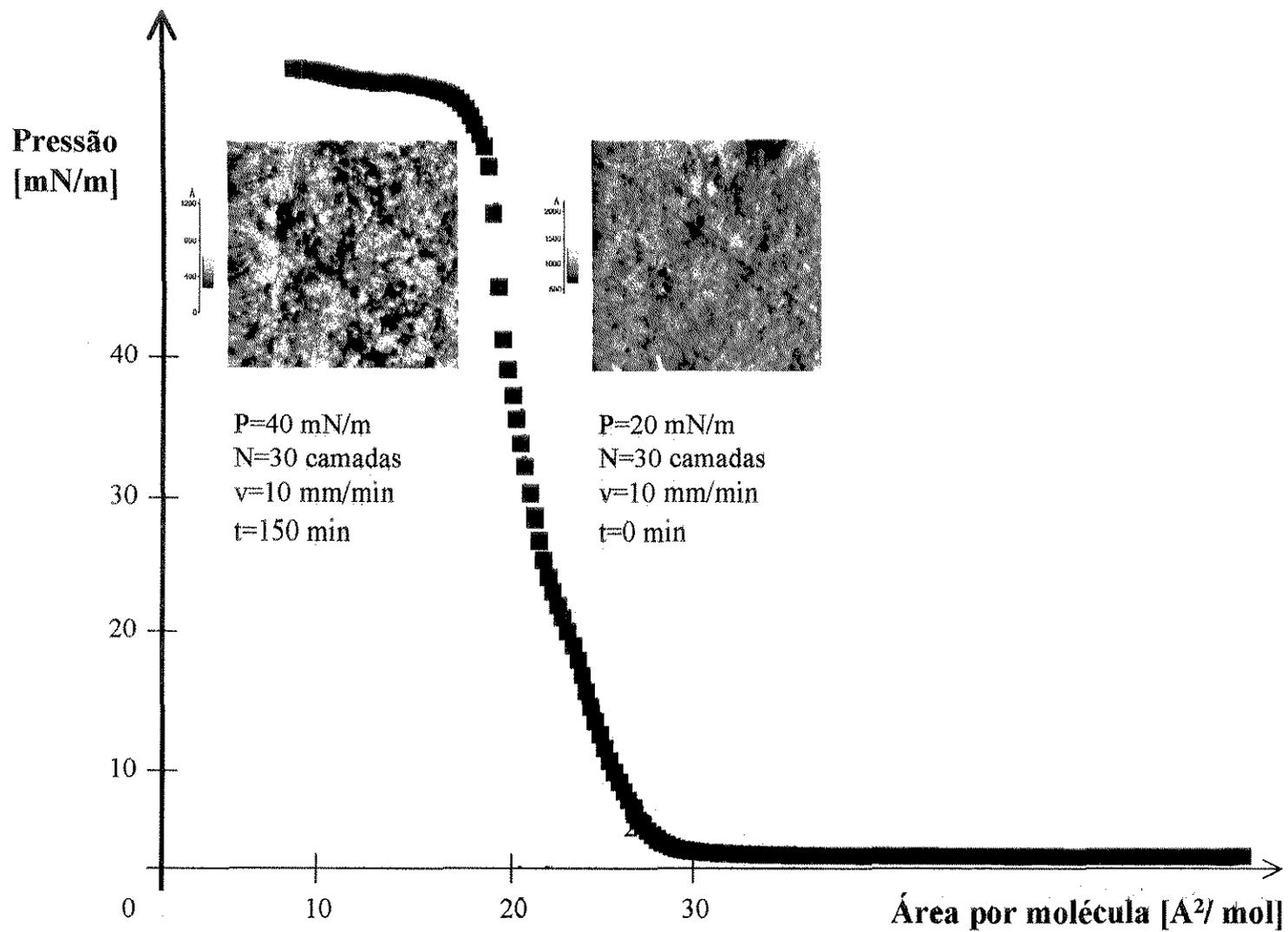


Figura 32: Isoterma de pressão versus área molecular para o DPPE com as microscopias de força atômica.

Na Figura 30, correspondente ao lipídio DMPE, pode-se observar que, para a pressão de 20 mN/m e correspondente área por molécula de 45 \AA^2 , as imagens mostram uma superfície mais lisa, se comparadas com as obtidas para a pressão de 40 mN/m. As cores mais claras presentes nas imagens obtidas à pressão de 40 mN/m indicam a presença de pequenos aglomerados de lipídios dispersos na superfície de uma forma razoavelmente uniforme.

Na Figura 31, correspondente ao lipídio DMPE, observa-se que, na deposição de 30 camadas à pressão de 40mN/m, o recobrimento é não homogêneo e irregular. No caso da deposição de 6 camadas a esta mesma pressão, a superfície apresentou-se mais lisa, porém com alguns aglomerados de lipídios. À pressão de 20 mN/m as imagens apresentaram pequenos aglomerados de lipídios dispersos na superfície de uma forma razoavelmente uniforme.

Na Figura 32, correspondente ao lipídio DPPE, pode-se observar, nas duas imagens, a presença de pequenos aglomerados de lipídios dispersos na superfície de uma forma razoavelmente uniforme.

A presença dos aglomerados de lipídios nas superfícies das amostras pode ser explicada pelo fato que as moléculas de fosfatidiletanolamina arranjam-se em estruturas do tipo hexagonal, como discutido em 3.7.1.3.1, justificando portanto este tipo de recobrimento. Portanto, a presença destes aglomerados distribuídos de maneira uniforme ao longo das microscopias indica um maior recobrimento das amostras.

Na Figura 30 a organização molecular foi obtida com a pressão, já que as deposições foram realizadas sem tempo para a organização inicial das moléculas, assim um maior recobrimento foi obtido nas amostras processadas a alta pressão. Na Figura 32 a organização molecular foi obtida através do tempo de espera antes do início da deposição, resultando em amostras com maior recobrimento a baixa pressão.

Comparando-se as Figuras 30 e 31 e as 30, 31 e 32 pode-se observar que a organização inicial das moléculas e o tipo de lipídio utilizado exercem uma influência muito significativa no recobrimento, visto que as imagens obtidas para as mesmas condições de deposição apresentaram uma grande diferença.

5.3.2.4 - COMPARAÇÃO DO RECOBRIMENTO COM DMPE VISTO PELOS VÁRIOS MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Os três métodos de caracterização, variação no ângulo de contato, presença de depósitos, observada através das microscopias de força atômica, e variação no tempo de fibrina, para as oito amostras recobertas com o fosfolipídio DMPE, foram comparados para a verificação de uma correlação entre eles, como pode ser observado na Tabela 12. As respostas obtidas através de cada método foram classificadas através dos níveis menor, intermediário ou maior, correspondendo respectivamente as cores amarela, vermelha e azul. Portanto o nível azul corresponde aos maiores valores absolutos de ângulo de contato, as maiores quantidades de aglomerados de lipídios e as maiores variações positivas em relação ao tempo de fibrina; o nível vermelho corresponde aos valores intermediários de ângulo de contato (valor absoluto) e de tempo de fibrina, e a presença de alguns aglomerados de lipídios; o nível amarelo corresponde aos menores valores de ângulo de contato (valor absoluto) e de tempo de fibrina, e a menor presença de aglomerados de lipídios.

Tabela 12: Comparação do recobrimento com DMPE através dos métodos de caracterização: variação no ângulo de contato, presença de depósitos e variação no tempo de fibrina.

Ensaio	Varição no ângulo de contato	Presença de depósitos (MFA)	Varição no tempo de fibrina
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Através da Tabela 12 pode-se observar que os métodos apresentam uma boa correlação, sendo que não houve ocorrência dos níveis azul e amarelo para o mesmo ensaio. As amostras que apresentaram uma maior uniformidade no recobrimento, visualizada através da presença dos aglomerados de lipídios distribuídos de maneira uniforme, apresentaram também uma maior hemocompatibilidade (ensaios 3, 4, 5, 6 e 8). Também a ausência de aglomerados de lipídios na superfície das amostras mostrou-se relacionada a baixa hemocompatibilidade (ensaios 1, 2 e 7).

5.3.3 - INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NO RECOBRIMENTO DE SUPERFÍCIES

Os resultados obtidos da avaliação preliminar do recobrimento de superfícies através da variação do ângulo de contato dinâmico mostrou que as variáveis pressão de deposição, número de camadas depositadas, velocidade de imersão e retirada do substrato da fase líquida e tempo de organização molecular antes do início da deposição são importantes para o processo, como pode ser observado no Anexo I, necessitando portanto de determinação quantitativa do grau de influência relativo entre elas. Assim, foi realizado um planejamento fatorial fracionário para a análise da importância relativa das variáveis pressão de

pressão de deposição, número de camadas depositadas, velocidade de imersão e retirada do substrato da fase líquida e tempo de organização molecular antes do início da deposição. Os níveis inferiores e superiores de cada variável foram apresentados na Tabela 3, item 4.2.9, e as respostas foram obtidas através das equações apresentadas no item 4.2.9.

O planejamento fatorial fracionário com as respostas obtidas em termos de variação percentual do ângulo de contato de retrocesso dinâmico (resposta₁) e do tempo de fibrina (resposta₂), ambos em relação à placa não recoberta, encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com as respostas obtidas em termos de variação percentual do ângulo de contato de retrocesso dinâmico e do tempo de fibrina.

Ensaio	Variáveis				$[(A_r - A_i)/A_i] * 100$ [%]	$[(T_{pr} - T_{psr})/T_{psr}] * 100$ [%]
	P	N	v	t		
1	-	-	-	-	-0,22	-23,8
2	+	-	-	+	+1,25	+9,9
3	-	+	-	+	+2,82	+66,5
4	+	+	-	-	+2,10	+63,4
5	-	-	+	+	+5,69	+129,0
6	+	-	+	-	-17,45	+67,0
7	-	+	+	-	+6,51	+11,6
8	+	+	+	+	+2,14	+80,4

Pode-se observar através dos resultados apresentados na Tabela 13 que há, de uma maneira geral, uma tendência das amostras de se tornarem mais hidrofóbicas após o recobrimento com o fosfolípido DMPE, isto pode ser observado através dos valores positivos da variação percentual do ângulo de contato. Também há a tendência das placas tornarem-se mais hemocompatíveis, como mostrado através dos valores positivos da variação do tempo de formação da rede de fibrina.

A influência relativa das variáveis analisadas é apresentada na Tabela 14, através do parâmetro contraste.

Tabela 14: Influência das variáveis no processo de recobrimento das placas de PVC.

Variável	Contraste Resposta ₁	Contraste Resposta ₂
Pressão	-6,69	+9,35
Número de camadas	+6,08	+9,95
Velocidade	-2,27	+43,00
Tempo de espera	+5,24	+41,90

Esses resultados mostram que os contrastes calculados para a mesma variável apresentaram valores muito diferentes dependendo da resposta utilizada. Isto pode ser explicado pelo fato que as variações no ângulo de contato apresentam várias limitações, como a hidratação da superfície do polímero, a liberação do plastificante, a irregularidade da superfície das amostras e a deformação do material, como já discutido em 5.2, além do fato que estas medidas não são por si só adequadas para a avaliação do recobrimento de superfícies. Com relação à formação da rede de fibrina, há o difícil controle do volume de sangue utilizado em cada ensaio e a seqüência das gotas de sangue depositadas, que também podem ter afetado o tempo de coagulação. Também pode ser observado que de acordo com a resposta₂ todas as variáveis influenciam a resposta positivamente, isto é, um aumento do nível da variável causa um aumento da resposta, por exemplo, um aumento na pressão causa um aumento na resposta₂. Já em relação a resposta₁ isto não ocorreu com as variáveis pressão e velocidade de deposição, sendo que um aumento destas variáveis provocou um decréscimo na resposta₁. Outro fato ocorrido foi a obtenção de respostas positivas e negativas para a mesma variável quando utilizada diferentes respostas, sendo este fato mais pronunciado para a variável velocidade de deposição, que apresentou um valor de -2,27 para a resposta₁ e um valor de +43,00 para a resposta₂. A variável que apresentou uma maior correlação entre as respostas foi o número de camadas depositadas, apresentando valores positivos e da mesma ordem de grandeza.

Baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que provavelmente todos os efeitos principais são importantes (valores variando de -6,69 a 6,08 para a resposta₁ e de 9,35 a 43,00 para a resposta₂), sendo assim, todas as variáveis foram consideradas importantes para o processo de deposição de filmes de fosfolípidios.

O aumento de escala do processo pode ser feito através da passagem da solução de fosfolipídios no interior dos tubos comerciais de PVC usados em tratamentos extracorpóreos, resultando na adsorção dos lipídios na sua parede. Algumas das variáveis envolvidas nesse processo seriam a velocidade de circulação da solução para a adsorção, o número de passagens da solução pelo tubo e a organização molecular da solução. Essas variáveis podem ser relacionadas com as variáveis envolvidas na deposição de filmes de LB, permitindo assim uma predição do recobrimento. Desta forma, a organização molecular da solução relaciona-se com a pressão de deposição e o tempo de organização molecular, a velocidade de circulação da solução para a adsorção relaciona-se com a velocidade de imersão das placas, e o número de passagens da solução pelo tubo relaciona-se com o número de camadas depositadas.

5.4 - RECOBRIMENTO COM MISTURAS DOS FOSFOLIPÍDIOS DMPC-DMPE

Como as interfaces biologicamente inertes são formadas principalmente pelas misturas de PC e PE, foram realizados experimentos com as misturas dos fosfolipídios DMPC e DMPE, a fim de se obter um aumento da hemocompatibilidade. A condição de deposição utilizada foi a correspondente ao ensaio 5 do planejamento fatorial fracionário, isto é, pressão de deposição de 20 mN/m, 6 camadas depositadas, velocidade de imersão e retirada do substrato da fase líquida de 10 mm/min e tempo para organização molecular de 150 minutos. Essa condição foi escolhida por apresentar a maior hemocompatibilidade (maior variação no tempo de fibrina) e um recobrimento com aglomerados de lipídios espalhados de maneira uniforme (observado através da microscopia de força atômica) para o DMPE puro e uma boa hemocompatibilidade para o ensaio realizado com o DMPC puro (Marreco, 1999).

As razões molares utilizadas de DMPC e DMPE nas misturas foram respectivamente de 75:25, 50:50 e 25:75. A Figura 33 apresenta as isotermas de pressão versus área molecular obtidas para as misturas, assim como para os fosfolipídios isolados.

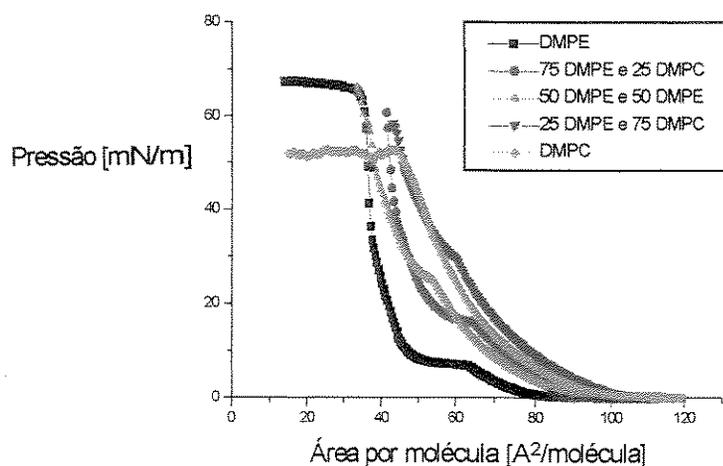


Figura 33: Isothermas obtidas para os fosfolipídios DMPC e DMPE isolados e em misturas.

Como pode ser observado na Figura 33 as isothermas das misturas apresentaram características dos dois fosfolipídios. A mistura mais rica em DMPE apresentou um formato de isoterma mais semelhante à desse lipídio puro, somente com uma maior área por molécula, provavelmente devido a presença das moléculas de DMPC. Com a mistura mais rica em DMPC, a isoterma também apresentou um formato mais parecido com a deste lipídio puro, apresentando somente uma maior pressão de colapso.

A formação de monocamadas muito rígidas ocasionou a extravasão de água da cuba antes que a pressão de colapso fosse atingida. Por esse motivo, as isothermas correspondentes às misturas são apresentadas aquém da pressão de colapso. Pela tendência das curvas pode-se prever que as pressões de colapso para as misturas estão situadas entre aquelas dos componentes puros.

O estudo da miscibilidade da mistura dos fosfolipídios foi feito como descrito em 4.2.10. Através da Figura 33 pode-se encontrar os valores para a área ocupada por molécula para as diferentes isothermas às pressões de 20, 30 e 40 mN/m. Estes valores encontram-se na Tabela 15 e nas Figuras 34 a 36 encontram-se as curvas obtidas a partir desta tabela para as diferentes pressões.

Tabela 15: Valores de área ocupada por molécula (A) para as diferentes isotermas às pressões de 20 (A_{20}), 30 (A_{30}) e 40 (A_{40}) mN/m.

Fração molar DMPE:DMPC	A_{20}	A_{30}	A_{40}
100:0	42	38	36
75:25	54	47	43
50:50	58	47	42
25:75	67	58	49
0:100	64	57	53

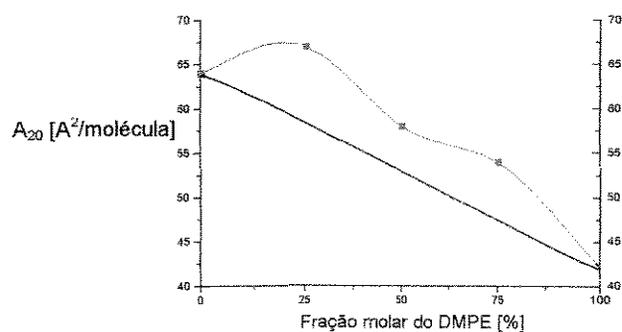


Figura 34: Área ocupada por molécula a pressão de 20 mN/m (A_{20}) em função da fração molar de DMPE.

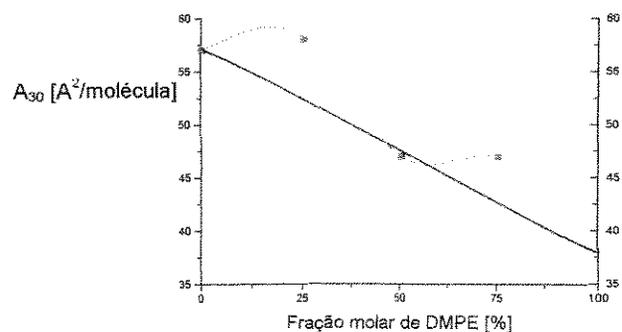


Figura 35: Área ocupada por molécula a pressão de 30 mN/m (A_{30}) em função da fração molar de DMPE.

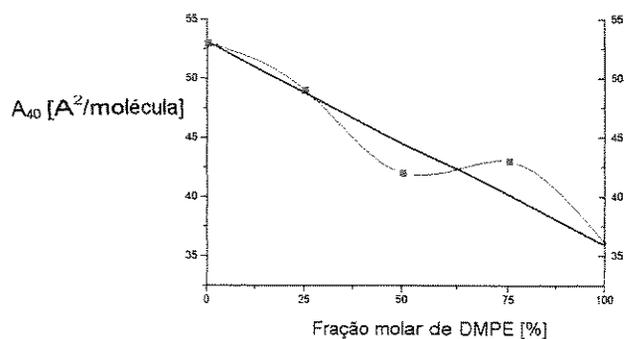


Figura 36: Área ocupada por molécula a pressão de 40 mN/m (A_{40}) em função da fração molar de DMPE.

Como verificado através das Figuras 34 a 36, há indício da miscibilidade entre os fosfolipídios DMPC e DMPE, pois os pontos encontrados desviaram-se das retas entre as frações molares de 0 e 100% de DMPE. Pode também ser observado que está ocorrendo repulsão entre as moléculas dos fosfolipídios, pois as áreas ocupadas por molécula encontram-se acima das retas das Figuras 34 a 36, sendo portanto maiores que as previstas. Com o aumento da pressão pode ser notado um decréscimo nestes desvios, indicando uma menor repulsão entre moléculas. Este comportamento pode parecer contraditório, pois com o aumento da pressão as moléculas estão mais próximas, aumentando a repulsão entre elas. A menor repulsão entre moléculas pode ser atribuída provavelmente à formação de grupos de moléculas de mesma natureza, a fim de minimizar a energia livre superficial e promover a estabilização da monocamada.

Outro fato que evidencia a miscibilidade é que as misturas apresentaram tendências para diferentes valores de pressão de colapso. Esses valores são maiores que o menor valor apresentado para o fosfolipídio puro, no caso o DMPC, como visualizado através da Figura 33. Para misturas imiscíveis, a pressão de colapso seria a mesma e igual a do componente puro que apresenta a menor pressão de colapso (Gaines, 1966).

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para a variação no ângulo de contato e no tempo de fibrina para cada uma das misturas, assim como para os fosfolipídios puros.

Tabela 16: Variação do ângulo de contato dinâmico de retrocesso e do tempo de fibrina para os fosfolipídios DMPC e DMPE puros e em misturas na mesma condição de deposição.

Fração molar DMPE:DMPC	$[(A_r - A_i)/A_i] * 100$ [%]	$[(T_{pr} - T_{psr})/T_{psr}] * 100$ [%]
100:0	+5,69	+129,00
75:25	+8,34	+25,54
50:50	+7,66	+39,83
25:75	+6,52	-22,80
0:100*	+4,93	+55,8

* Referência: (Marreco, 1999).

Como observado na Tabela 16, todas as amostras tornaram-se mais hidrofóbicas, indicado pelo sinal positivo na variação do ângulo de contato. As variações dos ângulos de contato não foram significativas para todas as razões molares de lipídios, apresentando valores entre 4,93 a 8,34. Quanto à hemocompatibilidade, com exceção da mistura mais rica em DMPC, o tempo de formação de rede de fibrina foi maior que o obtido para a amostra sem recobrimento. O melhor resultado foi obtido para a mistura equimolar de DMPC:DMPE. Comparando o recobrimento com os fosfolipídios isolados nas mesmas condições de deposição, observa-se que as variações do tempo de fibrina foram menores para os recobrimentos com as misturas.

As microscopias de força atômica das amostras recobertas com as misturas dos fosfolipídios DMPC e DMPE encontram-se na Figura 37.

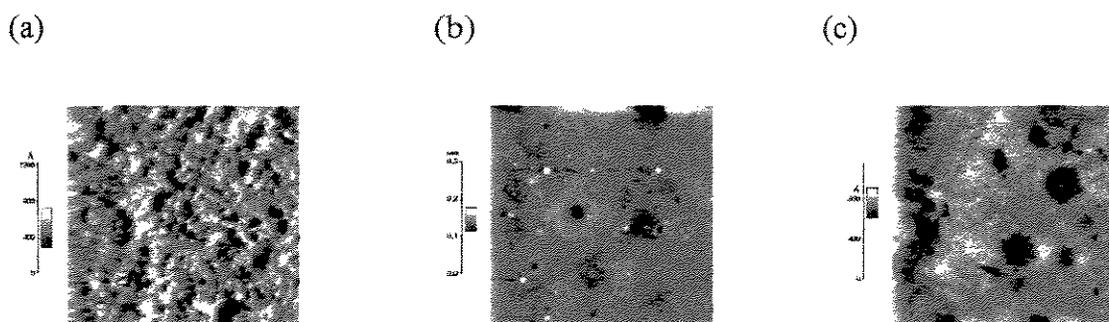


Figura 37: Microscopias de força atômica das amostras recobertas com: a) 75% DMPE e 25% DMPC; b) 50% DMPE e 50% DMPC; c) 25% DMPE e 75% DMPC.

Como já comentado em 5.3.2.3, as amostras recobertas com o fosfolípido DMPE apresentam imagens de aglomerados de lipídios devido a formação de estruturas tipo hexagonal. Essa mesma característica foi observada na placa recoberta com a mistura mais rica em DMPE, como visualizado na Figura 37(a). As moléculas de DMPC, por sua vez, arranjam-se preferencialmente em bicamadas lamelares, como já discutido em 3.7.1.3.1, originando imagens mais lisas, se comparadas com as obtidas para o DMPE (Marreco, 1999). Superfícies lisas foram portanto obtidas para a amostra recoberta com a mistura mais rica em DMPC (Figura 37 (c)). Para a mistura equimolar prevaleceu a característica lisa típica da superfície recoberta com o DMPC, como visualizado na Figura 37(b).

5.5 - RESULTADOS DA SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DO DMPE-PEG₂₀₀₀

Atualmente há um grande interesse na utilização de polímeros altamente hidratáveis sobre superfícies devido a sua propriedade de criação de uma barreira estérica, que reduz substancialmente a adsorção de componentes do plasma, contribuindo para o aumento da hemocompatibilidade. Com este propósito, neste trabalho o lipídio DMPE foi derivatizado com o polietilenoglicol de peso molecular 2000, segundo a metodologia descrita em 4.2.4.

Após a síntese do DMPE-PEG₂₀₀₀, o produto foi purificado em coluna de sílica e as frações coletadas foram analisadas por cromatografia de camada delgada em fase reversa

para a identificação do produto. Os resultados da purificação obtidos em placas de cromatografia de camada delgada em fase reversa são apresentados na Figura 38.

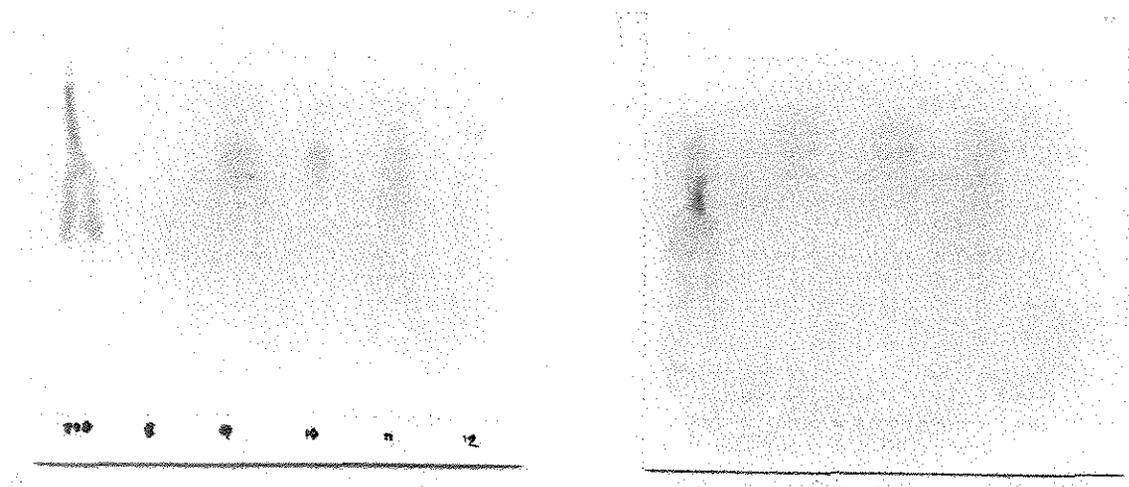


Figura 38: Cromatografias de camada delgada em fase reversa das frações obtidas na purificação do DMPE-PEG₂₀₀₀ em coluna de sílica. A primeira amostra refere-se ao padrão de PEG₂₀₀₀ e as demais as frações eluídas de 8 a 16.

Como visualizado na Figura 38, pode-se observar a presença do DMPE-PEG₂₀₀₀ nas frações 9 a 16. Após a liofilização do produto, este foi pesado e a massa obtida foi de 0,2014 gramas. O rendimento global do processo de reação e purificação calculado em relação ao reagente limite DMPE foi de 60,53%.

5.6 - RECOBRIMENTO COM O FOSFOLIPÍDIO DMPE DERIVATIZADO COM POLIETILENOGLICOL

O DMPE-PEG₂₀₀₀ foi utilizado em uma mistura com o fosfolipídio DMPE a uma razão molar de 9:91 (DMPE-PEG:DMPE). As isotermas obtidas para a mistura, assim como para os fosfolipídios puros DMPE e DMPE-PEG, podem ser observadas na Figura 39.

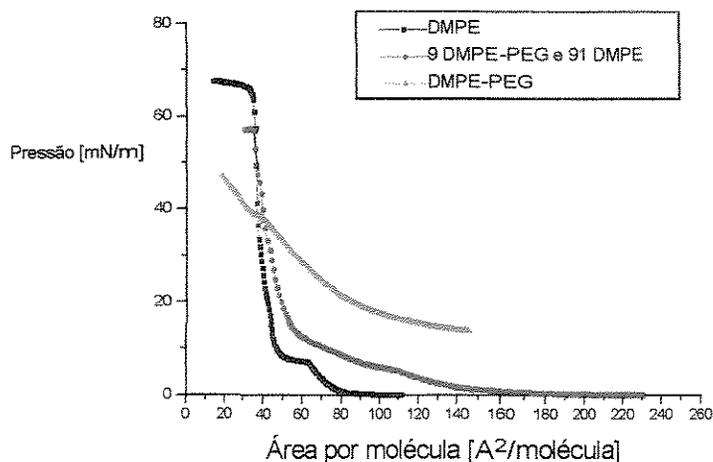


Figura 39: Curva de pressão versus área por molécula para os fosfolipídios isolados DMPE e DMPE-PEG, assim como para a mistura DMPE-PEG:DMPE (9:91).

Para a mistura em questão, a isoterma apresenta como parâmetros característicos a pressão de colapso de aproximadamente 57 mN/m e a área mínima ocupada por molécula de aproximadamente 45 Å².

O arranjo das moléculas de DMPE-PEG na interface ar-água durante a compressão das moléculas foi determinado através do gráfico de pressão versus área por molécula em escala logarítmica, como descrito em 3.9, e visualizado na Figura 40.

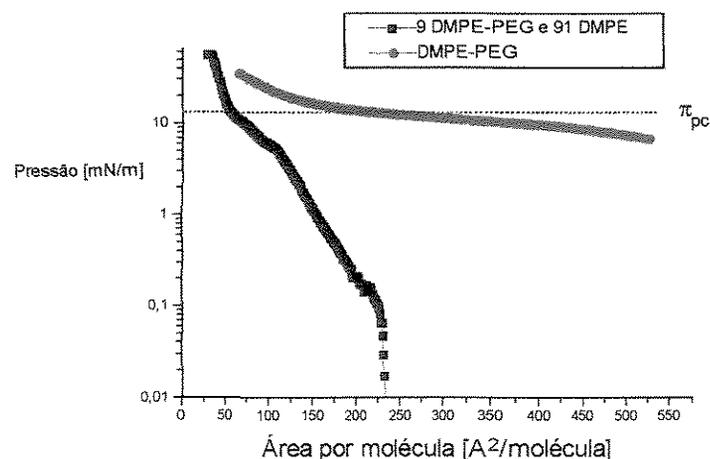


Figura 40: Curvas de pressão versus área por molécula em escala logarítmica para a mistura 9% DMPE-PEG e 91% DMPE e para o DMPE-PEG puro.

Através da Figura 40 pode-se observar um ponto de inflexão, correspondente à pressão crítica, entre 10 e 15 mN/m, significando que abaixo desse valor as moléculas do PEG estão na interface ar-água ou parcialmente estendidas na subfase aquosa, enquanto em valores acima da pressão crítica as cadeias encontram-se totalmente estendidas na subfase aquosa.

A miscibilidade do DMPE-PEG com o DMPE foi avaliada comparando-se os valores experimentais de área por molécula obtidos à várias pressões através da Figura 39 com o valor teórico correspondente à mistura ideal, calculado pela equação [7]. Esses resultados são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de área por molécula obtidos das isotermas apresentadas na Figura 39 às pressões de 20, 30 e 40 mN/m ($A_{\text{experimental}}$). Os valores teóricos foram calculados pela equação [7] ($A_{\text{teórico}}$).

Pressão [mN/m]	Fração molar DMPE:DMPE-PEG			
	100:0	0:100	91:9	
	$A_{\text{experimental}}$	$A_{\text{experimental}}$	$A_{\text{experimental}}$	$A_{\text{teórico}}$
20	42	83	50	46
30	38	55	46	40
40	36	32	43	36

Como pode ser observado, para a mistura, os valores experimentais foram maiores que os teóricos, indicando interação entre os fosfolipídios DMPE e DMPE-PEG, caracterizando miscibilidade. Essa característica também foi verificada através da pressão de colapso da mistura, a qual apresentou valor intermediário entre as pressões de colapso correspondentes aos fosfolipídios puros (Figura 39). Os desvios positivos dos valores experimentais da área por molécula em relação ao valor teórico indicam provavelmente interações do tipo repulsivas entre os fosfolipídios.

A superfície recoberta com a mistura DMPE-PEG:DMPE (9:91) na mesma condição de deposição utilizada para as misturas do item 5.4, isto é, pressão de deposição

de 20 mN/m, 6 camadas depositadas, velocidade de imersão e retirada do substrato da fase líquida de 10 mm/min e tempo de organização molecular de 150 minutos, apresentou uma variação do ângulo de contato de -2,20%, característico da presença do PEG na superfície. Ressalta-se que na pressão de 20 mN/m as cadeias de PEG provavelmente encontram-se estendidas na subfase aquosa.

A variação do tempo de fibrina em relação à placa não recoberta foi de -39,47%, indicando que a presença do DMPE-PEG, mesmo em baixa concentração, interfere na deposição do DMPE.

Analisando a imagem obtida por microscopia de força atômica, apresentada na Figura 41, observa-se a ausência de pequenos aglomerados característicos do DMPE, o que reforça o resultado obtido com o tempo de fibrina. A interferência do DMPE-PEG pode ser atribuída basicamente a dois fatores: a interação repulsiva entre o DMPE-PEG e o DMPE, como mostrado na Tabela 17, e a instabilidade das camadas depositadas na sequência de imersões. A menor hemocompatibilidade da superfície tratada com DMPE-PEG pode ser devida às interações desse lipídio derivatizado com os componentes do PVC comercial.

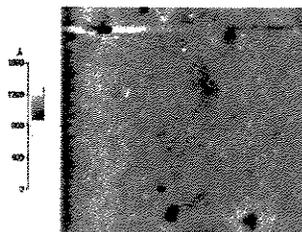


Figura 41: Microscopia de força atômica da amostra recoberta com a mistura 91% DMPE e 9% DMPE-PEG.

A adição de fosfatidilcolina à mistura DMPE-PEG:DMPE modificou significativamente o comportamento anteriormente descrito. As razões molares de DMPC, DMPE-PEG₂₀₀₀ e DMPE nas misturas foram respectivamente de 25:4,5:70,5, 25:9:66 e 25:12:63. A Figura 42 apresenta as isotermas dessas misturas, além das obtidas para as

misturas contendo 25% de DMPC e 75% de DMPE-PEG₂₀₀₀, a mistura contendo 25% de DMPC e 75% de DMPE, esta última já utilizada no item 5.4, e a correspondente ao DMPE-PEG isolado, necessárias para os estudos de miscibilidade das misturas.

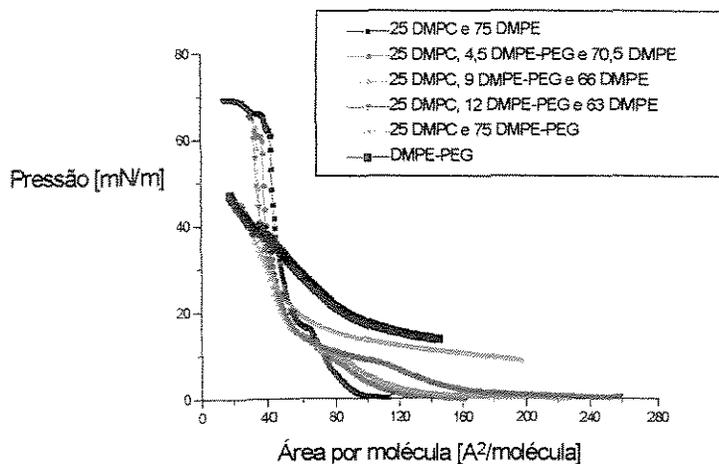


Figura 42: Curvas de pressão versus área por molécula para as misturas contendo os fosfolípidios DMPC, DMPE-PEG e DMPE e para o DMPE-PEG isolado.

Como observado na Figura 42, quanto maior a quantidade de DMPE-PEG, maior o espalhamento da isoterma, isto é, a isoterma que não contém DMPE-PEG ocupa um intervalo de área de aproximadamente 120 a 40 Å², a mistura contendo 4,5% de DMPE-PEG ocupa um intervalo de área de aproximadamente 160 a 40 Å², e assim sucessivamente. Também pode ser observado que até a pressão de 10 mN/m as isotermas das misturas com PEG apresentam uma área por molécula maior que a obtida para a isoterma da mistura 75% DMPE e 25% DMPC. Isto pode ser explicado porque, a baixas pressões, as cadeias de PEG encontram-se na interface ar-água. À pressões maiores, a área torna-se menor, indicando o estendimento das cadeias na subfase aquosa, como confirmado através da Figura 43, que apresenta a pressão de 10 mN/m como a pressão crítica.

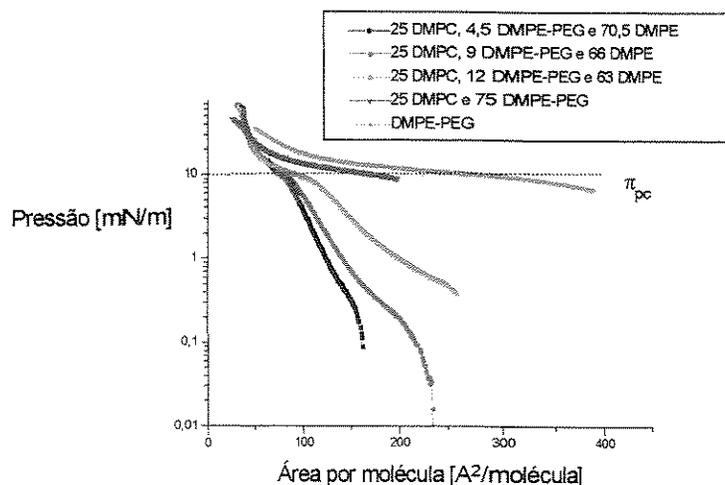


Figura 43: Curvas de pressão versus área por molécula em escala logarítmica para as misturas contendo os fosfolípidios DMPC, DMPE-PEG e DMPE e para o DMPE-PEG isolado.

As Figuras 44 a 46 mostram as isobáricas construídas a partir dos dados da Tabela 18, correspondentes à influência do DMPE-PEG na formação da monocamada lipídica.

Tabela 18: Valores de área ocupada por molécula (A) para as diferentes isotermas às pressões de 20 (A_{20}), 30 (A_{30}) e 40 (A_{40}) mN/m.

Fração molar DMPC:DMPE-PEG:DMPE	A_{20}	A_{30}	A_{40}
25:0:75	54	47	43
25:4,5:70,5	47	43	40
25:9:66	45	39	37
25:12:63	47	40	37
25:75:0	55	37	30
0:100:0	83	55	32

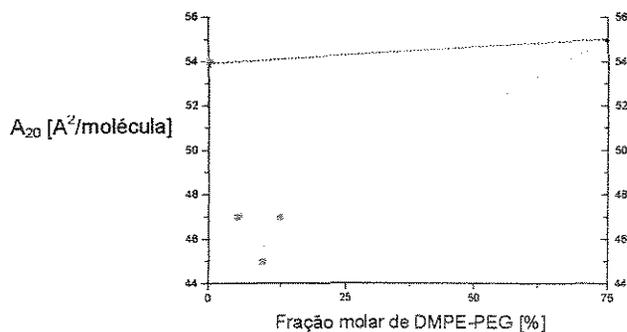


Figura 44: Área ocupada por molécula a pressão de 20 mN/m (A_{20}) em função da fração molar de DMPE-PEG.

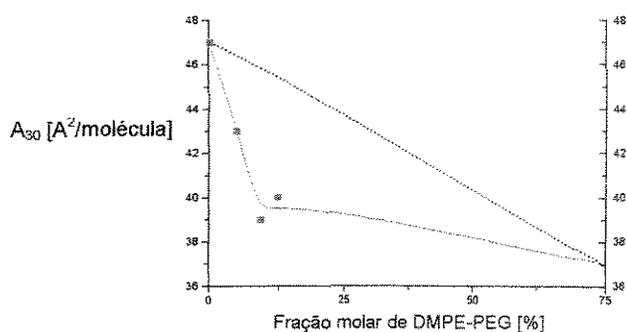


Figura 45: Área ocupada por molécula a pressão de 30 mN/m (A_{30}) em função da fração molar de DMPE-PEG.

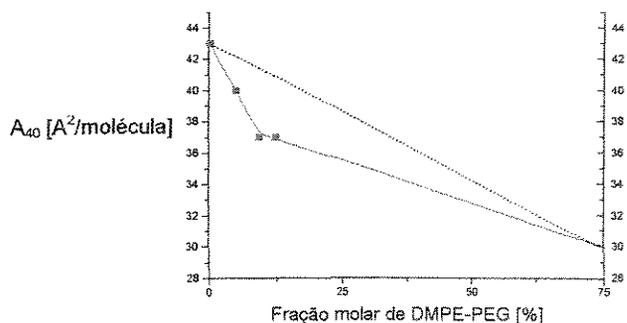


Figura 46: Área ocupada por molécula a pressão de 40 mN/m (A_{40}) em função da fração molar de DMPE-PEG.

Como pode ser observado, na Figura 44 não há variação do valor da área por molécula quando se substitui todo o DMPE por DMPE-PEG. A área por molécula de

aproximadamente 54 \AA^2 para a mistura com composição DMPE:DMPC (75:25) é a mesma para a composição DMPE-PEG:DMPC (75:25). Isso confirma a total extensão das cadeias de PEG na subfase aquosa a essa pressão. Para valores intermediários de DMPE-PEG e DMPE na mistura, a presença da fosfatidilcolina produziu desvios negativos em relação à área de 54 \AA^2 comentada anteriormente. Esses desvios indicam interações do tipo atrativas entre os componentes da mistura com a presença da fosfatidilcolina.

Nas Figuras 45 e 46 observa-se uma menor área por molécula quando se substitui todo o DMPE por DMPE-PEG. Esse comportamento pode ser causado por dois fatores: à maior interação do tipo atrativa entre as moléculas de DMPC e DMPE-PEG quando comparado com as moléculas de DMPC e DMPE, e/ou à passagem das moléculas de DMPE-PEG para a subfase aquosa durante a compressão da monocamada, provavelmente ocorrendo a agregação das moléculas sob a forma de micelas. Neste último caso, o número teórico de moléculas da mistura que deveria estar na interface é maior que o real, ocasionando o menor valor da área ocupada por molécula.

Na Tabela 19 são mostradas as variações percentuais do ângulo de contato e do tempo de fibrina.

Tabela 19: Variações percentuais do ângulo de contato e do tempo de fibrina para as placas recobertas com as misturas ternárias contendo DMPC, DMPE-PEG e DMPE na mesma condição de deposição.

Fração molar DMPC:DMPE-PEG:DMPE	$[(A_f - A_i)/A_i] * 100$ [%]	$[(T_{pr} - T_{psr})/T_{psr}] * 100$ [%]
25:4,5:70,5	+5,17	+9,02
25:9:66	+0,88	+16,86
25:12:63	-0,82	+22,14

Pode-se observar que há uma tendência para que as superfícies tornem-se menos hidrofóbicas com o aumento da porcentagem de DMPE-PEG nas misturas. Nesse caso, a

variação do tempo de fibrina foi sempre positiva e cresceu com a porcentagem de DMPE-PEG, evidenciando uma maior proteção da superfície.

As imagens obtidas por microscopia de força atômica, apresentadas na Figura 47, mostram que o DMPE-PEG exerce influência significativa na deposição da mistura DMPC-DMPE. Quanto maior a porcentagem de DMPE-PEG, mais o aspecto da superfície é semelhante ao recobrimento com o DMPE isolado, o que indica o posicionamento das cadeias de PEG a partir da superfície.

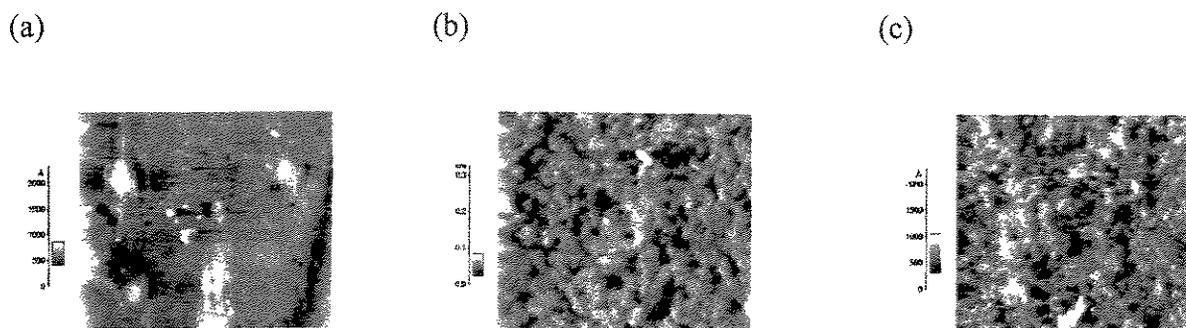


Figura 47: Microscopias de força atômica das amostras recobertas com: a) 25% DMPC, 4,5% de DMPE-PEG e 70,5% de DMPE; b) 25% DMPC, 9% de DMPE-PEG e 66% DMPE; c) 25% DMPC, 12% DMPE-PEG e 63% DMPE.

Comparando as variações do ângulo de contato e do tempo de fibrina com os valores obtidos para o recobrimento com o DMPE isolado nas mesmas condições de deposição, observa-se que no último caso os valores foram muito superiores em todas as situações. Isso deve-se provavelmente à influência do DMPE-PEG na agregação dos fosfolipídios na superfície das placas. Nessas condições o efeito estérico exercido pelas cadeias de PEG não foi superior à proteção obtida com o DMPE puro.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho foram:

- O recobrimento de placas obtidas a partir de tubos de PVC comercial com os fosfolipídios DMPE e DPPE isolados e com misturas de DMPE, DMPC e DMPE-PEG é factível.

- Em geral, o recobrimento com o fosfolipídio DMPE isolado produziu superfícies mais hidrofóbicas e tempos de fibrina superiores às superfícies não recobertas.

- Nas imagens obtidas nas microscopias de força atômica o recobrimento com DMPE apresentou-se na forma de pequenos aglomerados.

- As variáveis operacionais pressão de deposição, número de camadas depositadas, velocidade de imersão e retirada do substrato da fase aquosa e tempo de organização molecular antes do início da deposição apresentaram importância significativa no processo de recobrimento.

- A caracterização do recobrimento através dos métodos variação do ângulo de contato dinâmico e do tempo de fibrina, e de presença de depósitos, observada através das microscopias de força atômica, apresentou uma boa correlação, e permitiu uma avaliação dos recobrimentos na hemocompatibilidade do material.

- A hemocompatibilidade, medida pelo tempo de fibrina, foi inferior para as superfícies recobertas com as misturas de DMPC:DMPE em relação ao recobrimento com o DMPE isolado. O melhor resultado foi obtido com a mistura equimolar de DMPC:DMPE.

- A presença de DMPE-PEG influenciou a deposição do DMPE isolado e em misturas com o DMPC, na superfície das placas. O recobrimento com DMPE:DMPE-PEG tornou o tempo de fibrina inferior ao obtido para a placa sem recobrimento. Maior hemocompatibilidade foi obtida com a presença de DMPC na mistura DMPE:DMPE-PEG.

- Nas condições de deposição das misturas contendo DMPC:DMPE:DMPE-PEG as cadeias de PEG encontravam-se estendidas na subfase aquosa e a hidroflicidade da superfície aumentou com o aumento da porcentagem de DMPE-PEG.

- A hemocompatibilidade das placas recobertas com as misturas contendo DMPE-PEG foi inferior à obtida para o fosfolipídio DMPE isolado.

- O recobrimento com fosfolipídios é capaz de mimetizar superfícies externas de células, tornando a superfície de PVC mais hemocompatível, beneficiando a utilização do PVC em aplicações médicas.

CAPÍTULO 7

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Poderia-se realizar um estudo do aumento de escala do processo de recobrimento de tubos de PVC, visando a hemocompatibilidade. Este recobrimento poderia ser feito através da circulação de uma solução lipídica nos tubos de PVC comerciais para tratamento extracorpóreo. Nesse processo outras variáveis seriam importantes, tais como velocidade de circulação da solução, número de passagens da solução pelo tubo e organização molecular da solução lipídica.

Outra sugestão para estudo seria a utilização de fosfolipídios comerciais ao invés dos fosfolipídios puros usados no desenvolvimento desse trabalho. Com isso os gastos com materiais seriam diminuídos consideravelmente.

O recobrimento dos tubos de PVC com os fosfolipídios poderia ser feitos através de ligações covalentes, aumentando desta forma a estabilidade e resistência do recobrimento.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J.D., SMITH, L.M., GREGONIS, D.E. The Contact Angle and Interface Energetics. In: ANDRADE, J.D. **Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers.** New York: Plenum Press, 1985. p. 249-292.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos.** Campinas: Editora da UNICAMP, 1996.

BIRD, R.R., HILL, B., HOBBS, K.E.F., CHAPMAN, D. New Haemocompatible Polymers Assessed by Thrombelastography. **Journal of Biomedical Engineering**, v. 11, p. 231-234, 1989.

BÜRNER, H., WINTERHALTER, M., BENZ, R. Surface Potential of Lipid Monolayers with Grafted Polyethylene Glycols. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 168, p. 183-189, 1994.

CHAPMAN, D. Biomembranes and New Hemocompatible Materials. **The Langmuir Lectures**, v. 9, p. 39-45, 1993.

CHAPMAN, D., CHARLES, S.A. A Coat of many Lipids - in the Clinic. **Chemistry in Britain**, p. 253-256, 1992, March.

CHAPMAN, D., DURRANI, A. A. **Phospholipids acid esters, their preparation and their use for the preparation of biocompatible surfaces.** European patent. London. A1 0157469. 18.01.1985.

CHO, C.S., TAKAYAMA, T., KUNOU, M., AKAIKE, T. Platelet Adhesion onto the Langmuir-Blodgett Film of Poly(γ -benzyl-L-glutamate)-poly(ethylene oxide)-

poly(γ -benzyl-L-glutamate) Block Copolymer. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 24, p. 1369-1375, 1990.

COOKE, F.W., LEMONS, J.E., RATNER, B.D. Properties of Materials. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. cp. 1.

DESAI, N.P., HUBBELL, J.A. Solution Technique to Incorporate Polyethylene Oxide and other Water-Soluble Polymers into Surfaces of Polymeric Biomaterials. **Biomaterials**, v. 12, p. 144-153, 1991.

DI NARDO, N.J. **Nanoscale Characterization of Surfaces and Interfaces**. Weinheim: VCH, 1994. 161 p.

DURRANI, A.A., HAYWARD, J.A., CHAPMAN, D. Biomembranes as Models for Polymer Surfaces II. **Biomaterials**, v. 7, p. 121-125, 1986.

GAINES, G.L. **Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces**. New York: Interscience Publisher, 1966. cp. 6: Mixed Monolayers. p. 281-300.

GARCIA, I.L. **Tratamentos químicos de superfícies de poliuretano de grau médico para imobilização de componentes não trombogênicos**. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1995. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. p.10-11.

GREEN, J.P., PHILLIPS, M.C., SHIPLEY, G.G. Structural Investigations of Lipid, Polypeptide and Protein Multilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 330, p. 243-253, 1973.

GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1976. Cap. 9: Hemostasia e Coagulação Sanguínea. p. 89-100.

HANN, R.A. Molecular Structure and Monolayer Properties. In: ROBERTS, G. **Langmuir-Blodgett Films**. New York: Plenum Press, 1990. p. 17-41.

HANSON, S.R., HARKER, L.A. Blood Coagulation and Blood-Materials Interactions. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 193-199.

HANSON, S.R., RATNER, B.D. Testing of Blood-Materials Interactions. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 228-238.

HASMONAY, H., CAILLAUD, M., DUPEYRAT, M. Langmuir-Blodgett Multilayers of Phosphatidic Acid and Mixed Phospholipids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 89, n. 2, p. 338-344, 1979.

HAYWARD, J.A., CHAPMAN, D. Biomembrane Surfaces as Models for Polymer Design: the Potencial for Haemocompatibility. **Biomaterials**, v. 5, p. 135-141, 1984.

HAYWARD, J.A., DURRANI, A.A., LU, Y., CLAYTON, C.R., CHAPMAN, D. Biomembranes as Models for Polymer Surfaces IV. **Biomaterials**, v. 7, p. 252-258, 1986. (a)

HAYWARD, J.A., DURRANI, A.A., SHELTON, C.J., LEE, D.C., CHAPMAN, D. Biomembranes as Models for Polymer Surfaces III. **Biomaterials**, v. 7, p. 126-131, 1986. (b)

HEINZ, W.F., HOH, J.H. Spatially Resolved Force Spectroscopy of Biological Surfaces Using the Atomic Force Microscope. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 4, p.143-150, 1999.

HOFFMAN, A.S. Modification of Material Surfaces to Affect How They Interact with Blood. Blood in Contact with Natural and Artificial Surfaces, **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 96-101, 1987.

HORBETT, T.A. Principles underlying the Role of Adsorbed Plasma Proteins in Blood Interactions with Foreign Materials. **Cardiovasc. Pathol.**, vol.2, n.3, p. 137-148, 1993.

HORBETT, T.A., RATNER, B.D., SCHAKENRAAD, J.M., SCHOEN, F.J. Some Background Concepts. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. p.133-147.

HRISTOVA, K., NEEDHAM, D. Physical Properties of Polymer-Grafted Bilayers. In: LASIC, D., MARTIN, F. **Stealth Liposomes**. Boca Raton: CRC Press, 1995. cp.5.

HUL, S.W., VISWANATHAN, R., ZASADZINSKI, J.A., ISRAELACHVILI, J.N. The Structure and Stability of Phospholipid Bilayers by Atomic Force Microscopy. **Biophysical Journal**, v. 68, p. 171-178, 1995.

ISHIHARA, K., NOMURA, H., MIHARA, T., KURITA, K., IWASAKI, Y., NAKABAYASHI, N. Why do Phospholipid Polymers Reduce Protein Adsorption? **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 39, p. 323-330, 1998.

ISRAELACHVILI, J.N., MITCHELL, D.J. A Model for Packing of Lipids in Bilayer Membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 389, p. 13-19, 1975.

JOZEFONVICZ, J., JOZEFOWICZ, M. Review - Interactions of Bioespecific Functional Polymers with Blood Proteins and Cells. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, vol. 1, n.3, p. 147-165, 1990.

KIM, S.W., JACOBS, H., LIN, J.Y., NOJORI, C., OKANO, T. Nonthrombogenic Bioactive Surfaces. Blood in Contact with Natural and Artificial Surfaces, **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 116-130, 1987.

KIM, S.W., PETERSEN, R.V., LEE, E.S. Effect of Phtalate Plasticizer on Blood Compatibility of Polyvinyl Chloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 65, n.5, p. 670-673, 1976.

KNAPP, H.F., WIEGRÄBE, W., HEIM, M., ESCHRICH, R., GUCKENBERGER, R. Atomic Force Microscope Measurements and Manipulation of Langmuir-Blodgett Films with Modified Tips. **Biophysical Journal**, v. 69, n. 2, p. 708-715, 1995.

KUHL, T.L., LECKBAND, D.E., LASIC, D.D., ISRAELACHVILI, J.N. Modulation and Modeling of Interaction Forces between Lipid Bilayers Exposing Terminally Grafted Polymer Chains. In: LASIC, D., MARTIN, F. **Stealth Liposomes**. Boca Raton: CRC Press, 1995. cp.8.

LASIC, D.D. **Liposomes: from physics to applications**. Amsterdam: Elsevier, 1993. 575 p.

LITMAN, B.J. Lipid Model Membranes. Characterization of Mixed Phospholipid Vesicles. **Biochemistry**, v. 12, n.13, p. 2545-2554, 1973.

MAGONOV, S.N., WHANGBO, M.H. **Surface Analysis with STM and AFM: Experimental and Theoretical Aspects of Image Analysis**. Weinheim: VCH, 1996. 323 p.

MALMSTEN, M. Protein Adsorption at Phospholipid Surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 172, p. 106-115, 1995.

MARRECO, P.R. **Estudo do recobrimento de policloreto de vinila (PVC) com fosfatidilcolinas**. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1999. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

OKAMURA, E., UMEMURA, J., IRIYAMA, K., ARAKI, T. Microstructure of Thin Langmuir-Blodgett Films of Dipalmitoylphosphatidylcholine: Electron Microscopic Images Replicated with Plasma Polymerized Film by Glow Discharge. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 66, p. 219-223, 1993.

OSBORN, T.D., YAGER, P. Modeling Success and Failure of Langmuir-Blodgett Transfer of Phospholipid Bilayers to Silicon Dioxide. **Biophysical Journal**, v. 68, p. 1364-1373, 1995.

PETTY, M.C. Characterization and Properties. In: ROBERTS, G. **Langmuir-Blodgett Films**. New York: Plenum Press, 1990. p. 133-162.

RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S. Thin Films, Grafts and Coatings. In: RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. p.105

RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. **Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. 484 p.

REGEN, S.L., KIRSZENSZTEJN, P., SINGH, A. Polymer-Supported Membranes. A New Approach for Modifying Polymer Surfaces. **Macromolecules**, v. 16, p. 335-338, 1983.

RIBAS, A.M. **Estudo da Estabilidade de Bicamadas Lipídicas em Presença de Tensoativos.** Campinas: FEQ, UNICAMP, 1997. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

SAINT-PIERRE, M., DUPEYRAT, M. Measurement and Meaning of the Transfer Process Energy in the Building up of Langmuir-Blodgett Multilayers. **Thin Solid Films**, v. 99, p. 205-213, 1983.

SCHÜRCH, S., WALLACE, J.A. A Simple and Inexpensive Means of Preparing Langmuir-Blodgett Films using Phospholipids on Glass Surfaces. **Colloids and Surfaces**, v. 40, p. 195-205, 1989.

SOFF, G.A., ROSENBERG, R.D. Physiology of Hemostasis: the Fluid Phase. In: NATHAN, D.G., OSKI, F.A. **Hematology of Infancy and Childhood.** 4th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. p. 1534-1560.

SZABLEWSKI, M., MARTIN, P. Tensiometer and Langmuir-Blodgett Troughs. **Operating Manual**, Nima Technology Ltd., 1995.

TAMM, L.K., MCCONNELL, H.M. Supported Phospholipid Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 47, p. 105-113, 1985.

VAN DER HEIDEN, A.P., WILLENS, G.M., LINDHOUT, T., PIJERS, A.P., KOOLE, L.H. Adsorption of Proteins onto Poly(ether urethane) with a Phosphorylcoline moiety and Influence of Preadsorbed Phospholipid. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 40, n.2, p. 195-203, 1998.

WOODLE, M.C., PARK, M., MARTIN, F.J., YAU-YOUNG, A., REDEMAN, C.T., CREEK, W. **Liposomes with enhanced circulation time.** United States Patent. N. 5.013.556. 07.05.1991.

ZASADZINSKI, J.A.N., HELM, C.A., LONGO, M.L., WEISENHORN, A.L., GOULD, S.A.C., HANSMA, P.K. Atomic Force Microscopy of Hydrated Phosphatidylethanolamine Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 59, p. 755-760, 1991.

ZASADZINSKI, J.A.N., VISWANATHAN, R., MADSEN, L., GARNAES, J., SCHWARTZ, D.K. Langmuir-Blodgett Films. **Materials Science**, v. 263, p.1726-1733, 1994.

ANEXO I
AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS NO
PROCESSO DE DEPOSIÇÃO DOS FILMES

Experimentos preliminares com o fosfolípido DMPE foram realizados para a análise da influência das variáveis do processo de deposição dos filmes de LB nas placas de PVC. A Tabela 20 e as Figuras 48 a 53 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 20: Resumo dos resultados para as placas da análise gráfica.

Placa	$\gamma_{H2O\ a}$	θ_{avanco}	Deposição	$\gamma_{H2O\ a}$	θ_{avanco}	Espessura da placa [cm]	[(Af-Ai)/Ai]*100 [%]
	$\gamma_{H2O\ d}$ [mN/m]	$\theta_{retrocesso}$ [°]		$\gamma_{H2O\ d}$ [mN/m]	$\theta_{retrocesso}$ [°]		
56*	74,16	97,69±1,87	P=40mN/m 30 camadas v=10mm/min	74,21	90,45±1,38	0,073±0,005	-7,41 0,84
	58,50	65,76±2,06		53,84	66,31±0,23		
57*	73,94	88,35±1,30	P=20mN/m 30 camadas v=10mm/min	74,46	89,61±1,36	0,075±0,002	1,43 6,51
	54,84	65,62±0,43		54,97	69,89±0,34		
58*	74,02	89,43±1,22	P=30 mN/m 30 camadas v=10mm/min	74,24	91,77±0,39	0,070±0,006	2,62 11,13
	55,04	65,14±0,27		54,60	72,39±0,55		
59*	74,04	89,94±1,71	P=20mN/m 6 camadas v=10mm/min	74,26	93,78±1,12	0,089±0,003	4,27 6,41
	54,75	66,27±1,11		54,62	70,52±0,45		
60*	74,14	93,14±5,67	P=25mN/m 6 camadas v=10mm/min	72,23	93,32±0,07	0,077±0,004	0,19 11,44
	58,30	64,95±1,04		54,67	72,38±1,50		
61*	74,24	98,94±1,46	P=40mN/m 6 camadas v=10mm/min	74,16	92,26±1,25	0,087±0,003	-6,75 -17,45
	54,87	74,54±1,60		53,27	61,53±0,77		
62*	74,14	91,70±0,81	P=30mN/m 16 camadas v=10mm/min	73,38	91,08±1,13	0,083±0,004	-0,68 4,44
	54,89	66,84±0,12		54,50	69,81±0,38		
63*	74,14	92,09±1,48	P=30mN/m 2 camadas v=10mm/min	73,57	91,32±1,76	0,086±0,004	-0,84 -0,39
	54,97	69,26±0,21		54,65	68,99±0,39		
64*	74,24	91,37±5,51	P=20mN/m 2 camadas v=10mm/min	73,38	91,22±0,20	0,070±0,004	-0,16 6,53
	56,51	65,41±0,53		54,67	69,68±0,05		
66*	73,92	91,74±4,17	P=30mN/m 30 camadas v=5mm/min	73,77	90,29±1,39	0,084±0,004	-1,58 9,18
	55,11	64,89±0,72		54,67	70,85±0,37		

67**	74,06 54,92	92,92±2,25 67,20±1,47	P=30mN/m 30 camadas v=10mm/min	74,04 54,70	99,60±1,08 79,43±0,21	0,079±0,007	7,19 18,20
68*	74,14 57,00	107,52±8,19 77,27±0,13	P=30mN/m 30 camadas v=1mm/min	73,97 54,67	88,14±1,12 69,97±3,02	0,081±0,009	-18,02 -9,45

* Gotejamento da solução lipídica, fechamento das barreiras até a pressão desejada, início da deposição.

** Gotejamento da solução lipídica, espera de 30 minutos; fechamento das barreiras até a pressão desejada, espera de 2 horas, início da deposição.

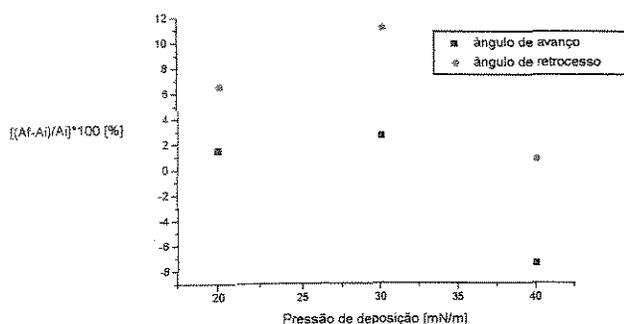


Figura 48: Pressão de deposição versus variação percentual do ângulo de contato para 30 camadas de deposição (placas 56, 57 e 58).

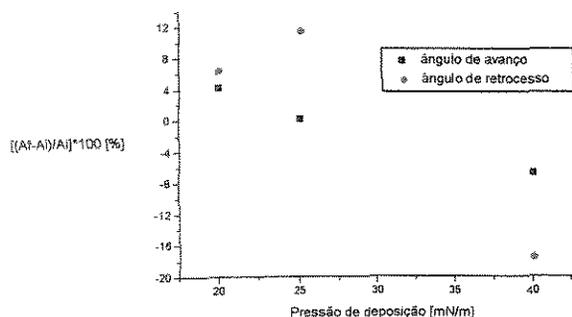


Figura 49: Pressão de deposição versus variação percentual do ângulo de contato para 6 camadas de deposição (placas 59, 60 e 61).

Os gráficos de pressão mostraram uma tendência de decréscimo da variação percentual do ângulo de contato de avanço, quando a pressão varia de 20 a 40 mN/m. Os gráficos mostraram que existe um valor máximo de variação percentual para o ângulo de retrocesso em uma pressão intermediária entre 20 e 40 mN/m.

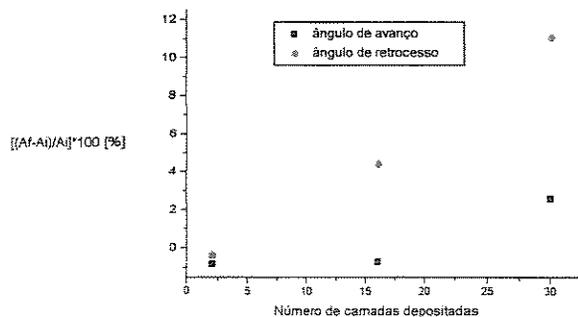


Figura 50: Número de camadas depositadas versus variação percentual do ângulo de contato para $P = 30 \text{ mN/m}$ (placas 58, 62 e 63).

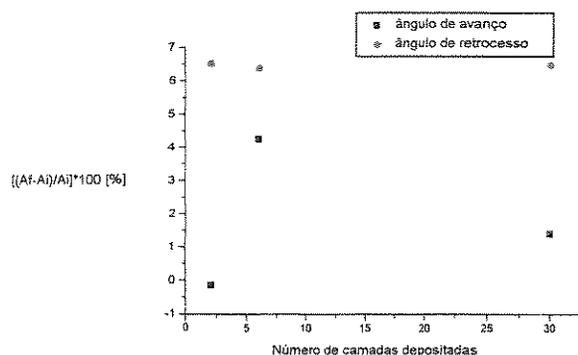


Figura 51: Número de camadas depositadas versus variação percentual do ângulo de contato para $P = 20 \text{ mN/m}$ (placas 57, 59 e 64).

Na Figura 50 observa-se que a variação percentual do ângulo de contato cresce com o número de camadas. Na Figura 51 os resultados apresentaram-se aleatórios, isto pode ser explicado pelo fato que na pressão de 20 mN/m as moléculas não encontram-se devidamente empacotadas.

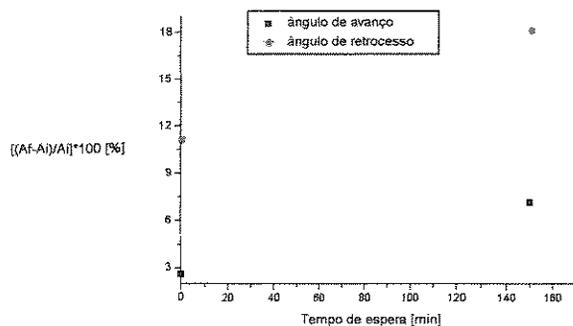


Figura 52: Tempo de espera versus variação percentual do ângulo de contato para $P=30\text{mN/m}$, 30 camadas (placas 58 e 67).

O tempo de espera para o início da deposição apresentou uma tendência a aumentar a variação percentual do ângulo de contato.

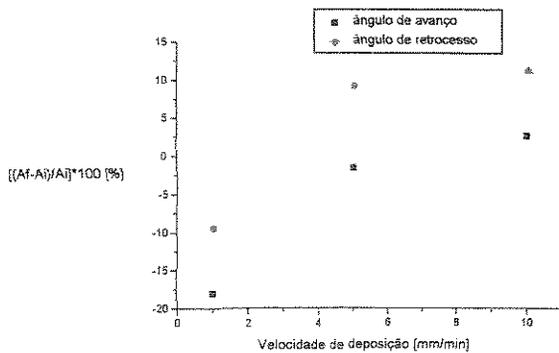


Figura 53: Velocidade de deposição versus variação percentual do ângulo de contato para $P=30\text{mN/m}$, 30 camadas (placas 58 , 66 e 68).

A velocidade de deposição também parece influenciar o processo, quando se compara a velocidade de 1 mm/min com as demais. Para as velocidades de 5 e 10mm/min as respostas foram aproximadamente iguais.

Os resultados obtidos desta avaliação preliminar mostram que as variáveis pressão de deposição, número de camadas depositadas, velocidade de imersão e retirada do substrato da fase líquida e tempo de organização molecular antes do início da deposição são importantes para o processo, necessitando portanto de determinação quantitativa do grau de influência relativo entre elas. Neste sentido, foi realizado um planejamento fatorial fracionário, cujos resultados são mostrados no item 5.3.3.