

**OBTENÇÃO DE COPOLÍMEROS DE ENXERTO VIA RADIAÇÃO
IONIZANTE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE SUAS
PROPRIEDADES HEMOCOMPATIVAS**

ALVARO ANTONIO ALENCAR DE QUEIROZ

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear

Orientadora: Dra. Olga Zazuco Higa

São Paulo

1993

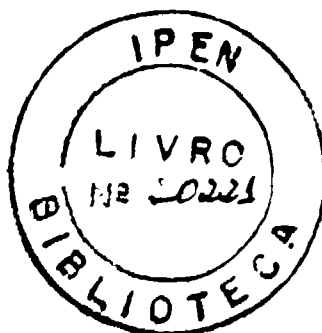
**OBTENÇÃO DE COPOLÍMEROS DE EMERTO VIA RADIAÇÃO IONIZANTE,
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE SUAS PROPRIEDADES HEMOCOMPATÍVEIS**

Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

**Tese apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção
do Grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear.**

Orientadora: Dra. Olga Zazuco Higa

1993



OBTENÇÃO DE COPOLÍMEROS DE ENXERTO VIA RADIAÇÃO IONIZANTE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE SUAS PROPRIEDADES HEMOCOMPATÍVEIS.

Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos o preparo e a caracterização de copolímeros de enxerto por polimerização induzida por radiação e o estudo de suas propriedades hemocompatíveis. A relação entre as condições de enxertia e a antitrombogenicidade foi examinada com o propósito de selecionar a necessidade do controle das condições de enxertia para aumentar a compatibilidade dos copolímeros com o sangue. Optou-se por dois métodos de irradiação para a obtenção dos filmes poliméricos enxertados: irradiação simultânea em fonte de ^{60}Co e pré-irradiação (peroxidação) em acelerador de elétrons. Preliminarmente foi realizado um estudo dos parâmetros de enxertia dos monômeros vinílicos N,N-dimetilacrilamida (DMAA) e ácido acrílico (AA) sobre os substratos poliméricos: poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), poli(etileno-co-tetrafluoroetileno) (PETFE), polietileno de baixa densidade (PEBD) e poli(cloreto de vinila) (PVC). O método da irradiação simultânea foi efetivo na copolimerização de todos os substratos poliméricos estudados, sendo, entretanto, o método da peroxidação mais eficiente na obtenção dos copolímeros PETFE-g-DMAA, PEBD-g-AA e PVC-g-AA. A homopolimerização na enxertia do AA sobre o PEBD e PVC foi diminuída com a adição do comonômero ácido N,N-dimetilacrílico (DMA).

Para ambos os monômeros, DMAA e AA, baixas taxa de dose e dose de irradiação demonstraram ser mais efetivas na obtenção dos copolímeros de enxerto. A caracterização dos copolímeros de enxerto por FTIR-MIR e ESCA mostraram uma distribuição homogênea do PDMAA e PAA sobre os substratos poliméricos estudados. A hidrofiliçidade das superfícies poliméricas após o processo de enxertia foi evidenciado por medidas do ângulo de contato e sorção de água. Dados termoanalíticos como temperatura de transição vítrea, T_g , foram utilizados na determinação da biocompatibilidade, observando-se as alterações na tensão crítica de superfície de alguns copolímeros de enxerto (PTFE-g-DMAA, PETFE-g-DMAA e PEBD-g-AA). A análise da topografia das superfícies poliméricas dos filmes de PTFE, PETFE e PVC mostrou que estas tornaram-se rugosas após o processo de enxertia. A hemocompatibilidade foi avaliada por testes "in vitro" que compreenderam a adsorção de albumina de soro bovino (BSA), fibrinogênio e γ -globulina, estudo da adesão de plaquetas e a cinética da formação de trombos. A imobilização do BSA sobre os copolímeros PEBD-g-AA e PVC-g-AA melhorou a propriedade antitrombogênica de suas superfícies.

**OBTENTION OF GRAFT COPOLYMERS BY IONIZING RADIATION,
CHARACTERIZATION AND STUDY OF HEMOCOMPATIBLE PROPERTIES.**

Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

ABSTRACT

The present work had as objectives the obtention and characterization of grafting copolymers by radiation induced polymerization and the study of its hemocompatible properties. The relationship between grafting conditions and antitrombogenicity was examined for the purpose of clearing the necessity of controlling grafting conditions to enhance the copolymers blood compatibility. Two methods were chosen to accomplish the irradiation: mutual and pre-irradiation (peroxidation) of the films in ⁶⁰Co source and electron beam accelerator. Primarily grafting parameters were studied in the systems of the monomers N,N-dimethylacrylamide (DMAA) and acrylic acid (AA) with the polymeric films: poly(tetrafluoroethylene) (PTFE), poly(ethylene-co-tetrafluoroethylene) (PETFE), low density polyethylene (LDPE) and poly(vinyl chloride) (PVC). The simultaneous irradiation was effective in the polymerization of all the substrates above mentioned, although the peroxidation method has given better results for PETFE-g-DMAA, LDPE-g-DMAA, LDPE-g-AA and PVC-g-AA. In the system AA/LDPE and AA/PVC the homopolymerization was controlled by the addition of the comonomer N,N-dimethylacrylic acid (DMA). As for the grafting parameters, low dose rate and low irradiation dose, showed to be very effective for the graftability of DMAA and AA on the substrates.

Abreviações utilizadas neste trabalho

PEBD:	Poli(etileno de baixa densidade)
PTFE:	Poli(tetrafluoro-etileno)
PETFE:	Poli(etileno-co-tetrafluoro-etileno)
PVC:	Poli(cloreto de vinila)
DMAA:	N,N-dimetilacrilamida
DMA:	Ácido N,N-dimetilacrílico
AA:	Ácido acrílico
ESCA:	Espectroscopia eletrônica para análise química
MEV:	Microscopia eletrônica de varredura
EDS:	Sistema de energia dispersivo
FTIR-MIR:	Espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier e acessório de múltipla reflexão interna
DSC:	Calorimetria exploratória diferencial
BSA:	Albumina de soro bovino
g:	Enxerto
co:	Copolímero
i:	Imobilizado
PTFE-g-DMAA:	Poli(tetrafluoro-etileno-g-N,N-dimetilacrilamida)
PETFE-g-DMAA:	Poli(etileno-co-tetrafluoro-etileno-g-N,N-dimetilacrilamida)
PEBD-g-DMAA:	Poli(etileno-g-N,N-dimetilacrilamida)
PEBD-g-AA:	Poli(etileno-g-ácido acrílico)
PVC-g-AA:	Poli(cloreto de vinila-g-ácido acrílico)
PEBD-g-AA-i-BSA:	Poli(etileno-g-ácido acrílico-i-albumina)
PVC-g-AA-i-BSA:	Poli(cloreto de vinila-g-ácido acrílico-i-albumina)
PDMAA:	Poli(N,N-dimetilacrilamida)
PAA:	Poli(ácido acrílico)

An homogenous distribution of the polymeric chains of PDMAA and PAA onto the substrates was pointed out by FTIR-MIR and ESCA analysis. Thermal analysis results, as glass transition temperature, T_g , were used to determine the biocompatibility through the observation of surface critical tension (γ_c) of some grafted copolymers (PTFE-g-DMAA, PETFE-g-DMAA, LDPE-g-DMAA and LDPE-g-AA). Contact angle measurements and water sorption emphasized the hydrophilicity of the copolymers. SEM observation of grafted PTFE, PETFE and PVC films showed roughness in the surface texture. Hemocompatibility was evaluated by "in vitro" tests as albumin, fibrinogen and γ -globulin adsorption, coating adhered platelets and kinetics of thrombus formation. BSA immobilization on the LDPE-g-AA and PVC-g-AA enhanced the antithrombogenic property of LDPE and PVC.

γ_{sv} :	Tensão interfacial sólido-vapor
γ_{sl} :	Tensão interfacial sólido-líquido
γ_{lv} :	Tensão interfacial líquido-vapor
θ :	Ângulo de contato (grau)
T:	Temperatura (K)
V:	Volume
n:	Número de moles
F:	Energia livre de Helmholtz
ω_a :	Trabalho de adesão
ω_i :	Trabalho de imersão
ω_s :	Trabalho de espalhamento
h:	Constante de Planck
ν :	Frequência da radiação eletromagnética
E_1 :	Energia de ligação elétron-núcleo
E_k :	Energia do fotoelétron emitido
eV:	Elétron-volt
T_g :	Temperatura de transição vítrea
S:	Intumescimento (%)
G:	Enxertia (%)
H:	Conteúdo de água no hidrogel (%)
PBS:	Solução tampão fosfato
γ_c :	Tensão crítica de superfície

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Objetivos	8
2- ASPECTOS GERAIS	12
2.1- POLIMERIZAÇÃO	12
2.1.1- Hidrogéis	12
2.1.2- Polimerização induzida por radiação	14
2.1.3- Copolimerização por enxertia induzida pela radiação	16
2.1.4- Métodos de enxertia por radiação	21
2.2- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	23
2.2.1- Hidrofilicidade	23
2.2.1.1- Ângulo de contato	23
2.2.1.2- Conteúdo de água	25
2.2.2- Estrutura dos polímeros	26
2.2.3- Métodos espectroscópicos	29
2.2.3.1- Espectroscopia no infravermelho por reflectância (FTIR-MIR)	29
2.2.3.2- Espectroscopia eletrônica para análise química (ESCA)	31
2.2.4- Análise térmica	32
2.2.5- Análise topográfica por MEV	33
2.3- AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE	33
2.3.1- Composição do sangue	34
2.3.2- Adsorção de proteínas	36
2.3.3- Ativação de plaquetas	38
2.3.4- Cascata da coagulação	38
2.4- IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	39

3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	43
3.1- POLIMERIZAÇÃO	43
3.1.1- Intumescimento	43
3.1.2- Método da irradiação simultânea	44
3.1.3- Método da pré-irradiação	46
3.2- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	47
3.2.1- Conteúdo de água no hidrogel	47
3.2.2- Ângulo de contato	48
3.2.3- Espectroscopia no infravermelho	48
3.2.4- Espectroscopia eletrônica para análise química (ESCA)	50
3.2.5- Análise térmica (DSC)	50
3.2.6- Análise por microscopia eletrônica de varredura (NEV)	52
3.3- AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE	52
3.3.1- Marcação de proteínas com ¹²⁵ I	53
3.3.2- Adsorção de proteínas	53
3.3.3- Contagem de plaquetas aderidas	55
3.3.4- Formação de trombos	56
3.3.5- Inobilização de albumina	57
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1- PARÂMETROS DE INÉRTIA	60
4.1.1- Efeito solvente	61
4.1.2- Efeito do inibidor de homopolimerização	65
4.1.3- Efeito da concentração do monômero	70
4.1.4- Efeito da taxa de dose de irradiação	74
4.1.5- Efeito da dose de irradiação	78
4.1.6- Efeito da temperatura de irradiação	80
4.1.7- Efeito da extração do plastificante do substrato	83

4.2- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	85
4.2.1- Hidrofilicidade	85
4.2.2- Estudos espectroscópicos	87
4.2.3- Análise térmica	107
4.2.4- Análise topográfica por MEV	111
4.3- AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE DOS COPOLÍMEROS DE ENDERTO	115
4.3.1- Adsorção de proteínas séricas	115
4.3.2- Adesão de plaquetas	120
4.3.3- Formação de trombos	126
4.3.4- Imobilização de albumina	131
5- CONCLUSÕES	138
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140

1- INTRODUÇÃO

Apesar de sua existência ser tão antiga quanto a da própria medicina, os biomateriais começaram a ser utilizados de forma progressiva no presente século. A aplicação de biomateriais desenvolveu-se notadamente na cirurgia reparadora a partir de 1960 por duas razões: a necessidade de dispor-se de sistemas que pudessem desempenhar total ou parcialmente as funções de um órgão ou tecido danificado e o grande desenvolvimento científico e tecnológico produzidos neste campo nos últimos trinta anos, graças à estreita colaboração entre cirurgiões, engenheiros, físicos, químicos, biólogos e farmacêuticos.

O trabalho realizado por grupos de investigação científica tem originado elementos que tem permitido desenvolver componentes estruturais para melhorar sensivelmente a qualidade de vida e a saúde de pacientes que necessitem da utilização dos biomateriais.

Um biomaterial pode ser definido como um material utilizado no tratamento de pacientes que, em algum estágio, permanece em contato com o tecido por um intervalo de tempo significativo, de modo que a interação entre o tecido e o material é um importante fator no tratamento¹.

A evolução de sistemas implantáveis não só tem dependido da participação de equipes multidisciplinares, como também do desenvolvimento de materiais compósitos que proporcionem ao sistema, propriedades específicas.

Tão importante quanto a constituição dos dispositivos implantáveis são as características estruturais e morfológicas de suas superfícies, uma vez que os fenômenos de interfase (formação de cápsula fibrosa, adesão protéica ou celular) são responsáveis pela aceitação ou rejeição de um biomaterial. Por este motivo, um implante de aplicação em cirurgia reparadora deve possuir algumas características superficiais que promovam a aceitação do implante pelo tecido adjacente².

Em outras aplicações, como na cirurgia cardiovascular, é necessário que a adesão de plaquetas no material seja mínima, sendo que em alguns dispositivos induz-se um crescimento prévio de células endoteliais na superfície para prevenir coagulação sanguínea³.

Devido à sua múltipla funcionalidade, os biomateriais devem possuir uma combinação de propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas, necessárias para cada tipo de aplicação.

Assim, no desenvolvimento dos implantes de articulações do joelho e quadril, especialistas das mais diferenciadas formações tem efetuado combinações variadas de metais, para obter compósitos reforçados de alta tenacidade e resistência, nos quais se inclui toda uma série de componentes cerâmicos bioestáveis ou bioativos⁴. Por outro lado, o desenvolvimento de um coração artificial, ou de próteses vasculares, requerem biomateriais com características bem diferentes das anteriores, necessitando o organismo neste caso, de materiais moles, flexíveis, com excelente resistência à fadiga, superfícies pouco aderentes e totalmente hemocompatíveis. Entre estes dois exemplos podem-se encontrar biomateriais com aplicações muito diversas, como próteses intraoculares e lentes de contato⁵, sistemas de diálise⁶, prótese máxilo-facial⁷ e drogas poliméricas⁸ entre outras.

Com a maior demanda de materiais para aplicações biomédicas, os sistemas poliméricos passaram a ter utilizações bastante diferenciadas, tendo em vista as possibilidades que oferecem de poder combinar suas características como disponibilidade, variedade de composições e formas com propriedades tais como resistência mecânica, inércia química, transparência, etc para fins altamente específicos. Estes materiais compósitos podem ser constituídos por polímeros de origem natural como os polissacarídeos (celulose, amilose, amilopectina, quitina), os polipeptídeos e proteínas, (colágeno, gelatina, albumina, etc) e por polímeros sintéticos (politetrafluoro-etileno, polietileno, polipropileno, policloreto de vinila, polímeros acrílicos, poliésteres, poliamidas, poliuretanos, polianidridos dentre outros.

Biomateriais incluem por definição, polímeros biocompatíveis e polímeros biofuncionais⁹. O primeiro inclui dois tipos de materiais poliméricos, os polímeros compatíveis com o sangue, também denominados hemocompatíveis ou antitrombogênicos, e os histocompatíveis (compatíveis com tecidos biológicos).

De uma maneira geral, podemos considerar que os fenômenos que aparecem nas interações tecido-implante podem ser agrupados em²:

1. Efeitos iniciais que aparecem na interfase implante-tecido em um curto intervalo de tempo (segundos ou minutos) imediatamente após o contato entre o biomaterial e os tecidos. Normalmente está associado a uma deposição protéica na superfície do implante, atuando como um recobrimento.
2. Efeitos provocados pela presença do implante no tecido adjacente ao implante. Estes efeitos podem ser indiretos ou surgirem no decorrer dos anos.

3. Variações ou alterações produzidas no implante como consequência da reação dos tecidos, normalmente descritos como corrosão ou degradação.
4. Sequelas da reação interfacial que surgem sistemicamente (ou seja, através de todo o corpo) e em algum sítio específico, porém remoto.

Apesar do mecanismo e princípios serem diferentes, estes quatro aspectos da interação tecido-biomaterial são interrelacionados e constituem o conceito de biocompatibilidade.

A compatibilidade com o sangue ou hemocompatibilidade, de importância na determinação do desempenho de dispositivos cardiovasculares, tem sido considerado algo separado de outros aspectos da biocompatibilidade, tendo em vista as reações específicas do tecido sanguíneo com o implante.

A obtenção de materiais poliméricos hemocompatíveis pode ser efetuada através de duas abordagens:

- a) Síntese de materiais cujas interações com os componentes do sangue são minimizadas.
- b) Síntese de materiais capazes de inibir algum dos processos que produzem a cascata da coagulação.

Com referência ao primeiro caminho, o tratamento de superfícies como a hidrofilição, tem sido empregado para melhorar a propriedade hemocompatível de materiais poliméricos. Neste tratamento, o uso da técnica de enxertia pode ser um caminho efetivo e conveniente para produzir estas superfícies.

A idéia da enxertia de monômeros hidrofílicos sobre superfícies hidrofóbicas deve-se aos trabalhos de Witcherle e Lim que constataram que polímeros hidrofílicos ou hidrogéis exibiam uma biocompatibilidade¹⁰. A partir dos trabalhos de Chen¹¹, Chapiro¹² e Hoffman¹³, muitos trabalhos tem sido publicados a respeito da obtenção de copolímeros de enxerto via radiação ionizante e alguns biomateriais poliméricos com propriedade hemocompatível foram sintetizados pela enxertia de monômeros hidrofílicos sobre polímeros comerciais através de irradiação¹⁴.

A síntese de polímeros utilizando a radiação ionizante, apresenta algumas vantagens em relação às metodologias convencionais porque envolve a formação de radicais livres ou reações iônicas, não havendo a necessidade da adição de catalisadores ou de aquecimento do sistema reacional¹⁵. Dentre as várias aplicações desta técnica destaca-se a síntese de copolímeros de enxerto para a preparação de membranas trocadoras de íons¹⁶ e polímeros especiais utilizados na medicina e biotecnologia¹⁷.

Com relação à síntese de materiais, capazes de inibir algum dos processos que produzem a cascata da coagulação, dos trabalhos produzidos neste sentido, destacam-se os de Chang comprovando que superfícies poliméricas hemocompatíveis também podem ser obtidas pelo recobrimento de suas superfícies com albumina¹⁸⁻¹⁹. Outros autores mostram que a imobilização da heparina e enzimas fibrinolíticas previnem a formação de coágulo²⁰⁻²¹.

Embora a área de biomateriais esteja amplamente desenvolvida em países do primeiro mundo, como demonstra a literatura²², o Brasil carece de pesquisas neste campo, particularmente na área cardiovascular.

Pretende-se desenvolver um "know-how" nacional na área de polímeros hemocompatíveis, desde que estes materiais tem grande aplicação na fabricação de catéteres, bolsas de sangue, marcapassos, válvulas cardíacas, entre outras aplicações.

Com o fim de tornar economicamente mais viável a fabricação de órgãos artificiais, urge modificar-se a superfície dos polímeros comercialmente disponíveis, melhorando ou imputando-lhes propriedades antitrombogênicas, o que pode ser alcançado pela técnica de copolimerização por enxertia.

A obtenção destes materiais utilizando a radiação ionizante tornou-se alvo de grandes investimentos pelos países desenvolvidos em função do grande potencial envolvido²³.

Otsuhata e outros²⁴⁻²⁵ estudaram os parâmetros de enxertia do monômero hidrofílico (N,N-dimetilacrilamida) (DMAA) sobre o poli(tetrafluoro-etileno) (PTFE) e o poli(etileno-co-tetrafluoro-etileno) (PETFE) e a relação taxa de dose/ rugosidade. Concluíram que esses parâmetros parecem desempenhar um papel importante na antitrombogenicidade do hidrogel.

Não é bem conhecido ainda qual tipo de estrutura de monômero hidrofílico iônico ou não iônico pode gerar um hidrogel com uma melhor ou pior antitrombogenicidade, ou que combinações substrato polimérico-monômero é a mais adequada para este fim.

Com relação à obtenção de copolímeros de enxerto, derivados do DMAA e ácido acrílico (AA) via radiação ionizante, verificou-se que existem alguns pontos que não foram suficientemente explorados, a saber:

- a) O processo de enxertia induzido pela radiação tem sido feito pelo método da enxertia simultânea ou pré-irradiação, porém pouca ênfase tem sido dada à peroxidação do substrato.
- b) Poucos substratos poliméricos foram enxertados, podendo-se portanto examinar-se uma maior variedade de polímeros comerciais e discutir-se uma relação enxertabilidade/hemocompatibilidade.
- c) Os trabalhos em sua maioria utilizam o processo de irradiação simultânea, sendo o processo de obtenção de hidrogéis a partir de elétrons acelerados, pouco empregado.
- d) A relação entre as propriedades de superfície como a variação da tensão crítica de superfície com o processo de enxertia e a hemocompatibilidade.
- e) A caracterização por métodos espectroscópicos como o ESCA e o FTIR-MIR.

Quanto ao estudo da propriedade hemocompatível destes copolímeros de enxerto, pode-se dizer que:

- a) Para os monômeros DMAA e AA os fenômenos de adsorção protéica não foram relacionados consubstancialmente à hemocompatibilidade dos hidrogéis.

- b) A imobilização de biocomponentes que inibem o fenômeno de coagulação como a albumina, sobre o hidrogel de AA e o estudo cinético da coagulação não foi encontrado na literatura.
- c) A avaliação da adesão plaquetária é feita por MEV. O estudo das superfícies rugosas dos hidrogéis de DMAA e AA foi feita por epi-fluorescência.

1.1- Objetivos

Este trabalho teve por objetivo investigar a enxertabilidade do monômero hidrofílico não iônico N,N-dimetilacrilamida (DMAA) sobre as matrizes poliméricas de poli(tetrafluoro-etileno) (PTFE), poli(etileno-co-tetrafluoro-etileno) (PETFE), polietileno de baixa densidade (PEBD) e do monômero hidrofílico aniônico, ácido acrílico (AA), sobre o PEBD e poli(cloreto de vinila) (PVC) com a finalidade de melhorar ou imputar a propriedade hemocompatível aos referidos substratos poliméricos, utilizando o processo de enxertia via irradiação simultânea e pré-irradiação.

Foram considerados os efeitos das seguintes variáveis do sistema de polimerização: taxa de dose de irradiação; dose de irradiação; solvente; concentração do monômero; temperatura; inibidor de homopolimerização; tipo de radiação (eletromagnética e corpuscular).

Os copolímeros de enxerto foram caracterizados físico-quimicamente através de medidas de hidrofiliicidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrometria na região do infravermelho (FTIR-MIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica para análise química (ESCA) e medidas do ângulo de contato.

Estudou-se a influência do percentual de enxertia na imobilização da albumina de soro bovino (BSA) nos copolímeros de enxerto PEBD-g-AA e PVC-g-AA.

As amostras obtidas com diferentes níveis de enxertia e com a proteína imobilizada foram estudadas com respeito à propriedade hemocompatível por ensaios *in vitro* que englobaram:

- a) Adsorção nas superfícies de albumina de soro bovino (BSA), fibrinogênio e gama globulina marcadas com ¹²⁵ I.
- b) Estudo da cinética de coagulação.
- c) Estudo da adesão de plaquetas.

Em resumo, para a realização dos objetivos deste trabalho, os seguintes passos foram programados:

- a) Seleção do solvente ideal para o processo de copolimerização com base no intumescimento dos polímeros estudados.
- b) Estudo da adição de inibidores de homopolimerização como íons metálicos e comonômero no processo de copolimerização por enxertia.
- c) Determinação dos parâmetros de enxertia dos monômeros sobre os substratos estudados.

- d) Utilização da radiação eletromagnética de alta energia (raios gama) e elétrons acelerados.
- e) Caracterização físico-química das superfícies dos copolímeros de enxerto.
- f) Ativação química das superfícies enxertadas com ácido acrílico (AA) para imobilização da albumina de soro bovino (BSA).
- g) Avaliação da propriedade hemocompatível das superfícies dos copolímeros de enxerto em relação à superfície não modificada.

A Figura 1 mostra o esquema seguido no desenvolvimento de superfícies poliméricas compatíveis com o sangue.

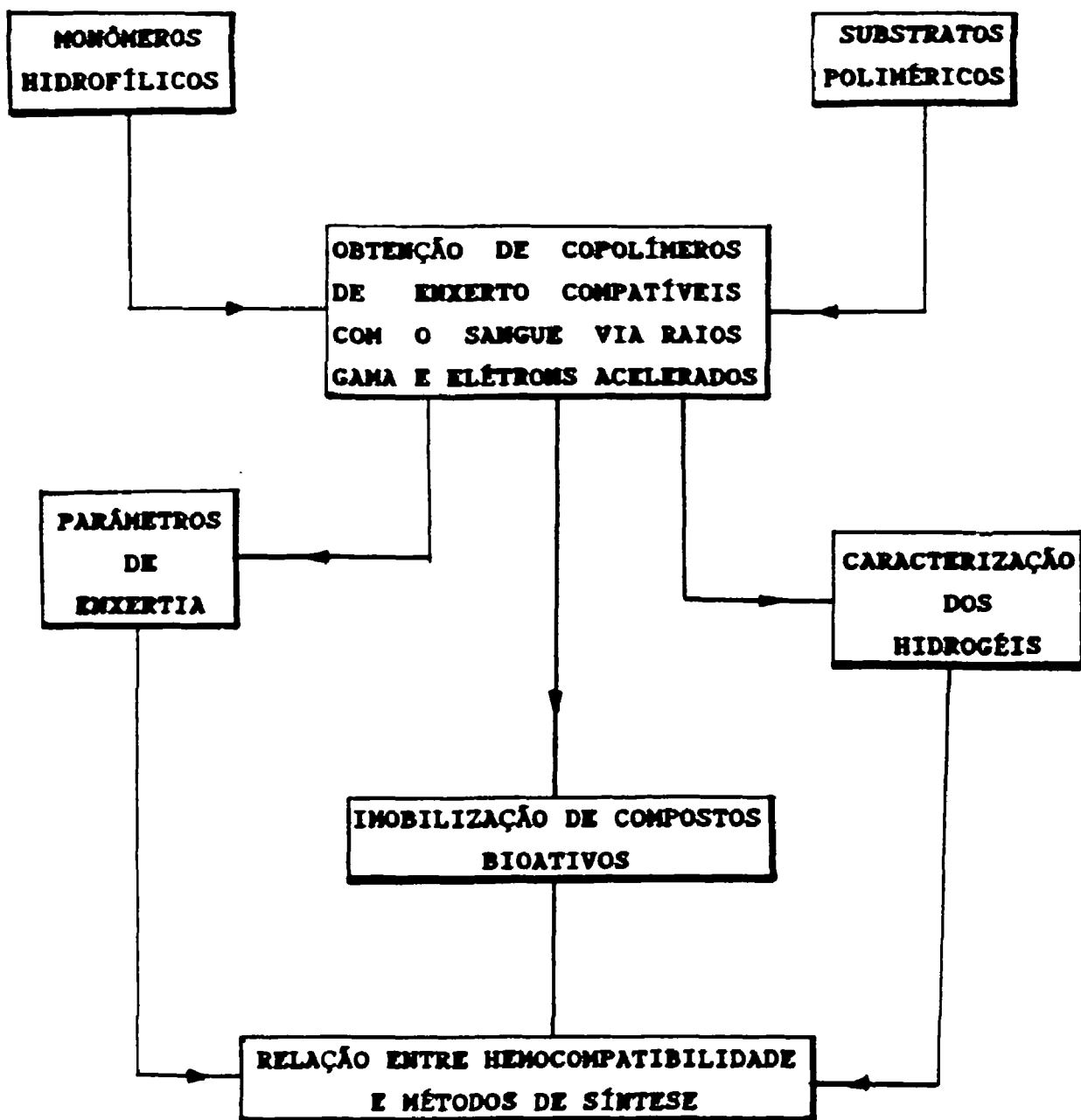


Fig. 1- Diagrama simplificado do estudo da síntese de copolímeros de enxerto via raios gama e elétrons acelerados.

2- ASPECTOS GERAIS

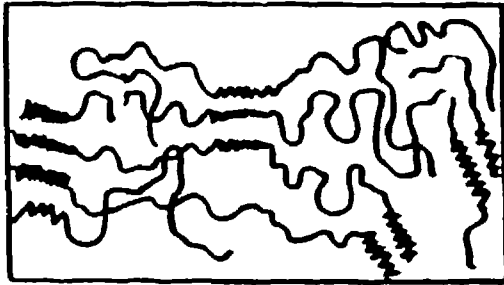
2.1- POLIMERIZAÇÃO

2.1.1- Hidrogéis

Hidrogéis são materiais hidrofílicos que intumescem em água e representam a primeira classe de materiais que foram projetados e desenvolvidos com o intuito de aplicação médica. Possuem as seguintes características em comum⁵ :

- a) Consistem de cadeias poliméricas que são reticuladas covalente ou eletrostaticamente;
- b) São insolúveis em água a temperatura, pH e força iônica fisiológicos;
- c) Intumescem até um valor de equilíbrio de 10 a 98% nas condições fisiológicas.

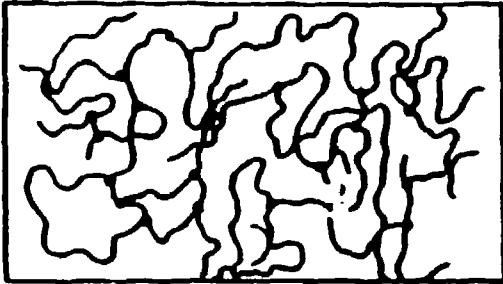
Sistemas de hidrogéis preparados por diferentes métodos⁵ são representados na Figura 2. Filmes vazados, frequentemente usados como revestimento para outros materiais, normalmente requerem ligações hidrofóbicas para prevenir a dissolução do polímero em meio aquoso. Hidrogéis reticulados podem ser obtidos por moldagem por injeção de uma mistura do monômero, agente de reticulação e iniciador.



FILMES VAZADOS

~~~~ Segmentos hidrofílicos

~~~~ Segmentos hidrofóbicos

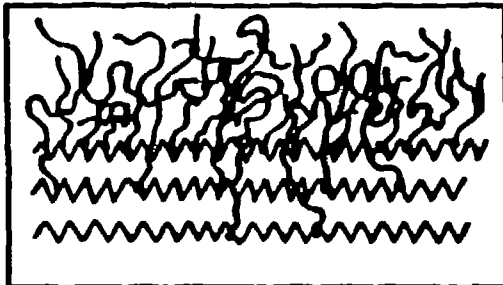


REDES DE LIGAÇÕES CRUZADAS

~~~~ Cadeias hidrofílicas

~ ~ ~ ~ Ligações cruzadas covalentes

~ ~ ~ ~ Ponto de ramificação



POLÍMERO DE SUPERFÍCIE ENXERTADA

~~~~ Cadeias hidrofílicas

~ ~ ~ ~ Ligações covalentes

~~~~ Substrato hidrofóbico

Fig. 2- Métodos de preparação de hidrogéis.



---

A enxertia de hidrogéis em uma matriz polimérica é uma técnica muito atrativa para a síntese de biomateriais poliméricos. Entre os motivos estão que o polímero hidrofílico se torna insolúvel pela ligação a um substrato rígido; a baixa força mecânica geral dos hidrogéis é melhorada pela ligação a um polímero mecanicamente mais forte e a fabricação é simplificada desde que somente o substrato necessita ter a forma específica desejada, seguindo então o enxerto o seu contorno<sup>5</sup>.

### 2.1.2- Polimerização induzida pela radiação

Estudos cinéticos de polimerização induzida pela radiação tem sido realizados nas últimas 5 décadas, para uma grande variedade de monômeros polimerizados em solução ou em fase gasosa, contribuindo para a elucidação de mecanismos reacionais<sup>26-27</sup>. Desses estudos foi comprovado que:

- a) A polimerização ocorre na maioria das vezes pelo mecanismo via radical livre;
- b) O mecanismo de polimerização sempre envolve uma terminação mútua de crescimento de cadeias;
- c) A velocidade de polimerização pode ser relacionada com a velocidade de produção de radicais no solvente;
- d) A velocidade de produção de radicais no solvente é relacionada com a química da radiação do solvente.

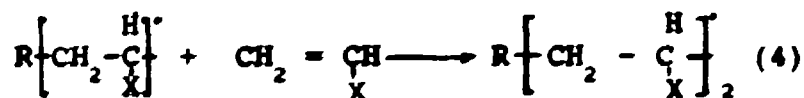
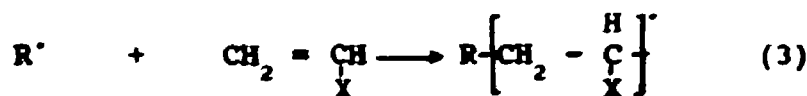
Os rendimentos da polimerização induzida pela radiação são elevados, podendo citar-se como vantagens<sup>15</sup>:

- a) O processo é limpo, ou seja, no final do processo não há a presença de resíduos, causados pela decomposição de iniciadores ou catalisadores químicos;

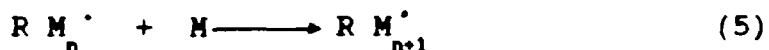
- b) Permite o uso de um grande intervalo de taxas de dose de irradiação e portanto, diferentes velocidades de iniciação;
- c) Existe muito pouco ou nenhum efeito da temperatura na iniciação;
- d) Não há perigo de descontrole reacional devido à exotermia da etapa de propagação;
- e) Há a possibilidade de iniciação no estado sólido.

Estas características permitem a obtenção de polímeros de alta pureza, podendo ser utilizados para a fabricação de membranas hidrofílicas, artigos ópticos e outros polímeros de aplicações na medicina e biotecnologia<sup>28-29</sup>.

A investigação sistemática da polimerização induzida pela radiação foi feita por Daiton<sup>30</sup>, sendo então demonstrado que o mecanismo seguido durante a reação de polimerização era via radical livre. Neste processo, os radicais gerados no meio pela radiólise do monômero M (reação 1) e eventualmente o solvente S (reação 2) adicionam-se à dupla ligação do monômero iniciando o crescimento das cadeias poliméricas (reação 3)<sup>31</sup>:



ou



Os radicais primários  $R^{\cdot}$  podem combinar-se com o monômero (reação 3), entre si ou com a cadeia em crescimento  $R M_n^{\cdot}$  (obtendo-se um polímero  $P_n$ ):



Geralmente as reações (3), (6) e (7) são competitivas e as regras de competição se aplicam ao sistema. Se a concentração do monômero for muito alta e a taxa de dose baixa, as reações (6) e (7) tornam-se desprezíveis reagindo todos os radicais livres com o monômero na reação<sup>31</sup>.

### 2.1.3- Copolimerização por enxertia induzida pela radiação

Para muitas aplicações as propriedades da superfície de um polímero são de igual ou maior importância que as propriedades do interior da matriz polimérica (bulk). No caso da interação com líquidos, propriedades como molhabilidade, adesão e sorção das superfícies poliméricas possibilitam a aplicação dos materiais poliméricos na medicina e biotecnologia<sup>31</sup>.

Superfícies poliméricas podem ser modificadas física, química ou biologicamente. As modificações físicas e químicas são feitas pela simples deposição física de outros componentes como surfactantes e polímeros ou, pela modificação química direta com a introdução de grupos funcionais específicos, como  $-SO_3$ ,  $C=O$ ,  $-COOH$ , etc<sup>33</sup>.

As fontes de energia, mais comumente utilizadas para modificação química, são radiações ionizantes, provenientes de irradiador gama ( $^{60}Co$ ), acelerador de elétrons, reatores de descarga de plasma e processos fotoquímicos (UV e  $O_3$ )<sup>34-35</sup>.

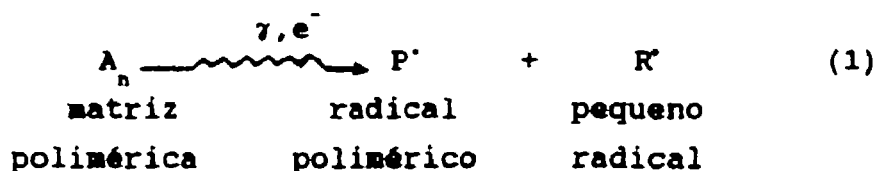
A técnica de enxertia induzida pela radiação é um método alternativo de modificação de materiais poliméricos<sup>36</sup>. Pelo uso desta técnica, a modificação pode ser feita somente a nível de superfície, ou se desejado, também no interior da matriz polimérica. O produto polimérico obtido de um processo de enxertia é chamado de copolímero de enxerto.

Um copolímero de enxerto é composto de uma cadeia principal ao longo da qual existem novas cadeias poliméricas ligadas, chamadas cadeias enxertadas.

O mecanismo da copolimerização por enxertia é análogo ao da homopolimerização, sendo que as espécies iniciadoras são radicais poliméricos. A reação de enxertia pode ser dividida em três etapas principais: iniciação, propagação e terminação<sup>37</sup>.

## Iniciação

Nesta etapa a matriz polimérica ao ser exposta à radiação ionizante produz as espécies iniciadoras da reação:

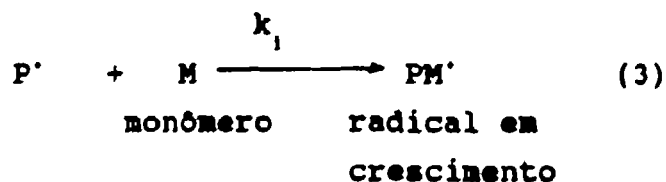


A velocidade de formação dos radicais P e R depende somente da intensidade da radiação (I),

$$\begin{array}{l} R \propto I \\ R = k \cdot I \end{array} \quad (2)$$

onde k é uma constante de velocidade.

O radical P' induz a reação de propagação:

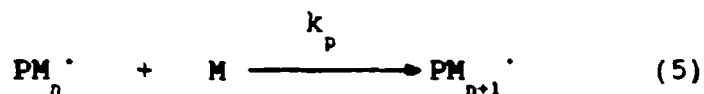


A velocidade de iniciação da reação de enxertia é,

$$R_1 = k_1 \cdot [P'] \cdot [M] \quad (4)$$

onde  $k_1$  é uma constante para a iniciação da reação de enxertia.

### Propagação

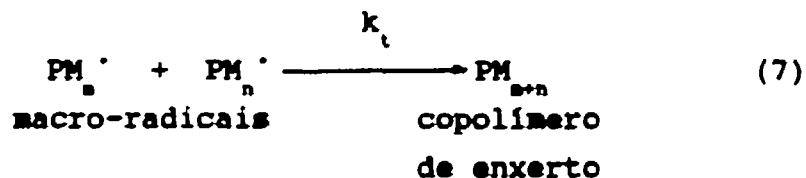


Neste caso, a velocidade de propagação ( $R_p$ ) depende somente da concentração de radicais livres e do monômero. Logo,

$$R_p = k_p \cdot [PM_n^\cdot] \cdot [M] \quad (6)$$

### Terminação

Se dois macro-radicaís se combinam então a reação é terminada e o copolímero de enxerto é formado :



A velocidade de terminação ( $R_t$ ) depende somente do quadrado da concentração de radicais,

$$R_t = 2k_t \cdot [PM_n^\cdot]^2 \quad (8)$$

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

Se for assumido que o comprimento da cadeia polimérica é longo, então a reação de iniciação pode ser desprezada em relação à reação de propagação, obtendo-se a seguinte equação para a velocidade de enxertia:

$$R_p = k_p \cdot [PM_n^\bullet] \cdot [M] \quad (9)$$

Introduzindo a hipótese do estado-estacionário, de que a velocidade de variação da concentração de radicais é pequena, quando comparada à sua velocidade de formação e desaparecimento, então tem-se que:

$$k_i [P^\bullet] \cdot [M] = 2k_t \cdot [PM_n^\bullet]^2 \quad (10)$$

ou,

$$R_i = 2k_t \cdot [PM_n^\bullet]^2 \quad (11)$$

portanto,

$$[PM_n^\bullet] = [R_i / 2k_t]^{1/2} \quad (12)$$

substituindo em (9), encontramos a seguinte equação:

$$R_p = k_p \cdot [M] \cdot [R_i / 2k_t]^{1/2} \quad (13)$$

Embora não seja rigorosamente correto assumir a hipótese do estado estacionário de radicais livres capazes de iniciar a reação de copolimerização, Restaino e Reed<sup>30</sup> tem mostrado que esta hipótese é amplamente justificada para a enxertia do acetato de vinila sobre o poli(tetrafluoro-etileno). Os autores ressaltam no entanto, que a hipótese do estado estacionário aplica-se apenas aos radicais formados na superfície da matriz polimérica e não àqueles criados dentro do filme.

#### 2.1.4- Métodos de enxertia por radiação

Existem basicamente três diferentes métodos para preparar um copolímero de enxerto através da radiação ionizante: irradiação simultânea, pré-irradiação e peroxidação<sup>39</sup>.

O método da irradiação simultânea é também chamado de enxertia mútua (ou direta). Neste método de enxertia, o polímero a ser modificado é irradiado diretamente na presença do monômero, podendo este estar em fase condensada ou gasosa. A irradiação é usualmente realizada na ausência de ar.

O método da pré-irradiação envolve a irradiação da matriz polimérica que é depois colocada em contato com o monômero na fase líquida ou gasosa. A enxertia ocorre pela reação do monômero com os radicais capturados na matriz. Esta técnica é quase totalmente inibida pelo oxigênio, exigindo procedimentos de deaeração.

O método da peroxidação consiste na irradiação de uma matriz polimérica em presença de ar, levando à obtenção de peróxidos e hidroperóxidos. Esses grupos peróxidos são razoavelmente estáveis e o polímero pode ser estocado a baixas temperaturas sem perda de atividade. Se aquecidos subsequentemente na presença de monômeros vinílicos e ausência de ar, os grupos peróxidos decompõem-se liberando radicais livres que podem iniciar o processo de enxertia.

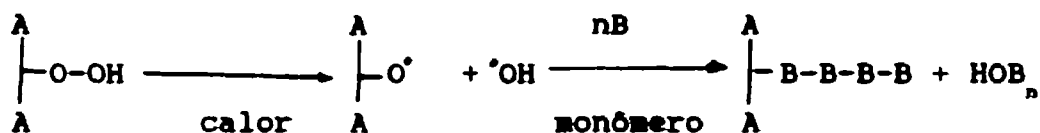


A sequência reacional pode ser representada como segue:

a) Formação de hidroperóxido ou de peróxido



b) Formação de um copolímero de enxerto



Este processo pode ser conduzido sob condições onde uma alta eficiência na enxertia pode ser atingida, sendo que a dose e a taxa de dose de irradiação são fatores importantes.

No método da enxertia simultânea, a dose total determina o comprimento da ramificação enxertada. O peso molecular da cadeia enxertada é também controlado por outros fatores como a presença de agentes transferidores de cadeia, concentração do monômero, temperatura reacional e viscosidade do meio. A difusão do monômero dentro da matriz polimérica desempenha um papel importante no método da enxertia simultânea, já que é por este meio que o monômero atinge os sítios ativos dentro da matriz polimérica<sup>40</sup>.

Teoricamente qualquer substrato polimérico pode ser enxertado pela radiação. Contudo a eficiência no processo de enxerto depende da natureza da matriz polimérica bem como do monômero utilizado, ou seja um dado monômero em particular pode enxertar bem sobre uma dada matriz polimérica podendo no entanto, não enxertar bem sobre outros polímeros<sup>41</sup>.

A eficiência da enxertia induzida pela radiação depende do rendimento de radicais livres (G) da matriz polimérica e do monômero utilizado. O valor G é definido como o número de radicais livres formados por 100 eV de energia absorvida por grama de material.

No método da enxertia simultânea particularmente, somente os casos onde o valor G da matriz é alto e o do monômero é baixo, podem possibilitar uma enxertia efetiva<sup>42</sup>.

## 2.2- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

### 2.2.1- Hidrofilicidade

#### 2.2.1.1- Ângulo de contato

Informações de superfícies sólidas a nível de poucos angstroms são muito difíceis de serem obtidas. Um dos métodos mais sensíveis para a obtenção de informações de superfícies é a medida do ângulo de contato<sup>43</sup>. Este ângulo pode ser formado, quando a gota de um líquido é colocada sobre uma superfície sólida. O líquido pode espalhar-se inteiramente sobre a superfície, ou permanecer, caso não molhe a superfície do sólido, na forma de uma gota.

O fundamento da técnica do ângulo de contato é o equilíbrio de três fases que ocorre no ponto de contato na interface sólido-líquido-vapor, sendo este equilíbrio considerado em termos de superfície e tensões superficiais na interface.

O balanço de energia para o equilíbrio do sistema sólido-líquido-vapor na interface entre um sólido rígido não deformável e um líquido e seu vapor é dado por<sup>43</sup> :

$$(dF)_{T,V,n} = \gamma_{SV} \cdot dx - \gamma_{SL} \cdot dx - \gamma_{LV} \cdot dx \cdot \cos \theta \quad (1)$$

onde F é a energia livre de Helmholtz, de um pequeno deslocamento do líquido,  $\gamma$  a energia livre interfacial do líquido para as interfaces sólido-vapor ( $\gamma_{SV}$ ), sólido-líquido ( $\gamma_{SL}$ ) e líquido-vapor ( $\gamma_{LV}$ ), T a temperatura termodinâmica do sistema, V o volume, n o número de moles e  $\theta$  é o ângulo de contato.

No equilíbrio  $dF = 0$ , logo:

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

que é a equação de Young<sup>43</sup> .

As variações da energia livre de superfície para os processos de adesão ( $\omega_a$ ), imersão ( $\omega_i$ ) e espalhamento ( $\omega_s$ ) são<sup>44</sup> :

$$\omega_a = -\gamma_{LV} \cdot (\cos \theta + 1) \quad (3)$$

$$\omega_i = -\gamma_{LV} \cdot \cos \theta \quad (4)$$

$$\omega_s = -\gamma_{LV} \cdot (\cos \theta - 1) \quad (5)$$

Sendo  $\gamma_{LV}$  a tensão interfacial líquido-vapor e  $\theta$  o ângulo de contato, a condição para a molhabilidade ocorrer é que  $\omega < 0$ . Como  $\gamma_{LV}$  é sempre positivo, o processo de molhabilidade é determinado pelo  $\cos \theta$ , o que justifica a utilidade do ângulo de contato na medida da molhabilidade de uma dada superfície.

### 2.2.1.2- Conteúdo de água

O processo de sorção de água pelos biomateriais poliméricos é um importante fator na correlação entre a trombogenicidade e as propriedades de superfície. A água adsorvida poderia exercer um efeito "plastificante" na superfície do biomaterial aumentando os processos de transições e relaxações moleculares<sup>22</sup>.

Quando um polímero é colocado em meio aquoso as interações fortemente positivas entre a estrutura química da macromolécula e a água (por exemplo, ligações de hidrogênio) favorecem o intumescimento. À medida que as moléculas de água penetram na matriz as cadeias poliméricas tornam-se mais estendidas causando uma expansão e conseqüente ordenamento da estrutura polimérica. Uma vez que este processo é desfavorecido entropicamente, passa a existir então uma força diretora no sentido oposto ao da força osmótica das moléculas de água em permearem o hidrogel. Quando a força osmótica de moléculas de água para dentro do sistema é balanceada pela força exercida pelas cadeias poliméricas em resistir ao processo de expansão diz-se que neste ponto o equilíbrio no intumescimento foi atingido.

Alguns dos fatores responsáveis pelo intumescimento dos hidrogéis em meio aquoso são a alta flexibilidade da cadeia da macromolécula, baixa densidade de ligações cruzadas, fortes interações com a água e a existência de um potencial osmótico<sup>22</sup>.

### 2.2.2- Estrutura dos polímeros utilizados no presente trabalho

Os polímeros podem ser preparados combinando-se dois ou mais monômeros diferentes no processo de polimerização. Se dois monômeros são utilizados o produto é chamado de copolímero e o segundo monômero é usualmente incluído na reação para modificar as propriedades do primeiro (homopolímero).

É possível controlar o caminho da reação de copolimerização existindo 4 configurações principais de interesse<sup>45</sup> :

- (1) Alternada : -A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-
- (2) Ao Acaso : A-A-B-A-A-A-B-B-A-A-A-A-
- (3) Bloco : -A-A-A-B-B-B-B-B-B-B-A-A-
- (4) Enxerto : -A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-  
                  |                  |  
                  B                  B  
                  |                  |  
                  B                  B  
                  |                  |  
                  B                  B

As interações intracadeias de polímeros tem um considerável efeito nas propriedades do material. Provavelmente o fator mais significativo é se o material é amorfo ou cristalino<sup>46</sup> .

A facilidade com que um polímero pode formar regiões cristalinas ou amorfas depende da estereoregularidade da cadeia molecular e da presença de grupos laterais volumosos. Assim uma molécula de polímero com um grande número de ramificações ou com a presença de grupos volumosos na cadeia dificilmente formará uma estrutura ordenada. Desta forma as estruturas sindiotáticas e isotáticas tem suficiente simetria para haver a cristalização<sup>47</sup> .

A Tabela 1 mostra a estrutura molecular dos polímeros utilizados neste trabalho, bem como, os principais radicais criados pela interação com radiação de alta energia.

Tab. 1- Estrutura molecular e principais radicais formados pela radiação ionizante (em ausência de ar) nos polímeros utilizados no presente trabalho.

| NOME E ESTRUTURA QUÍMICA                                                        | RADICAIS PRODUZIDOS                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Poli(tetrafluoro-etileno) (PTFE)<br>$-(CF_2 - CF_2)-$                           | $-(CF_2 - \dot{C}F)-^{48}$                                                      |
| Poli(etileno-co-tetrafluoro-etileno) (PETFE)<br>$-(CF_2 - CF_2 - CH_2 - CH_2)-$ | $-(CF_2 - \dot{C}F - CH_2 - CH_2)-^{49}$<br>$-(CF_2 - CF_2 - \dot{C}H - CH_2)-$ |
| Poli(cloreto de vinila) (PVC)<br>$-(CH_2 - CHCl)-$                              | $-(CH_2 - \dot{C}H)-^{50}$                                                      |
| Polietileno(PEBD)<br>$-(CH_2 - CH_2)-$                                          | $-(CH_2 - \dot{C}H)-^{50}$                                                      |

### 2.2.3- Métodos Espectroscópicos

#### 2.2.3.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR-NIR)

Átomos covalentemente ligados formando uma molécula não permanecem fixos um em relação ao outro mas vibram ao redor de uma distância interatômica média. A energia absorvida, resultante da interação de um polímero com radiação eletromagnética de determinada energia, pode ser convertida em movimentos vibracionais e rotacionais, o que leva a variações nas distâncias interatômicas e nos ângulos das moléculas. A energia absorvida, associada com as vibrações de uma molécula ligada covalentemente, é descrita pela mecânica quântica em termos de níveis de energia vibracionais discretos, sendo os diferentes níveis de energia vibracional dados por<sup>51</sup> :

$$E = (n+1/2).h\nu \quad (1)$$

Os comprimentos de onda de radiação ( $\lambda = c/\nu$ ) capazes de excitar uma molécula de um nível vibracional a outro incluem a região do infravermelho. As vibrações moleculares podem causar uma variação no momento de dipolo, se a absorção da radiação eletromagnética dentro da região do infravermelho está para ocorrer. Esta condição é conhecida como regra da seleção. A banda IR resultante é uma banda vibracional fundamental com uma intensidade proporcional ao quadrado da variação no momento de dipolo<sup>51</sup> .



Na espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR), utiliza-se um interferômetro para coletar os dados, ao invés do monocromador usado nos espectrômetros dispersivos convencionais. As vantagens do espectrômetro FTIR sobre os convencionais são uma melhora na razão sinal/ruído por unidade de tempo, um maior ganho de energia, maior velocidade e precisão no espectro obtido. A desvantagem é a necessidade de um computador para a análise do interferograma obtido.

Quando a luz propaga-se de um meio para outro, sendo o índice de refração do primeiro maior que o segundo, gera-se o fenômeno de reflexão interna.

O desenvolvimento da espectroscopia de reflexão interna com o uso de múltiplas reflexões (MIR) para o estudo de filmes finos foi feito por Harrick<sup>52-53</sup>. Nesta técnica empregam-se múltiplas reflexões para amplificar as absorções fracas. Assim, a luz infravermelha entra no prisma num ângulo de incidência apropriado e é refletida nas superfícies internas do prisma gerando um espectro de profundidade aproximada  $1 \mu\text{m}^{54}$ , de alguma espécie absorvedora de infravermelho em contato com a superfície polimérica.

A espectroscopia FTIR-MIR pode ser utilizada na determinação da distribuição de cadeias poliméricas enxertadas em uma dada matriz polimérica.

### 2.2.3.2- Espectroscopia Eletrônica para Análise Química (ESCA)

Esta técnica também chamada de espectroscopia fotoeletrônica (XPS) é considerada como uma importante técnica para a caracterização e análise da superfície de biomateriais poliméricos.

O princípio básico da técnica é o efeito fotoelétrico, um fóton transfere sua energia ( $h\nu$ ) para um elétron orbital expelindo-o do átomo com uma energia cinética dada por<sup>55</sup> :

$$E_i = h\nu - E_k \quad (2)$$

onde  $E_i$  é a energia de ligação do elétron,  $E_k$  sua energia cinética e  $h\nu$  a energia do fóton ( $h$  é a constante de Planck e  $\nu$  a frequência da radiação incidente. Todas as energias são medidas em elétron-volts (eV). A medida da energia cinética permite o cálculo da energia de ligação. Conhecendo-se a energia de ligação torna-se possível identificar-se o átomo. Os fótons utilizados são raios X monocromáticos, usualmente magnésio ou alumínio  $K_{\alpha}$ .

Esta técnica é utilizada para obter-se informações a nível de  $10^{-60}$  Å<sup>56</sup>, sendo uma ferramenta potente na determinação da composição química da superfície de biomateriais.

#### 2.2.4- Análise térmica

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica fundamental para a caracterização térmica de materiais poliméricos, cujo fundamento é a medida das diferenças de energia absorvida ou cedida por uma amostra, em relação a um material de referência, quando se submete o sistema a um programa controlado de temperatura. Praticamente todos os processos físico-químicos implicam em variações na entalpia ou capacidade calorífica do sistema, sendo a aplicação da DSC a sistemas condensados praticamente universal. Além do mais, esta técnica é quantitativa e as variações de entalpia podem relacionar-se diretamente com o processo que se está estudando.

Na transição vítrea,  $T_g$ , a temperatura com que se produz o congelamento dos movimentos moleculares, manifesta-se no DSC por um salto de capacidade calorífica similar a uma transição de segunda ordem. Dado que o fenômeno de transição vítrea, tal como se observa normalmente, não é um fenômeno de equilíbrio, a definição de transição de segunda ordem, baseada no equilíbrio termodinâmico a rigor, não poderia aplicar-se à transição vítrea. O tratamento da  $T_g$  como uma transição de segunda ordem, no entanto, simplifica muito determinadas considerações.

Entre os diferentes fatores que podem exercer uma influência diretamente na  $T_g$  de um polímero destacam-se o efeito da estrutura química e a flexibilidade da cadeia, o peso molecular, os plastificantes, a presença de ligações cruzadas e a copolimerização<sup>57</sup>.

O DSC pode ser utilizado para acompanhar-se a variação do percentual de cristalinidade de uma matriz polimérica no processo de enxertia.

### 2.2.5- Análise topográfica por MEV

A copolimerização por enxertia radioinduzida pode levar a modificações significativas na estrutura do material polimérico. Estas modificações compreendem uma mudança na textura e morfologia intrínseca da superfície, como rugosidade ou distribuição de fases no polímero<sup>58</sup>.

A enxertia de monômeros vinílicos nas superfícies dos materiais poliméricos pode levar a uma alteração na textura do material, podendo influenciar nas propriedades hemocompatíveis<sup>58</sup>.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode ser utilizada no estudo da topografia de copolímeros de enxerto e também na visualização da interação destes materiais com o sangue.

### 2.3- AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE

Para poder interpretar as propriedades hemocompatíveis que apresentam alguns materiais poliméricos, assim como projetar novos materiais com maior antitrombogenicidade, torna-se necessário o conhecimento prévio dos mecanismos pelos quais se produz a coagulação do sangue.

### 2.3.1- Composição do sangue

O sangue é um fluido heterogêneo, não Newtoniano, composto de elementos celulares como as células vermelhas, células brancas e as plaquetas, que estão suspensas no plasma<sup>59</sup>. A célula vermelha (eritrócito) é um disco bicôncavo, tendo um diâmetro aproximado ("in vivo") de cerca de 8 $\mu$ .

As plaquetas ou trombócitos possuem aproximadamente 2 $\mu$  de diâmetro e constituem cerca de 300.000  $\text{mm}^3$  do sangue circulante total em humanos. As plaquetas contém ADP, serotonina, histamina, glicogênio e outros materiais, podendo ativar a tromboplastina do tecido que está envolvida no mecanismo de coagulação sanguínea.

O plasma sanguíneo constitui aproximadamente 55% do sangue. Ele contém um grande número de íons inorgânicos e macromoléculas orgânicas, como as proteínas e as enzimas, em vários estados de ionização. O pH normal do plasma é 7,4 e neste ponto as proteínas do plasma estão na sua forma aniônica<sup>59</sup>.

Com respeito às proteínas do plasma, três famílias, imunoglobulinas, albumina e proteínas de coagulação são de interesse especial na formação de trombos. As proteínas de coagulação são uma série de enzimas e fatores de coagulação (Tabela 2), que atuam de uma forma sequencial na chamada cascata de coagulação.

Tabela 2- Fatores de coagulação do sangue<sup>59</sup> .

| Fator | Sinônimo comum                          |
|-------|-----------------------------------------|
| I     | Fibrinogênio                            |
| II    | Protrombina                             |
| III   | Tromboplastina                          |
| IV    | Ion Ca <sup>+2</sup>                    |
| V     | Pró-acelerina                           |
| VII   | Pró-convertina                          |
| VIII  | Fator anti-hemofílico                   |
| IX    | Componente da tromboplastina do plasma  |
| X     | Fator Stuart-Power                      |
| XI    | Antecedente da tromboplastina do plasma |
| XII   | Fator de Hageman                        |
| XIII  | Fator estabilizante da fibrina          |

### 2.3.2- Adsorção de proteínas

Quando o sangue é colocado em contato com um material polimérico, as propriedades de superfície, tais como água e íons adsorvidos, rugosidade, microdomínios, cristalinidade e a composição química da superfície (Figura 3) são fatores que podem influenciar as interações entre a superfície e o sistema biológico<sup>22</sup>.

Os fatores, que determinam a formação de uma interfase por deposição protéica sobre a superfície de um biomaterial, podem ser, termodinamicamente influenciados por variações entálpicas e entrópicas, que podem ser suficientes para proporcionar um balanço de energia livre negativo no processo de adsorção de proteínas na superfície dos biomateriais poliméricos<sup>60</sup>. A característica ambivalente polar/apolar das proteínas pode favorecer também seu acúmulo na superfície<sup>61</sup>.

O tipo de união, que se estabelece entre as proteínas e a superfície de um biomaterial, depende marcadamente da natureza desta superfície. O caráter hidrofílico dos biomateriais parece ser um dos fatores determinantes da adsorção protéica. Neste sentido, embora não se produza uma ligação covalente entre as proteínas e o material polimérico, as interações secundárias como pontes de hidrogênio ou forças do tipo van der Waals, podem ser suficientemente importantes para produzir uma ligação bastante estável.

Utilizando soluções aquosas das proteínas mais importantes do plasma sanguíneo (albumina,  $\gamma$ -globulina e fibrinogênio), tem-se demonstrado que o fibrinogênio é a proteína mais ativa nos processos de adsorção em numerosas superfícies de materiais poliméricos, embora a  $\gamma$ -globulina apresente também uma grande atividade<sup>62</sup>.

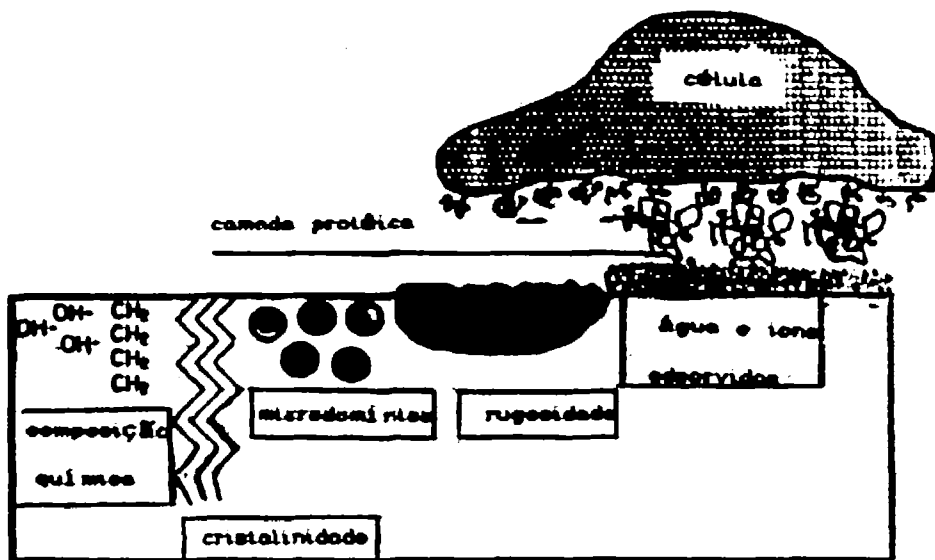


Fig. 3- Alguns dos fatores que podem influenciar nas interações entre o sistema biológico e as superfícies poliméricas.



### 2.3.3- Ativação de plaquetas

O fator VII de coagulação media a adesão de plaquetas sobre a superfície, sendo liberados alguns constituintes do agregado plaquetário dentro do plasma. Estas transformações estão sob o controle das prostaglandinas, íons  $Ca^{+2}$ , AMP e ADP. São fabricadas proteínas específicas e fosfolipídeos da membrana plaquetária, que são de primordial importância para a aceleração e o controle do processo de coagulação. A ativação das plaquetas também é iniciada por fatores como turbulências do fluxo sanguíneo, trombina e outros compostos enzimáticos<sup>63</sup>.

As plaquetas aderidas num material sintético trombogênico podem ser ativadas levando ao início de um conjunto de reações que conduzem à formação de trombos.

### 2.3.4- Cascata de coagulação

Quando superfícies poliméricas são colocadas em contato com o sangue, a ativação da coagulação ocorre através da fase de contato chamada fator XII, ou fator de Hageman, o qual pode ser ativado e provocar o início do conjunto de reações que conduzem à transformação do fibrinogênio em fibrina e à formação de trombos. Este conjunto de reações denomina-se caminho intrínseco na cascata de coagulação.

O caminho da cascata de coagulação, acionado quando o sangue entra em contato com superfícies naturais e estranhas ao sistema vascular, é chamado caminho extrínseco. Este mecanismo age para produzir coágulo no caso de lesão traumática no tecido do corpo. Na presença de tromboplastina do tecido (fator III) e íons  $Ca^{+2}$ , o fator VII é ativado e a atividade enzimática resultante causa a ativação dos fatores IX e X. Ocorre então a formação de trombina.

No entanto, qualquer que seja o caminho, a cascata de coagulação leva à formação de trombina, que desempenha várias funções. Primeiro a trombina induz à agregação plaquetária. Segundo, a trombina pode ativar o fibrinogênio em reação hidrolítica que leva a fibrinopeptídeos A e B e ao polímero solúvel fibrina. As ligações cruzadas da fibrina solúvel é catalisada pelo fator XIII ativado, formando o coágulo de fibrina insolúvel e outra vez a trombina é envolvida na ativação do fator XIII. Deve-se notar que agregados de plaquetas, outras células sanguíneas e proteínas plasmáticas são capturadas na malha (rede) de ligações cruzadas da fibrina<sup>63</sup>.

#### 2.4- IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os polímeros biofuncionais exibem funções biomédicas e bioquímicas como uma atividade farmacológica ou biocatalítica<sup>64</sup>.

Vários polímeros biofuncionais podem ser sintetizados utilizando técnicas de imobilização. Como é bem conhecido, existem numerosas técnicas de imobilização, propostas por diferentes pesquisadores<sup>9,65,66</sup>. Esses métodos de imobilização podem ser divididos em quatro tipos: ligação química, ligações químicas intermoleculares, aprisionamento físico (em uma matriz ou microcápsula) e adsorção.

O método da ligação química envolve uma reação química que cria uma ligação irreversível entre a molécula protéica e os grupos reativos do suporte. Como a reação química de formação da ligação covalente deve ser menos desnaturante possível para a macromolécula biológica, é necessário proceder a uma ativação prévia dos agrupamentos suscetíveis de entrar em reação. Por razões ligadas à dificuldade de manter intacta a atividade da biomolécula, geralmente, escolhe-se ativar o suporte polimérico.

Na imobilização por formação de ligações químicas intermoleculares ou aprisionamento físico, as biomoléculas ficam retidas na rede tridimensional de um polímero insolúvel na água ou aprisionadas no interior de micro-cápsulas delimitadas por uma membrana semi-permeável cujos poros são suficientemente pequenos para impedir a difusão da biomolécula, mas suficientemente grandes para permitir a passagem do substrato e dos produtos da reação (em se tratando de enzimas).

A imobilização por adsorção emprega um grande número de forças de interação de baixa energia entre o suporte e a proteína: interações de van der Waals, ligações de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas. O principal inconveniente desta técnica é que devido ao fato de as forças de interação envolvidas serem relativamente fracas, estas conduzem, no decorrer do tempo, a uma dessorção progressiva do biocomponente que é, então, liberado no meio de reação e levado com o efluente.

Dos métodos citados a ligação química e o aprisionamento físico são as técnicas mais comumente utilizadas<sup>67</sup>.

A síntese de polímeros biofuncionais pela radiação ionizante, para a imobilização de biocomponentes tem sido objeto de considerável interesse. Assim Hoffman<sup>68</sup>, Bedows<sup>69</sup> e outros pesquisadores desenvolveram a técnica da enxertia induzida pela radiação para a introdução de grupos funcionais de interesse em uma dada matriz polimérica para a imobilização de componentes biológicos através da ligação química.

Venkataraman e colaboradores<sup>70</sup> imobilizaram várias biomoléculas, como enzimas e heparina sobre copolímeros de enxerto pela ligação covalente com -OH, -COOH, -CH-CH-, -CHO e grupos -NH<sub>2</sub> na cadeia enxertada.

Garnett<sup>71</sup> tem reportado a imobilização de enzimas covalentemente ligadas com estireno ou nitroestireno enxertado sobre polietileno.

Bedows e colaboradores<sup>72-73</sup> estudaram a imobilização de enzimas utilizando vários copolímeros de enxerto tais como Nylon enxertado com poli(ácido acrílico), celulose enxertada com poli(acrilato de hidroxietila) e algodão enxertado com anidrido maleico.

### 3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1- POLIMERIZAÇÃO

##### 3.1.1- Intumescimento

Filmes comerciais de 4 x 4 cm de poli(tetrafluoro-etileno) (PTFE), poli(etileno-co-tetrafluoro-etileno) (PETFE), polietileno de baixa densidade (PEBD) e poli(cloreto de vinila) (PVC), de espessuras respectivamente 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ , foram lavados com detergente e em seguida enxaguados com água deionizada em um tanque ultrasônico por alguns minutos. Posteriormente foram lavados em acetona e secos sob vácuo a temperatura ambiente.

Para medidas do intumescimento, os polímeros foram imersos em vários solventes em tubos de vidro providos de tampa de tal forma a manter o líquido em equilíbrio com o seu vapor.

Os filmes foram pesados em intervalos de tempo regulares após extração do excesso de líquido das superfícies com o auxílio de um papel de filtro. As pesagens foram repetidas até a indicação de um peso constante. Todas as medidas foram feitas a 25 °C.

O percentual de intumescimento no equilíbrio (S) foi calculado por:

$$S(\%) = \frac{W - W_0}{W_0} \cdot 100 \quad (1)$$

onde W é o peso do polímero intumescido e  $W_0$  é o seu peso inicial.

### 3.1.2- Irradiação com Raios Gama

Para a copolimerização foram utilizados os monômeros N,N-dimetilacrilamida (DMAA), fornecido pela Wako Pure Chemical Industries Ltda e o ácido acrílico (AA) pela Dow Chemical Co sem extração do inibidor de homopolimerização. Os demais reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

Para o processo de enxertia com raios gama, foi adotado o processo de irradiação simultânea (direto). Assim, os filmes com o monômero e o solvente foram colocados em uma ampola de vidro pyrex provida de uma válvula removível (Figura 4). A ampola conectada a uma linha de alto vácuo foi degaseificada pela técnica do congelamento e descongelamento com nitrogênio líquido até atingir-se um vácuo da ordem de  $10^{-4}$  mmHg, procedendo-se em seguida à irradiação em uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  do tipo panorâmica.

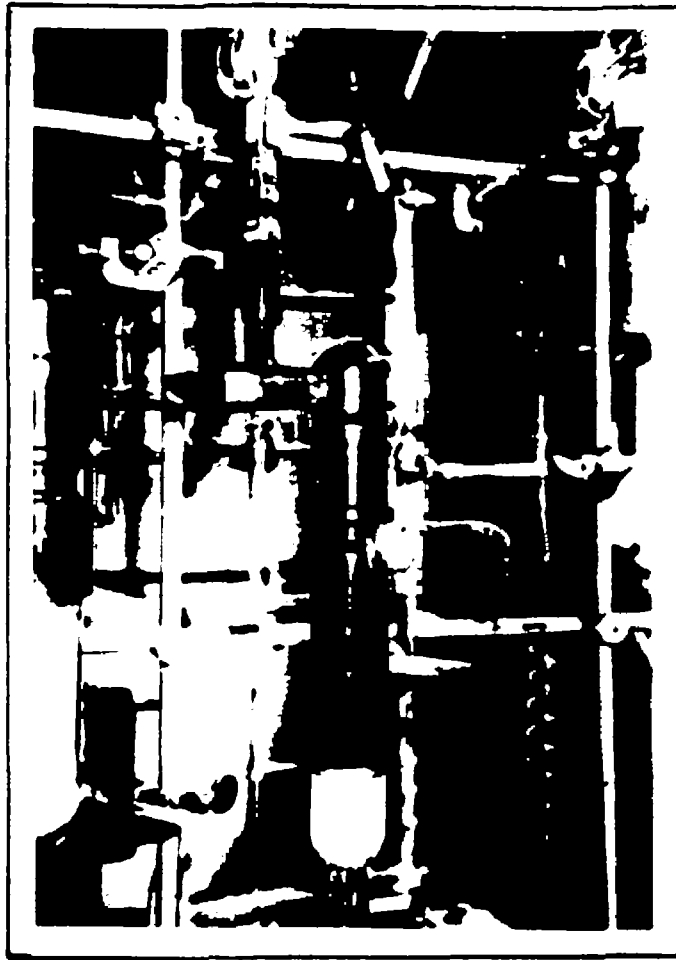


Fig. 4- Fotografia mostrando a ampola de vidro pyrex com válvula removível conectada a uma linha de alto vácuo para degaseificação.



Após a irradiação, os filmes foram lavados e mantidos imersos em água destilada por 24 horas. Para extração do homopolímero e do monômero residuais, os filmes foram levados a refluxo com água destilada por 24 horas em um extrator soxhlet. Os produtos foram secos sob vácuo até peso constante à temperatura ambiente (25 °C). O percentual de enxertia (G) foi calculado por:

$$G (\%) = \frac{p - p_0}{p_0} \cdot 100 \quad (2)$$

onde  $p_0$  representa o peso inicial do filme e  $p$ , o peso do filme após o processo de enxertia.

### 3.1.3- Irradiação com Elétrons Acelerados

Para o processo de enxertia, os filmes poliméricos foram pré-irradiados em presença de ar, à temperatura ambiente, com elétrons de 0,500 MeV provenientes de um acelerador linear (Dynamitron de 1,5 MeV e 25 mA) em intervalos de taxas de dose de irradiação de 7-100 kGy.s<sup>-1</sup> e doses de irradiação de 20-400 kGy.

Após a irradiação, os filmes foram imersos em uma solução de DMAA/solvente ou AA/solvente em uma ampola de vidro pyrex, deaerando-se com nitrogênio por 5 minutos a uma vazão de 16 ml/min. Em seguida, o sistema foi levado a um banho termostatizado a 50 °C e 80°C em vários intervalos de tempo. Refluxou-se os filmes com água destilada para extração do homopolímero poli(N,N-dimetilacrilamida) (PDMAA) e solução metanol/água 1:1 para extração do homopolímero poli(ácido acrílico) (PAA). Os produtos foram secos sob vácuo até peso constante à temperatura ambiente (25 °C). O percentual de enxertia foi calculado gravimetricamente, conforme a equação (2).

### 3.2- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

#### 3.2.1- Conteúdo de Água no Hidrogel

Os copolímeros de enxerto foram imersos em água destilada a 25 °C e solução salina a 37°C por um período suficiente para formar hidrogéis em equilíbrio com a água. O conteúdo de água (H) no hidrogel em equilíbrio foi determinado por:

$$H(\%) = \frac{H_w - H_d}{H_w} \cdot 100 \quad (3)$$

onde  $H_w$  é o peso do hidrogel no estado intumescido e  $H_d$  é o peso do material seco.

### 3.2.2- Ângulo de Contato

A molhabilidade dos filmes foi determinada por medidas do ângulo de contato utilizando a técnica da projeção horizontal de uma microgota de água na superfície polimérica (Figura 5).

Os filmes poliméricos modificados pelo processo de enxertia e os não modificados foram condicionados a uma umidade relativa de 80-90% sendo em seguida fixados no suporte do equipamento para medida do ângulo de contato. Uma gota de água bidestilada e deionizada foi colocada sobre a superfície com a ajuda de uma micropipeta.

### 3.2.3- Espectroscopia no Infravermelho

As cadeias de poli(N,N-dimetilacrilamida) (PDMAA) bem como as do poli(ácido acrílico) (PAA) enxertadas nas matrizes poliméricas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) utilizando um espectrofotômetro Perkin-Elmer 1730. Foi usado um acessório de múltipla reflexão interna (MIR) com cristal de KRS 5 (TaI/TaBr) e ângulo de incidência de 45°.

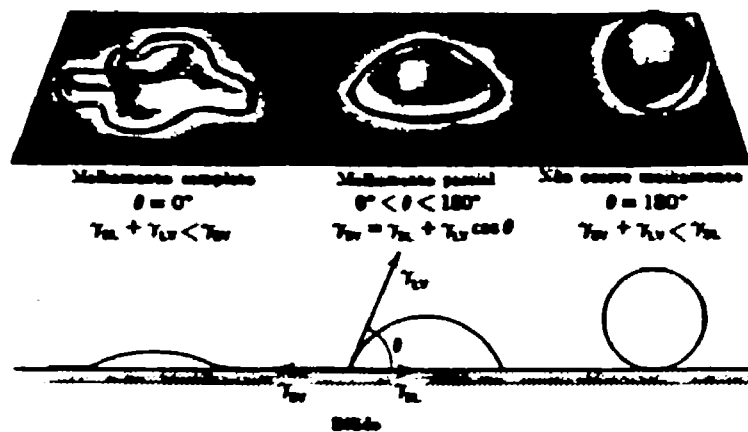


Fig. 5- Molhabilidade de uma superfície pela água e medida do ângulo de contato.

### 3.2.4- Espectroscopia Eletrônica para Análise Química (ESCA)

As medidas foram feitas em espectrômetro ESCA-36 da McPherson Co. A excitação usada foi  $AlK_{\alpha}$ . A pressão na câmara de análise permaneceu em torno de  $8.10^{-7}$  Torr.

### 3.2.5- Análise Térmica

A análise térmica dos polímeros foi feita por calorimetria exploratória diferencial (DSC), utilizando-se amostras sob forma de filme. Estas foram aquecidas a  $10^{\circ}C/min$ . a partir da temperatura ambiente até  $180^{\circ}C$ , sob corrente de nitrogênio, mantida a 40 mmHg. Em seguida foram resfriadas rapidamente até  $30^{\circ}C$ . Atingido o equilíbrio térmico, as amostras foram submetidas a novo aquecimento nas mesmas condições e novamente resfriadas até  $30^{\circ}C$ . Uma última corrida foi então efetuada, até a temperatura de  $180^{\circ}C$ , e registrada.

A determinação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), a partir das curvas DSC obtidas foi realizada através de procedimentos descritos na literatura. A linha base foi prolongada antes e depois da transição (retas 1 e 2) e foram marcados os pontos correspondentes aos desvios da mesma (pontos 3 e 4) (Figura 6). O ponto médio do segmento de reta compreendido entre estes pontos corresponde à transição vítrea do material.

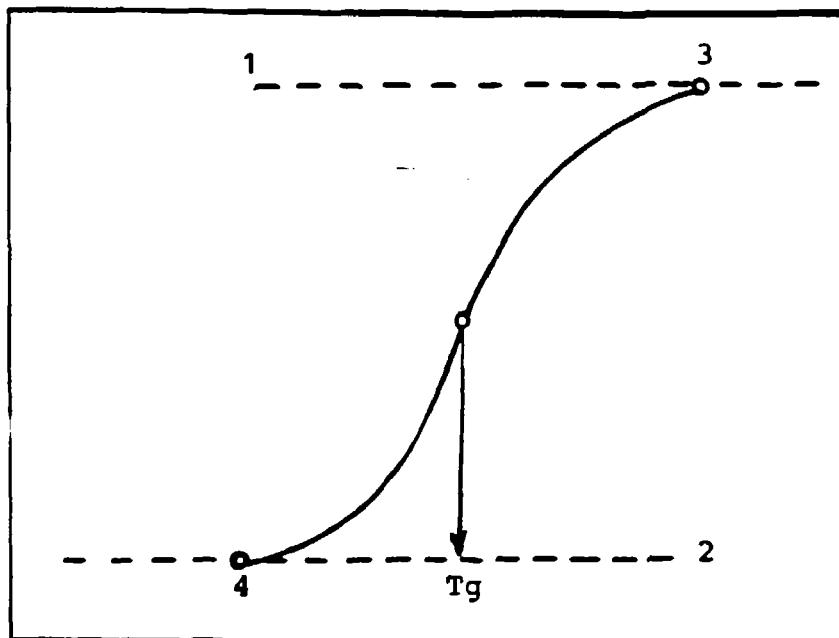


Fig. 6- Método da determinação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) por DSC.

### 3.2.6- Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras circulares de 5 mm de diâmetro foram fixadas em um suporte metálico e após deposição de carbono foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips modelo XL30, com analisador de energia por raios X dispersivos (EDAX).

### 3.3- AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE

Após a determinação dos parâmetros de enxertia e a caracterização físico-química das matrizes poliméricas, avaliou-se a hemocompatibilidade das superfícies enxertadas por testes *in vitro*.

Os ensaios propostos para a avaliação da hemocompatibilidade das superfícies enxertadas são o processo de sorção de proteínas séricas<sup>74-75</sup>, adesão plaquetária<sup>76</sup> e a cinética de formação de trombos<sup>77</sup>.

### 3.3.1- Marcação de proteínas com $^{125}$ I

Albumina de soro bovino (BSA),  $\gamma$ -globulina e fibrinogênio foram marcadas com  $^{125}$  I segundo o método de Hunter-Greenwood modificado por Biscayart<sup>78-79</sup>. Empregou-se 0,5-0,7 mCi (18,5-25,9 MBq) de radioisótopo, 5  $\mu$ g de proteína em 30  $\mu$ l de tampão fosfato (PBS) 0,05 M, pH 7,4. A reação procedeu-se à temperatura ambiente por 5 minutos, adicionando-se então 5  $\mu$ g de metabissulfito de sódio em 5  $\mu$ l do mesmo tampão fosfato 0,05 M. A purificação da proteína marcada foi feita por filtração em gel Sephadex G-100 para o BSA e G-250 para o fibrinogênio e a  $\gamma$ -Globulina segundo trabalho de Bartolini<sup>80</sup> para um cálculo preciso dos coeficientes de distribuição dos picos radioativos ( $K_D$ ). O uso deste parâmetro (que está relacionado com o raio de Stokes) no processo de purificação pode comprovar a pureza e identidade do material.

### 3.3.2- Adsorção de proteínas

O estudo de adsorção das proteínas marcadas foi efetuada em celas cilíndricas de PTFE. Estas celas contendo amostras de 0,6 cm de diâmetro foram preenchidas com PBS (0,100 M de NaCl; 0,00866 M  $\text{KHPO}_4$ ; pH 7,35) para deslocamento do ar e equilibradas termicamente por 30 minutos. Posteriormente injetou-se nas celas, 4 ml de uma solução em PBS da proteína marcada (200.000 cpm/ml) de maneira a se desprezar virtualmente todo o PBS inicial da cela. Depois de uma incubação por um período de 2 horas a 37°C. Analisou-se o ensaio injetando-se 4 ml de PBS também equilibrado a 37°C. A Figura 7 mostra a cela montada para o ensaio de adsorção.



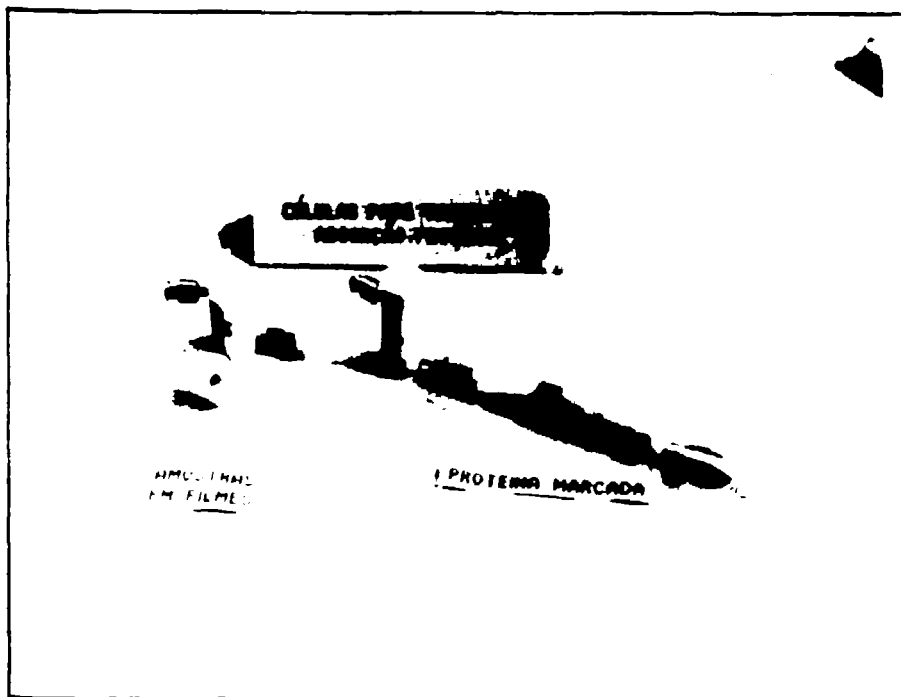


Fig. 7- Celas de PTFE utilizadas no ensaio de adsorção protéica.

A radioatividade adsorvida nos filmes foi avaliada em contador Beckman para a determinação da concentração das proteínas adsorvidas ( $\text{pg.cm}^{-2}$ ) em função do percentual de enxertia das amostras.

### 3.3.3- Contagem das Plaquetas Aderidas

Filmes circulares de 0,5 cm de diâmetro com vários percentuais de enxertia foram ensaiados em um único teste. As amostras foram aderidas em lamínulas de vidro com fita dupla face. As lamínulas contendo as amostras foram colocadas em uma placa de petri de 5 cm de diâmetro, que por sua vez foi colocada em uma outra placa maior com água. Os conjuntos placas de petri/amostras foram colocadas a 37°C em estufa por 15 minutos. Estes procedimentos tiveram a finalidade de manter a umidade e a temperatura adequadas ao teste.

Após os espécimes ficarem imersos no sangue por 3 minutos a 37°C, foi adicionada uma solução salina 0,2 M a cada placa. Em seguida, as amostras ficaram imersas em glutaraldeído a 2,5 % por 10 minutos, à temperatura ambiente e foram desidratadas com etanol a concentrações de 50%, 75% e 95%, por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente, e secos a vácuo.

Após a metalização, os filmes foram observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As plaquetas aderidas foram contadas a partir de fotografias tiradas de 5 regiões diferentes da superfície da mesma amostra.

Após o ensaio de adesão de plaquetas, as superfícies poliméricas foram molhadas com o corante alaranjado de acridina (10 µg/ml), cobertas com as lamínulas e observadas diretamente em um microscópio Zeiss axiomat plano apochromatic com excitação 470 nm, emissão 550 nm e filtro 09.

A formação de fibrina na superfície também foi registrada, sendo classificada em muito, pouca ou nenhuma presença de fibrina.

### 3.3.4- Formação de Trombos

Os copolímeros de enxerto obtidos foram estudados com relação à sua compatibilidade com sangue, utilizando-se o método cinético de formação de trombos proposto por Imai e Nose<sup>77</sup>.

Sangue humano fresco (4 ml) com anticoagulante foi preparado com 1 ml de solução de ACD (anticoagulante que impede a hemólise dos glóbulos vermelhos) e mantido refrigerado no decorrer do ensaio. Os filmes não modificados e modificados foram colocados em uma placa de petri tampada, contendo no interior um papel de filtro umedecido e, mantida em estufa a 37°C por 15 minutos. Após este tempo, 15 µl do sangue preparado com a solução de ACD foi colocado sobre toda a área do filme (4 cm<sup>2</sup>) e a reação de coagulação foi iniciada pela adição de 20 µl de CaCl<sub>2</sub> a 3,8%. A mistura do sangue e CaCl<sub>2</sub> foi feita no momento da adição deste com a própria micropipeta. Após um determinado intervalo de tempo, a reação foi interrompida com a adição de água destilada (5-10 mL). As superfícies testadas foram mantidas por 5 minutos em solução de formaldeído a 37% para a fixação dos trombos.

O sistema membrana polimérica/trombos foi seco sob vácuo à temperatura ambiente (27°C) até peso constante. A quantidade de trombos formado na superfície foi avaliada gravimetricamente pela equação:

$$\text{Trombos (\%) = } W_T/W_C \cdot 100 \quad (4)$$

onde  $W_C$  é o peso do trombos formados no vidro após 60 minutos (referência da coagulação total) e  $W_T$  representa o peso dos trombos formados nos filmes poliméricos após um certo tempo de reação.

### 3.3.5- Imobilização de Albumina

Filmes dos copolímeros de enxerto derivados do ácido acrílico PVC-g-AA e PEED-g-AA (4x4 cm) foram metilados, segundo o método de Fischer<sup>61</sup>. Hidrazidas foram formadas pela imersão dos ésteres metílicos em uma solução de hidrazina a 2% em atmosfera de  $N_{2(g)}$  por um período de 24 horas a 40 °C. Após, foi feita a lavagem dos filmes com água destilada (5 °C). As azidas foram formadas pela imersão dos filmes poliméricos em uma solução a 5 °C de  $NaNO_2$  0,5 M (1 mL) e HCl 4 M (35 mL). As soluções foram agitadas continuamente no tempo de reação de 15 minutos. Os filmes foram renovados, lavados com solução salina (NaCl 0,1 M) a 0 °C e protegidos da luz e ou aquecimento durante esta etapa para evitar o rearranjo da azida a isocianato<sup>62</sup>.

Os filmes assim ativados foram colocados em contato com uma solução de albumina (BSA) em tampão fosfato, PBS, pH 7,4 a uma concentração de 1,0 mg/mL a 0°C. O acoplamento da proteína nos filmes poliméricos foi seguido pelo método de Bradford<sup>83</sup>. Um esquema da enxertia dos filmes, da ativação química e do acoplamento da proteína nos copolímeros de enxerto é dado na Figura 8.

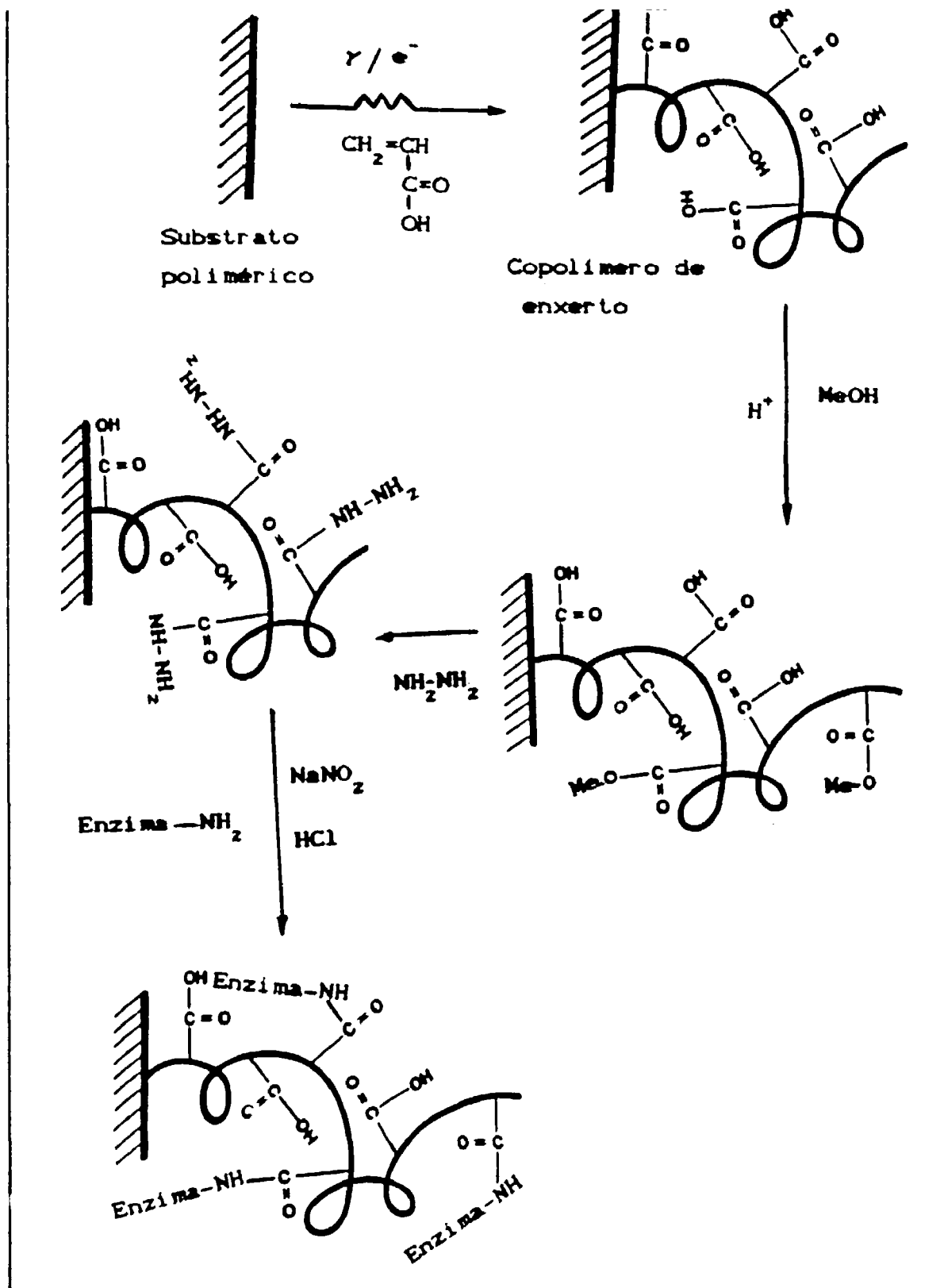


Fig. 8- Método de acoplamento da proteína nas superfícies poliméricas.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- PARÂMETROS DE ENXERTIA

É bem conhecido o enorme potencial de aplicação dos hidrogéis do ácido acrílico<sup>84</sup> e seus derivados como o poli(2-hidroxietilmetacrilato) (HEMA)<sup>85</sup>, poli(metacrilato de metila) (PMMA)<sup>86</sup>, poliacrilamida (PAA)<sup>87</sup> ou o poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PNVP)<sup>88</sup> na obtenção de superfícies compatíveis com os fluidos biológicos.

O presente trabalho estuda inicialmente a enxertabilidade do N,N-dimetilacrilamida (DMAA) e do ácido acrílico (AA) sobre o poli(tetrafluoro-etileno) (PTFE), poli(etileno-co-tetrafluoro-etileno) (PETFE), polietileno de baixa densidade (PEBD) e poli(cloreto de vinila) (PVC) induzida pela radiação ionizante.

Neste estudo foram determinados os efeitos de cada parâmetro no processo de enxertia.

#### 4.1.1- Efeito do solvente

O processo de enxertia é afetado pela difusão do monômero e do solvente dentro da matriz polimérica e para obter-se um alto nível de enxertia, o monômero deve reagir com o maior número possível dos radicais gerados no filme polimérico<sup>89</sup>.

A difusão foi estudada pelo grau de intumescimento dos filmes de PTFE, PETFE, PEBD e PVC em monômeros e solventes como mostra a Tabela 3. O solvente e monômero com alta capacidade de intumescimento dos filmes poliméricos foram interpretados como adequados para o processo de enxertia. Nesta interpretação, tal solvente é capaz de "levar" as moléculas do monômero o mais próximo possível dos radicais criados na matriz polimérica e por este meio induzir a reação de enxertia<sup>90</sup>.

Observa-se pelos dados da Tabela 3 que os substratos poliméricos apresentaram percentuais de intumescimento significativo nos solventes selecionados e nos monômeros DMAA e AA. Os outros monômeros vinílicos da tabela, colocados no teste para um estudo comparativo, mostraram intumescimentos bastante diversos, dependendo do substrato.

O efeito de solventes com o DMAA no processo de enxertia é mostrado na Tabela 4. A diferença no percentual de enxertia quando se utilizam diferentes solventes pode ser associada não somente às diferenças de suas capacidades de intumescimento da matriz polimérica, como também à miscibilidade do monômero nestes solventes. A formação de radicais no solvente e sua contribuição na ativação da matriz polimérica são importantes fatores no mecanismo de enxertia<sup>91</sup>.



Os níveis mais altos de enxertia indicaram o acetato de etila como o melhor solvente para a enxertia do DMAA sobre os filmes de PTFE, PETFE e PEBD. Uma razão adicional para a escolha do acetato de etila como diluente para o DMAA poderia ser a de que ambos os compostos, monômero e solvente, possuem similaridade de estrutura química, o que torna os efeitos de transferência de energia independentes da composição da solução<sup>92</sup>.

Com referência ao AA, o solvente utilizado foi o metanol devido à alta solubilidade do homopolímero formado neste solvente. As copolimerizações de AA em acetato de etila levaram à precipitação do poli(ácido acrílico) (PAA) formado e baixos percentuais de enxertia.

Tabela 3- Intumescimento no equilíbrio dos filmes poliméricos em solventes e monômeros.

| Solventes e Monômeros    | Intumescimento (%) |       |       |        |
|--------------------------|--------------------|-------|-------|--------|
|                          | PTFE               | PETFE | PEBD  | PVC    |
| Hexano                   | 0,46               | 0,64  | 7,26  | 9,56   |
| Tetracloroeto de carbono | 0,75               | 7,16  | 25,55 | 56,31  |
| Acetato de etila         | 0,78               | 4,16  | 2,25  | M°     |
| Benzeno                  | 0,00               | 2,37  | 9,51  | 71,70  |
| Acetona                  | 0,55               | 5,49  | 1,19  | 78,32  |
| Metanol                  | 0,09               | 0,00  | 1,24  | 18,43  |
| Água                     | 0,00               | 0,64  | 0,30  | 21,56  |
| DMAA                     | 0,67               | 7,13  | 1,20  | M°     |
| NVP                      | 0,50               | 3,57  | 0,45  | M°     |
| HEA                      | 0,13               | 2,29  | 0,00  | 25,00  |
| HPA                      | 0,60               | 0     | 0     | 70,00  |
| HEMA                     | 0,09               | 4,43  | 0,78  | 15,00  |
| AA                       | 3,31               | 3,14  | 0,82  | 150,00 |
| St                       | 0,34               | 6,06  | 10,70 | M°     |

M°: miscível.

Monômeros: DMAA: N,N-Dimetilacrilamida, NVP:  
 N-vinil-2-pirrolidona, HEA: Hidroxietilacrilato, HPA:  
 Hidroxipropilacrilato, HEMA: Hidroxietilmetacrilato, AA:  
 Ácido acrílico, St: Estireno.

Tabela 4- Efeito do solvente na enxertia do DMAA sobre os filmes de PTFE, PETFE e PEBD via raios gama ( $\gamma$ ) e elétrons acelerados ( $e^-$ ).

| Solvente                | Enxertia (%) |              |              |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                         | PTFE         | PETFE        | PEBD         |
|                         | $\gamma / e$ | $\gamma / e$ | $\gamma / e$ |
| Água                    | 0 / 0        | 0 / 0        | 0 / 0        |
| Metanol                 | 0,2 / 0      | 1 / 0,5      | 0 / 0        |
| Acetona                 | 7,8 / 0,2    | 16 / 52      | 200 / 0,3    |
| Acetato de etila        | 8,9 / 0,5    | 44 / 80      | 400 / 0,9    |
| Benzeno                 | 7,7 / 0      | 11 / 60      | 263 / 0,2    |
| Tetracloreto de Carbono | 0,9 / 0      | 1 / 0        | 4 / 0        |

Condições de enxertia:

Taxa de dose de irradiação:  $0,055 \text{ kGy.h}^{-1}$  ( $\gamma$ ) e  $20 \text{ kGy.s}^{-1}$  ( $e^-$ ); Dose de irradiação:  $0,44 \text{ kGy}$  ( $\gamma$ ) e,  $80 \text{ kGy}$  ( $e^-$ ); concentração do monômero: 35% v/v; temperatura de irradiação:  $25^\circ\text{C}$  e; copolimerização ( $e^-$ ): banho  $50^\circ\text{C}$ / 24 h / atmosfera inerte.

A Figura 9 mostra o efeito do solvente na obtenção dos copolímeros PEBD-g-AA e PVC-g-AA. Com base nestes resultados experimentais, a sequência dos solventes que levaram à obtenção dos maiores níveis de enxertia pode ser disposta na seguinte ordem:

Metanol > Dioxano > Água

Desta maneira parâmetros de enxertia do AA sobre o PEBD e PVC foram estudados, utilizando-se o metanol como solvente para o processo.

#### 4.1.2- Efeito do inibidor de homopolimerização

Os inibidores de homopolimerização como íons metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ), tem sido utilizados em casos onde monômeros, como o ácido acrílico (AA) e seus derivados, geram em altas conversões seus respectivos homopolímeros, causando portanto um desfavorecimento no processo de copolimerização por enxertia. O mecanismo de ação desses inibidores é explicado nos trabalhos de Huglin<sup>93</sup> e Gargan<sup>94</sup> que demonstraram que o cátion metálico desativa ambos os processos: a reação de homopolimerização e a formação do copolímero de enxerto.

Foi observado que íons cúpricos,  $\text{Cu}^{+2}$ , funcionam eficientemente como inibidores de homopolimerização do monômero AA, elevando o nível de enxertia deste nas membranas de PEBD e PVC (Figura 10).

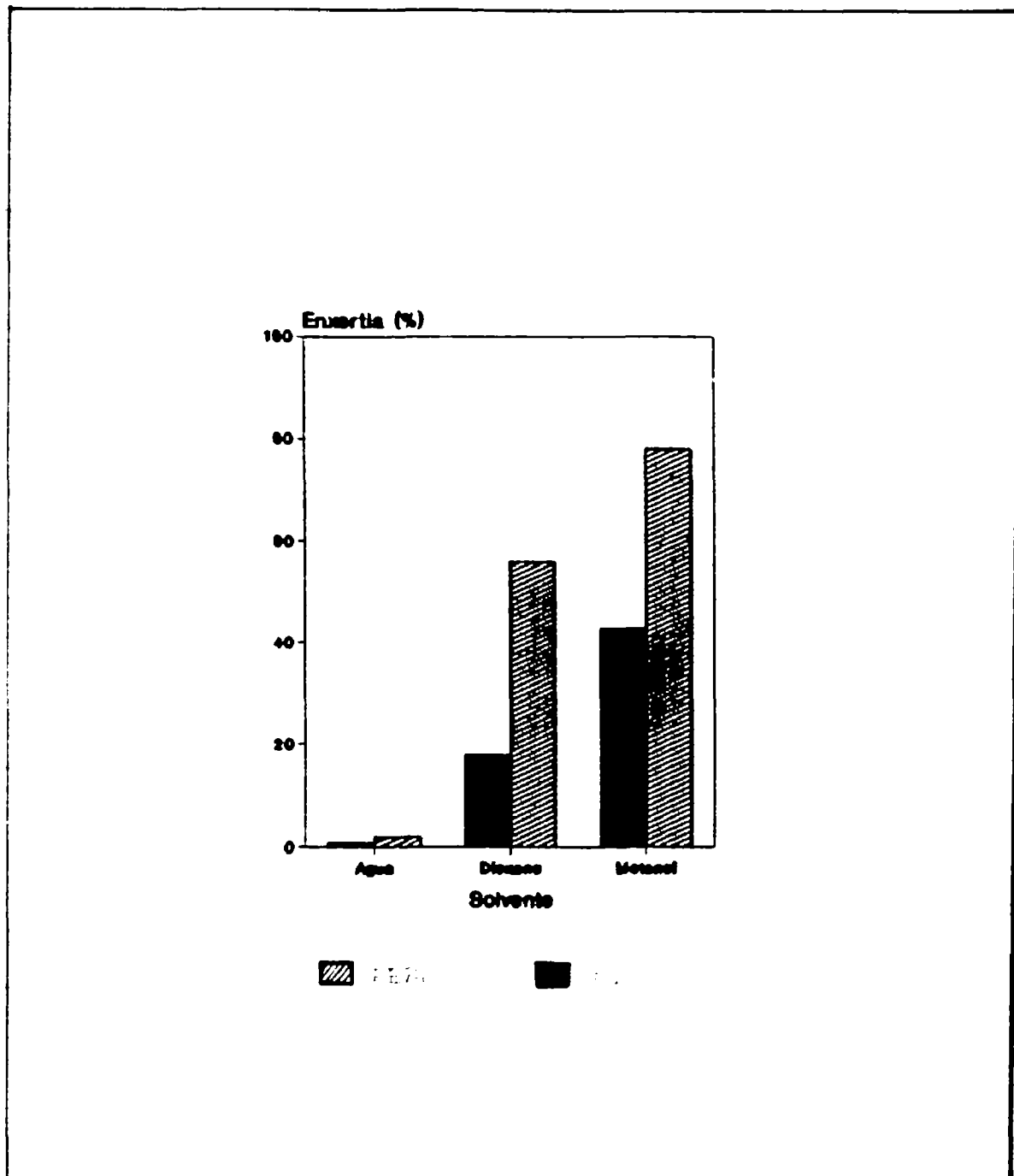


Fig. 9- Efeito solvente na enxertia via irradiação simultânea com raios gama do AA sobre os filmes de PVC e PEBD. Condições de enxertia: taxa de dose:  $0,27 \text{ kGy.h}^{-1}$ ; dose de irradiação:  $1,62 \text{ kGy}$ ; temperatura de irradiação:  $25^\circ\text{C}$ ; concentração do AA:  $20\% \text{ v/v}$ ; concentração do comonômero DMA:  $20\% \text{ (m/v)}$ .

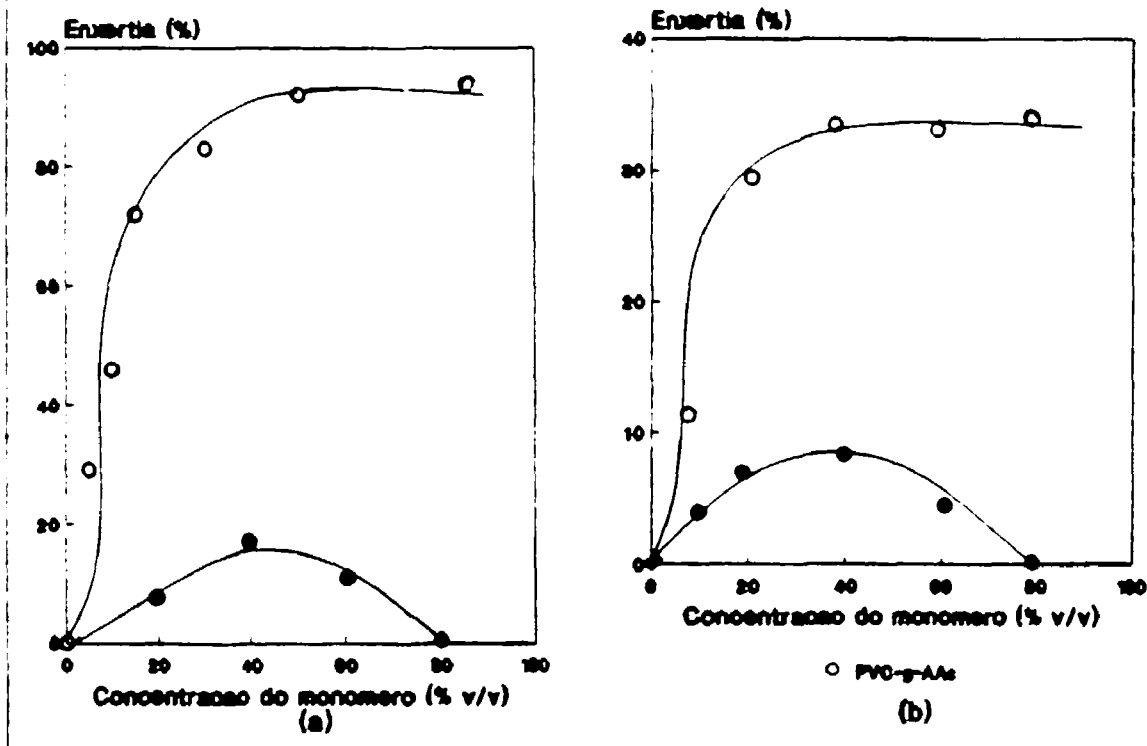
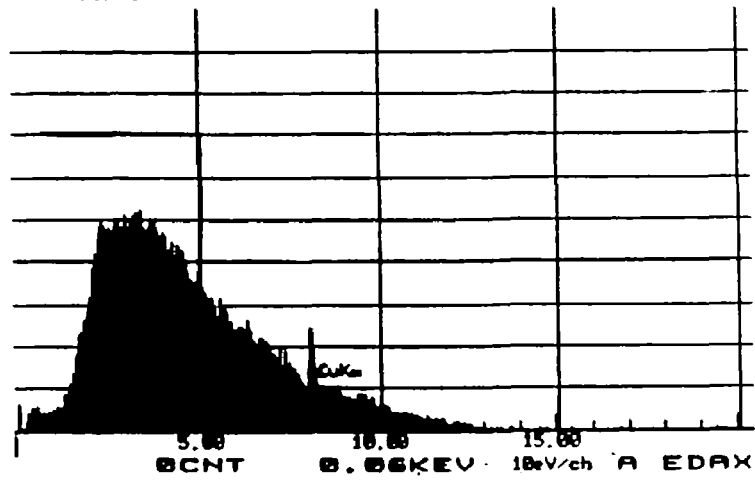


Fig. 10- Efeito do inibidor de homopolimerização na enxertia do AA sobre (a) PEBD e PVC. Condições de enxertia: Irradiação simultânea com raios gama; taxa de dose: 0,140 kGy/h; dose de irradiação: 2 kGy; concentração de íons cúprico: 0,5 % (m/v). (o) com Cu<sup>2+</sup>; (●) sem Cu<sup>2+</sup>.

RATE- 2127CPS            TIME- 100LSEC  
FS- 842CNT                PRST- 100LSEC  
A -AM: 4



RATE- 2127CPS            TIME- 100LSEC  
FS- 842CNT                PRST- 100LSEC  
A -AM: 4

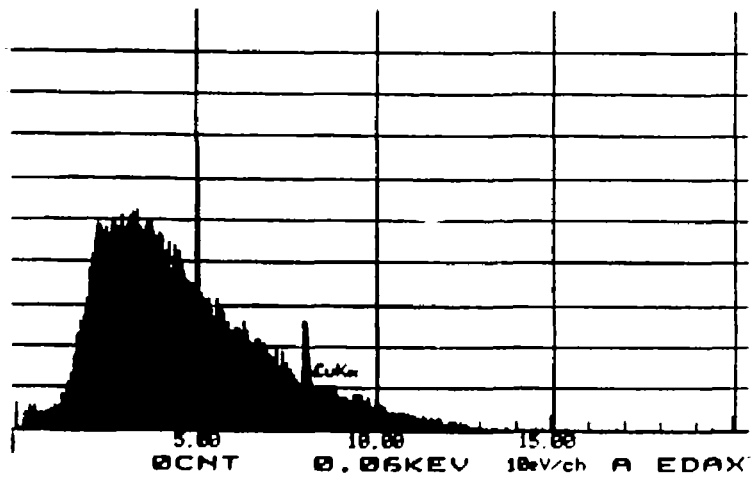
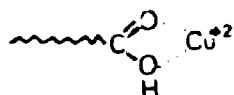


Fig. 11- Análise microestrutural por EDS dos copolímeros de enxerto utilizando  $\text{Cu}^{+2}$  como inibidor de homopolimerização.

em relação ao filme de PVC em ambas as técnicas, irradiação simultânea e peroxidação, pode ser devido à baixa estabilidade dos radicais na matriz de PVC, uma vez que este material é essencialmente amorfo<sup>95</sup>. A adição de estabilizantes à luz UV, comumente adicionadas às formulações de PVC, também poderia conferir ao polímero uma maior estabilidade frente ao processo de enxertia<sup>96</sup>.

A análise química das microregiões dos copolímeros de enxerto PEBD-g-AA e PVC-g-AA por análise de energia dispersiva (EDS) (Figura 11) indicou que o íon  $\text{Cu}^{+2}$  permanece na matriz polimérica mesmo após exaustivos processos de lavagem. Uma vez que os filmes obtidos ficaram intensamente coloridos, pode ser que se tenha formado um complexo bastante estável do tipo<sup>97</sup>:



Segundo trabalho de Lyman<sup>98</sup>, as impurezas contidas em um polímero, como resíduos de catalisadores ou íons metálicos, podem comprometer a aplicação deste como biomaterial uma vez que, se liberados, podem causar reações tóxicas.

A reatividade dos monômeros vinílicos em reações de copolimerização depende da natureza dos radicais criados. A natureza dos substituintes na dupla ligação do monômero pode ativar a dupla ligação, tornando-a mais ou menos reativa, podendo estabilizar o radical resultante por ressonância ou por efeitos de impedimento estérico<sup>45</sup>.

Trabalho de Garnett<sup>99</sup> ressalta a baixa homopolimerização de derivados acrílicos, quando estes são irradiados em presença de estireno, um monômero menos sensível à radiação, técnica esta que foi denominada de adição do comonômero.



Tendo em vista a necessidade da pureza dos copolímeros de enxerto para sua utilização como biomaterial, optou-se pela técnica do comonômero nos sistemas reacionais, PEBD-g-AA e PVC-g-AA, introduzindo um segundo monômero menos reativo que o ácido acrílico, o ácido N,N-dimetilacrílico (DMA). Este estabilizaria o sistema pela menor formação de homopolímero, proporcionando a obtenção de copolímeros de enxerto com maiores percentuais de enxertia. A escolha do DMA deve-se à sua semelhança química com o AA.

#### 4.1.3- Efeito da concentração do monômero

O efeito da concentração do monômero DMAA no percentual de enxertia foi estudado pela variação de sua concentração no solvente acetato de etila utilizando-se raios gama e elétrons acelerados, estando os resultados obtidos apresentados na Figura 12, para os filmes de PTFE, PETFE e PEBD. À medida em que se aumentou a concentração do monômero, aumentou-se o percentual de enxertia até atingir-se o máximo, ao redor de 40%, a partir do qual observou-se uma diminuição do processo.

Este comportamento é explicado pelo fato de que à baixa concentração do monômero, mesmo que sua difusão dentro do substrato seja alta, a concentração de radicais será baixa. A alta concentração do monômero leva a um aumento tanto da difusão como da concentração de radicais, aumentando-se assim o percentual de enxertia, até atingir-se o ponto onde haverá a formação do homopolímero insolúvel, a poli(N,N-dimetilacrilamida) (PDMAA)<sup>100</sup>. A formação do homopolímero desfavorece a reação de enxertia do DMAA no substrato.

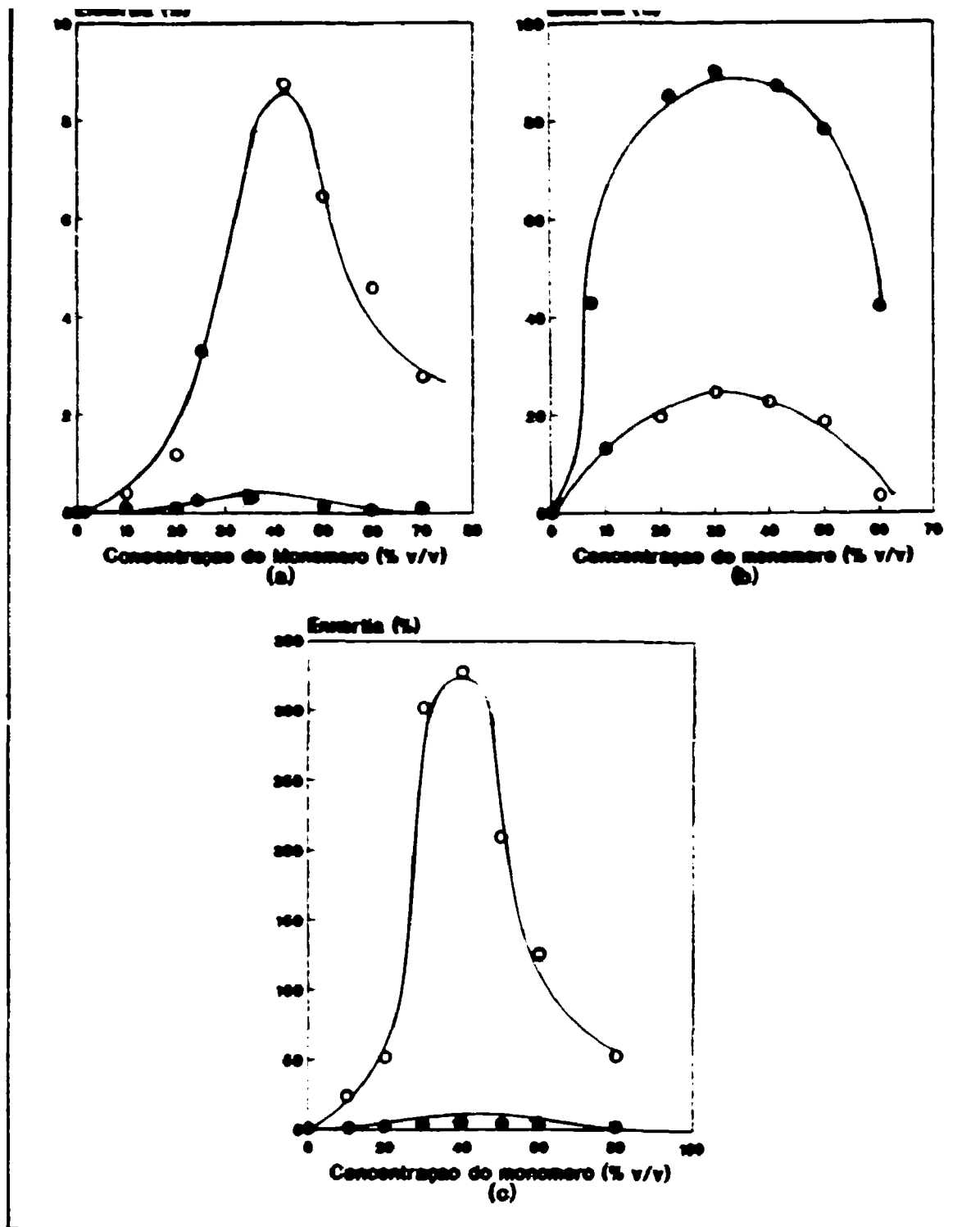


Fig. 12- Efeito da concentração do monômero DMAA na enxertia sobre: (a) PTFE, (b) PETFE e (c) PEBD. (o) Irradiação com gama ( $\gamma$ ) e (e) elétrons ( $e^-$ ). Condições de enxertia: taxa de dose de irradiação:  $0,055 \text{ kG.h}^{-1}$  ( $\gamma$ ), e  $20 \text{ kGy.s}^{-1}$  ( $e^-$ ); dose de irradiação:  $0,44 \text{ kGy}$  ( $\gamma$ ) e  $65 \text{ kGy}$  ( $e^-$ ); concentração do DMAA: 35% v/v; temperatura de irradiação:  $25^\circ\text{C}$ ; energia do feixe de elétrons:  $0,5 \text{ MeV}$ . Copolimerização ( $e^-$ ): banho  $50^\circ\text{C}/24 \text{ h}$ /atmosfera inerte.

Analisando-se ainda a Figura 12 nota-se que é possível atingir-se altos percentuais de enxertia quando se trabalha com filmes de PEBD e PETFE, sendo observada a seguinte seqüência dos filmes, em ordem crescente dos percentuais de enxertia atingidos:

PEBD > PETFE > PTFE

Este fato pode ser devido às unidades etilênicas dos filmes de PETFE e PEBD que provavelmente aumentam o intumescimento desses em DMAA, efeito este que não se observa com as unidades de tetrafluoro-etileno presentes no PTFE.

A irradiação com elétrons acelerados ( $e^-$ ) levou à obtenção de copolímeros de PETFE com altos níveis de enxertia de PDMAA, superior àqueles obtidos com os outros dois substratos (Figura 12-b). Segundo o trabalho de Okamoto<sup>101</sup>, a alta enxertabilidade do PETFE neste tipo de irradiação deve-se provavelmente à alta densidade de radicais gerados na matriz polimérica. Os baixos níveis de enxertia atingidos para o PTFE e PEBD pode dever-se ao alto grau de cristalinidade do polímero fluorado (95%)<sup>102</sup>, que dificultaria a difusão do monômero no substrato. O caráter amorfo do PEBD, cujo percentual de cristalinidade, determinado por difração de raios X, foi de 37% (Figura 13-c), levaria a uma alta velocidade de recombinação de radicais, desfavorecendo a reação de enxertia<sup>103</sup>.

A enxertia do AA nos filmes de PEBD e PVC foi efetuada utilizando-se técnicas de irradiação mútua com raios gama e peroxidação com feixe de elétrons. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 13.

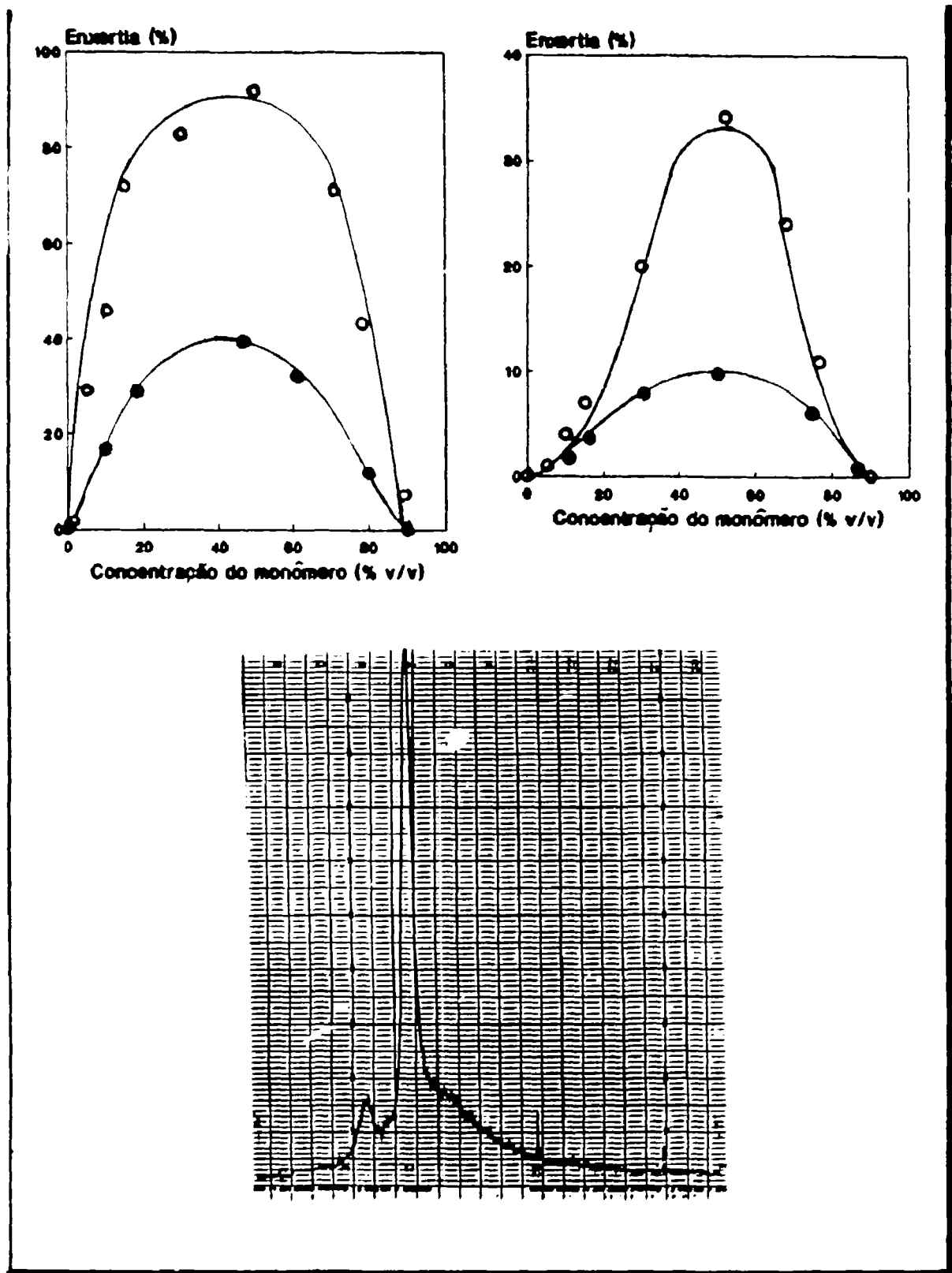


Fig. 13- Efeito da concentração do monômero AA na enxertia sobre: (a) PEBD, (b) PVC. (o) Irradiação com raios gama ( $R\gamma$ ) e (●) elétrons ( $e^-$ ).

Condições de enxertia:

concentração do DMA: 20% v/v; solvente: metanol;  
 taxa de dose de irradiação:  $0,27 \text{ kGy}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $R\gamma$ ) e  $20 \text{ kGy}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $e^-$ ); dose de irradiação:  $1,62 \text{ kGy}$  ( $R\gamma$ ) e  $65 \text{ kGy}$  ( $e^-$ );  
 temperatura de irradiação:  $25^\circ\text{C}$ .  
 Copolimerização ( $e^-$ ): banho  $50^\circ\text{C}/24 \text{ h}$ /atmosfera inerte.

A razão para a diminuição do percentual de enxertia para concentrações de AA superiores a 40% v/v pode ser devido à baixa solubilidade do ácido acrílico no poli(ácido acrílico) (PAA) enxertado na superfície dos substratos poliméricos, que limitaria a acessibilidade do monômero aos radicais criados na matriz polimérica<sup>103</sup>.

#### 4.1.4- Efeito da Taxa de Dose de irradiação

A Figura 14 mostra a dependência entre o percentual de enxertia e a taxa de dose de irradiação com raios gama e elétrons acelerados. Observa-se que os mais altos percentuais de enxertia com raios  $\gamma$  foram obtidos para uma taxa de dose de irradiação de  $0,053 \text{ kGy.h}^{-1}$ , indicando que existe um aumento na velocidade do processo a baixas taxas de dose, até atingir-se uma enxertia na qual a velocidade é máxima. No caso da irradiação com elétrons acelerados, a enxertia do DMAA sobre os filmes de PTFE e PEBD foi desprezível, sendo que para o filme de PETFE foi alcançado um nível de enxertia máximo de 80%, a uma taxa de dose de  $20 \text{ kGy.s}^{-1}$ .

De acordo com os resultados, nota-se que ao utilizar-se a técnica de irradiação simultânea com raios  $\gamma$ , uma taxa de dose baixa é mais efetiva na obtenção de altos níveis de enxertia que uma taxa de dose mais alta. Isto se deve ao fato de que a uma taxa de dose de irradiação mais elevada, a homopolimerização torna-se alta, diminuindo a disponibilidade do monômero e conseqüentemente, o percentual de enxertia.

No método da peroxidação dos filmes com elétrons acelerados, o processo de enxertia parece depender do grau de cristalinidade do material.

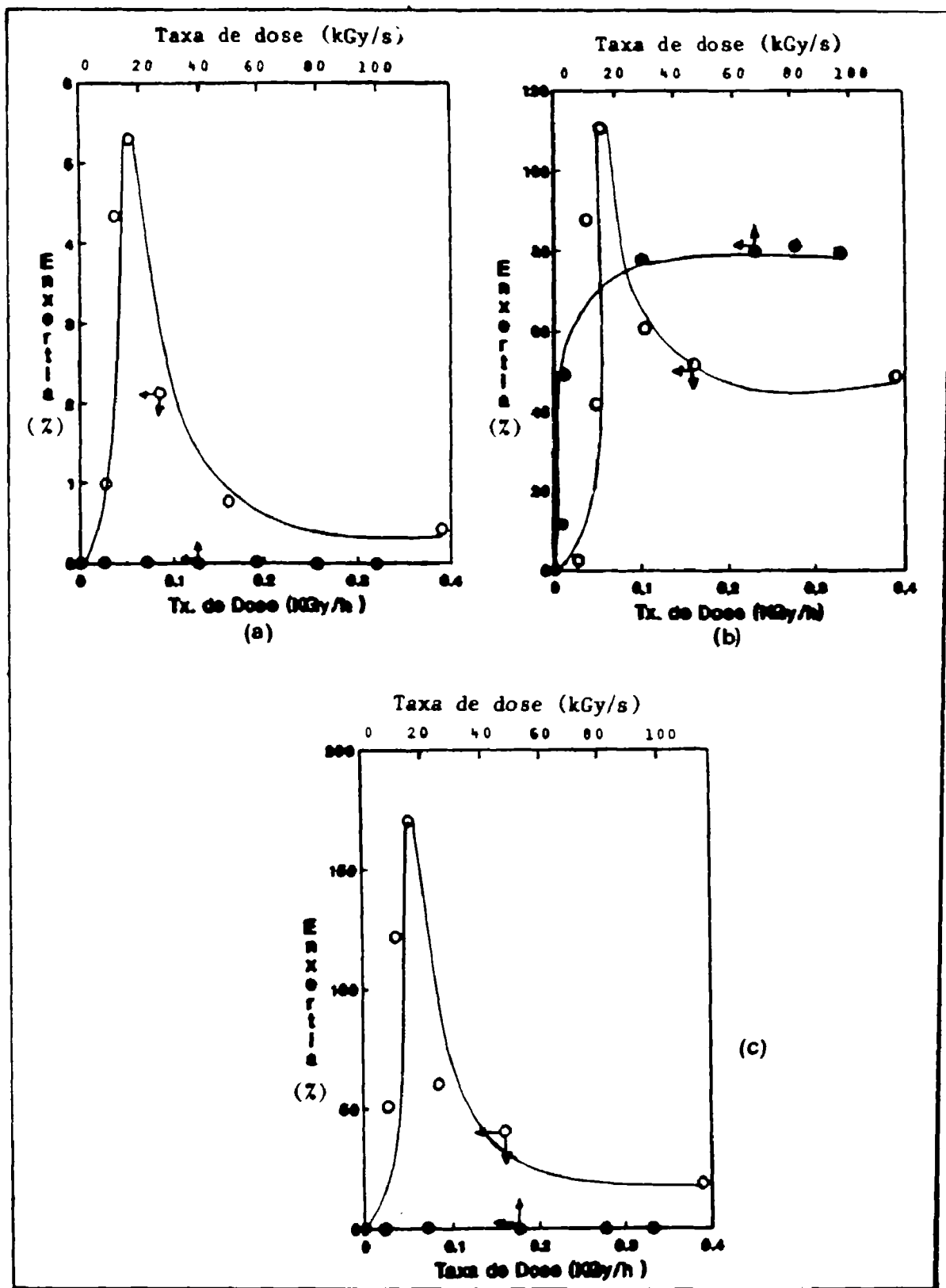


Fig. 14- Efeito da taxa de dose de irradiação na enxertia do DMAA sobre: (a) PTFE, (b) PETFE, (c) PEBD. (o) Irradiação com raios gama ( $\gamma$ ) e (●) Irradiação com elétrons ( $e^-$ ).

Condições de enxertia:

Concentração do monômero: 35% v/v; solvente: acetato de etila; temperatura de irradiação: 25°C; dose de irradiação: 0,2 kGy ( $\gamma$ ) e 65 kGy ( $e^-$ ); energia do feixe de elétrons: 0,5 MeV. Copolimerização ( $e^-$ ): banho 50°C/24 h/atmosfera inerte.

O caráter parcialmente cristalino do PETFE (cristalinidade: 50-60%)<sup>105</sup> poderia contribuir para a difusão de radicais peróxidos da região cristalina do polímero para as regiões amorfas<sup>101</sup>. Estas regiões seriam facilmente atingidas pela solução monômero-solvente levando, junto com a decomposição dos radicais peróxidos, a um incremento no nível de enxertia.

O PTFE, por outro lado, por possuir um alto grau de cristalinidade<sup>102</sup>, dificultaria a difusão de radicais, bem como a interação destes com o monômero.

No caso do PEBD, devido ao seu caráter amorfo, a velocidade de recombinação de radicais seria elevada, havendo a formação de ligações cruzadas, que desfavoreceria o processo de enxertia do DMAA<sup>103</sup>.

A Figura 15 mostra o efeito da taxa de dose na irradiação simultânea e com elétrons acelerados na enxertia do AA sobre o PEBD e PVC. Observa-se que o maior percentual de enxertia na irradiação simultânea, cerca de 18% para o PVC e 78% para o PEBD, foi atingido para uma taxa de dose de 0,5 kGy/h, indicando que existe um aumento na velocidade do processo de enxertia a baixas taxas de dose, até atingir-se um valor de enxertia no qual a saturação na densidade de radicais é máxima. Utilizando-se elétrons acelerados, a taxa de dose para os filmes de PEBD e PVC alcançarem a saturação de radicais foi de 20 kGy/s.

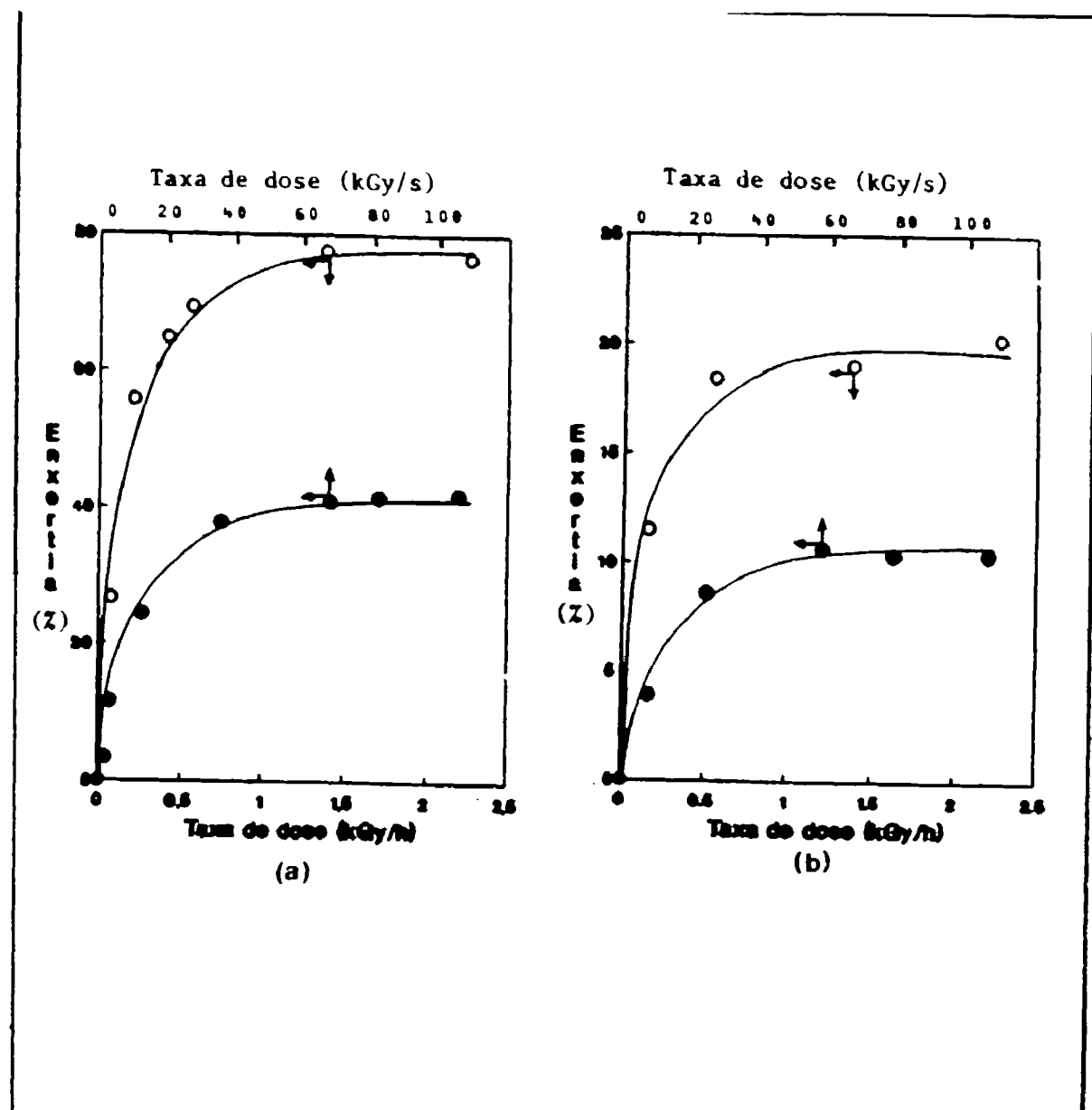


Fig. 15- Efeito da taxa de dose de irradiação na enxertia do AA sobre: (a) PEBD, (b) PVC. (O) Irradiação com raios gama ( $R\gamma$ ) e (●) elétrons ( $e^-$ ).

Condições de enxertia:

Concentração do AA: 40% v/v; concentração do DMA: 20% v/v; solvente: metanol; temperatura de irradiação: 25°C; dose de irradiação: 0,2 kGy ( $R\gamma$ ) e 65 kGy ( $e^-$ ). Copolimerização ( $e^-$ ): banho 50°C/24 h/atmosfera inerte.



Contrariamente ao DMAA, obteve-se uma boa enxertabilidade do AA sobre os filmes de PEBD, provavelmente devido à alta reatividade deste último em relação ao primeiro monômero ( $Q_{\text{DMAA}} : 1,080 ; e_{\text{DMAA}} : -0,500 / Q_{\text{AA}} : 1,150 ; e_{\text{AA}} : 0,770$ )<sup>106</sup>. A velocidade de recombinação de radicais na matriz do PEBD seria menor que a velocidade de enxertia, o que justificaria os altos percentuais de enxertia de AA obtidos para este polímero, em relação ao DMAA.

O baixo percentual de enxertia do PVC comparativamente ao PEBD pode dever-se ao caráter amorfo deste polímero (5-15%)<sup>95</sup>, que favoreceria os mecanismos de recombinação neste material.

#### 4.1.5- Efeito da dose de irradiação

O efeito da dose de irradiação no processo de enxertia do DMAA, sobre os filmes poliméricos de PTFE, PETFE e PEBD, via irradiação simultânea com raios gama e elétrons acelerados, é mostrado na Figura 16. Nota-se que o percentual de enxertia aumenta com a dose de irradiação, atingindo-se rapidamente a saturação para taxas de dose elevadas. O nivelamento do percentual de enxertia a altas doses pode ser atribuído a uma saturação na quantidade de radicais formados na matriz polimérica<sup>92</sup>. A irradiação com elétrons acelerados não foi efetiva para o PTFE e PEBD provavelmente devido a algum processo de recombinação de radicais nestes polímeros<sup>101,103</sup>.

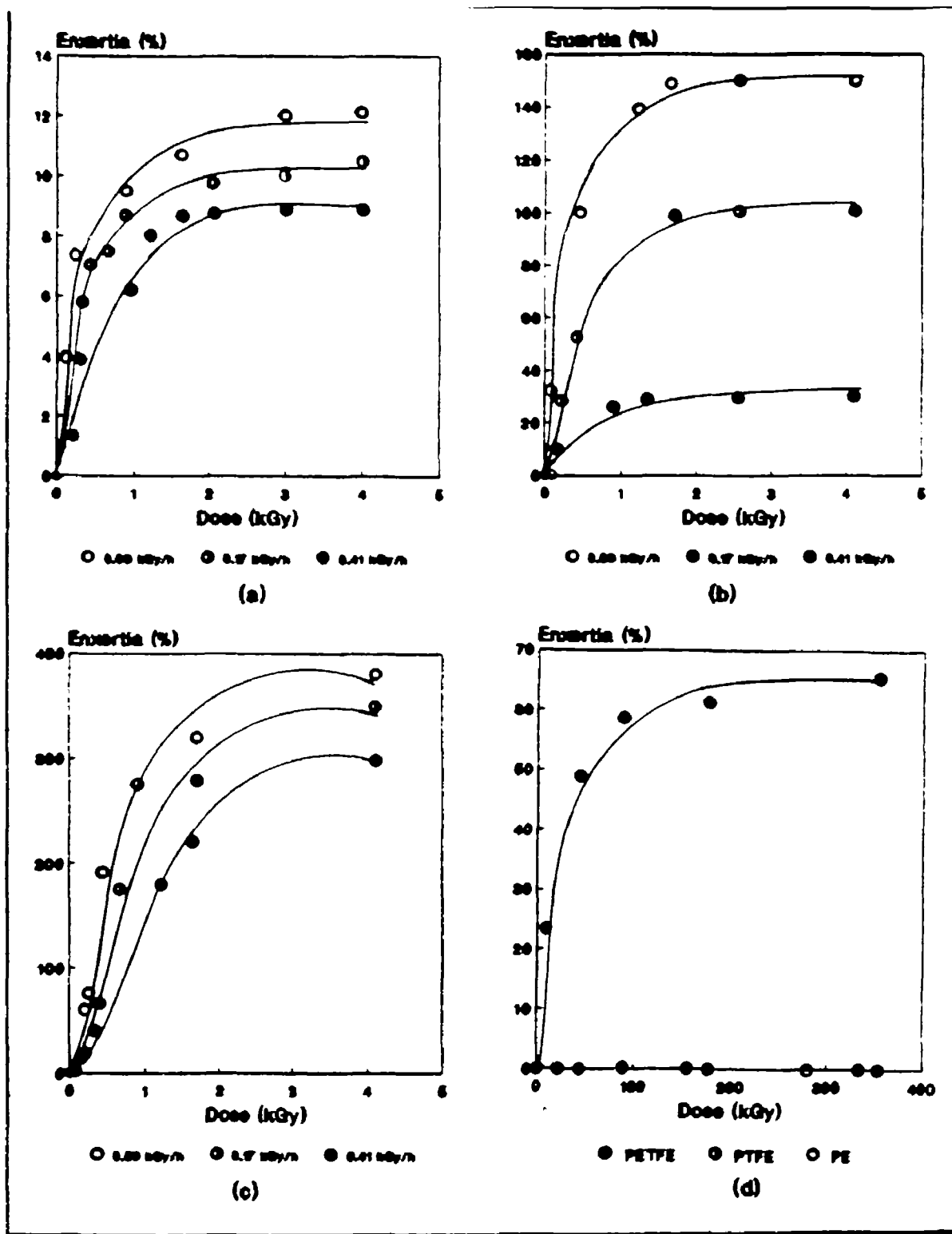


Fig. 16- Efeito da dose de irradiação na enxertia do DMAA sobre os filmes dos polímeros: (a) PTFE, (b) PETFE, (c) PEBD irradiados com raios gama ( $R_{\gamma}$ ) e (d) Filmes irradiados com elétrons ( $e^{-}$ ). As condições são dadas na Figura 14.

A dependência entre o nível de enxertia e a dose de irradiação do AA nos filmes de PEBD e PVC é mostrado na Figura 17. A não saturação observada para o filme de PVC, com o incremento da dose de irradiação (raios gama), pode indicar uma possível enxertia no interior do substrato polimérico<sup>107</sup>.

#### 4.1.6- Efeito da temperatura de irradiação

A Figura 18-a mostra a relação existente entre o percentual de enxertia do DMAA e a temperatura de irradiação via raios gama e elétrons acelerados, no intervalo de 10-60°C, para os filmes de PTFE, PETFE e PEBD.

Houve um pequeno incremento no percentual de enxertia com a temperatura para o filme de PTFE, provavelmente devido à alta cristalinidade deste material<sup>95</sup>. O caráter amorfo do PEBD e parcialmente cristalino para o PETFE<sup>105</sup> favoreceria a difusão da solução monômero/solvente, levando aos altos percentuais de enxertia observados.

Com elétrons acelerados (Figura 18-b), observou-se que o aumento da temperatura de irradiação levou a um aumento no percentual de enxertia. Isto pode ser devido a processos de decomposição de radicais peróxidos gerados na fase cristalina do polímero (PETFE) que migrariam para a fase amorfa, elevando consequentemente o percentual de enxertia<sup>107</sup>.

Não foi estudado o efeito da temperatura na reação de copolimerização do AA, devido à alta exotermia deste monômero na etapa de iniciação<sup>27</sup>.

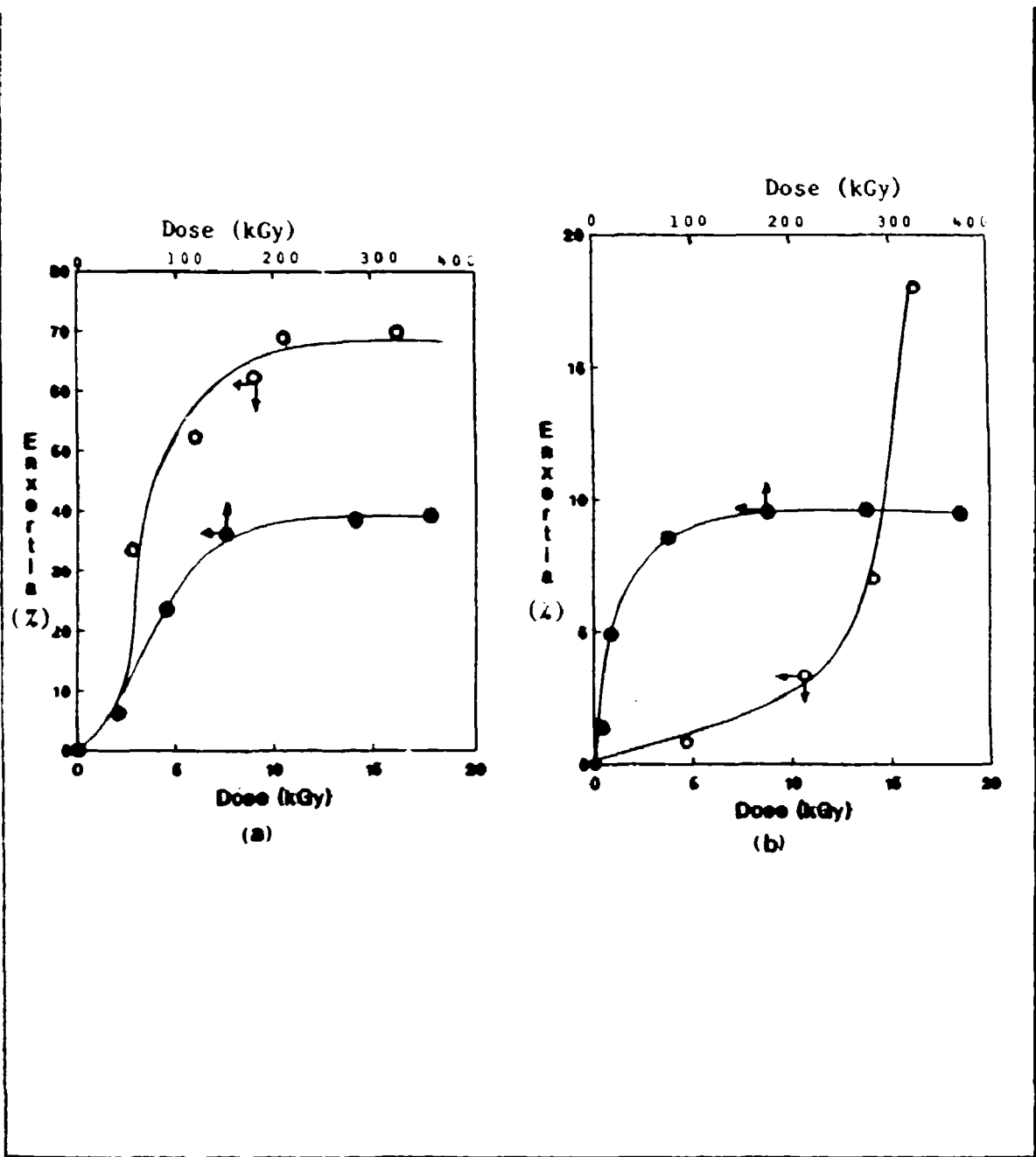


Fig. 17- Efeito da dose de irradiação na enxertia do AA sobre os filmes dos polímeros: (a) PEBD e (b) PVC. Irradiados com raios gama (o) e elétrons • As condições são dadas na Figura 15.

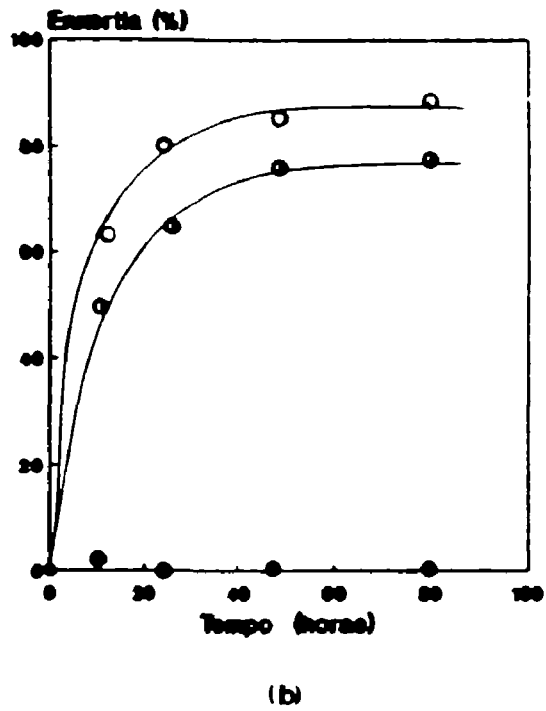
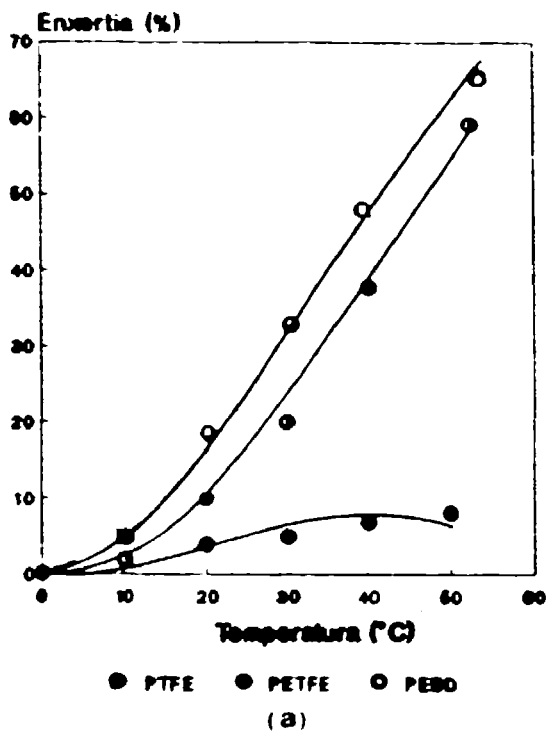


Fig. 18- Efeito da temperatura na enxertia do DMAA sobre os filmes poliméricos utilizando raios gama (a) e elétrons acelerados (b).

#### 4.1.7- Efeito da extração do plastificante do substrato

É comum adicionar-se ao PVC um plastificante com o objetivo de reduzir-se as interações intermoleculares, dando a maleabilidade característica dos filmes comerciais deste polímero<sup>108</sup>.

Observou-se que após a imersão dos filmes de PVC em solventes, ou no monômero vinílico, por um período de 24 horas, e secagem à vácuo à temperatura ambiente, havia uma perda bastante significativa de peso. Tal fato poderia contribuir para uma interpretação errônea do percentual de enxertia. Procedeu-se então à lavagem dos filmes de PVC em extrator soxhlet, utilizando-se metanol para extração do plastificante, por um período de até 24 horas.

Os resultados da extração do plastificante está mostrado na Figura 19. Percebeu-se que após 20 horas de extração em soxhlet o percentual de plastificante extraído foi cerca de 18%, que permaneceu constante, mesmo após períodos mais prolongados de extração. O espectro de absorção no infravermelho (Figura 19-b) mostrou uma forte diminuição na intensidade da banda a  $1725\text{ cm}^{-1}$  correspondente à carbonila do plastificante extraído. O índice de refração do extrato, medido em um refractômetro de Abbe foi de 1,4790, que corresponde ao ftalato de dinitrooctila (DNOP)<sup>108</sup>. Os filmes mantiveram-se íntegros durante e após o processo de enxertia.

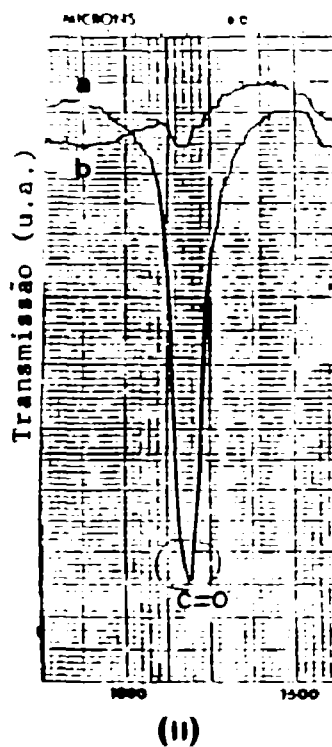
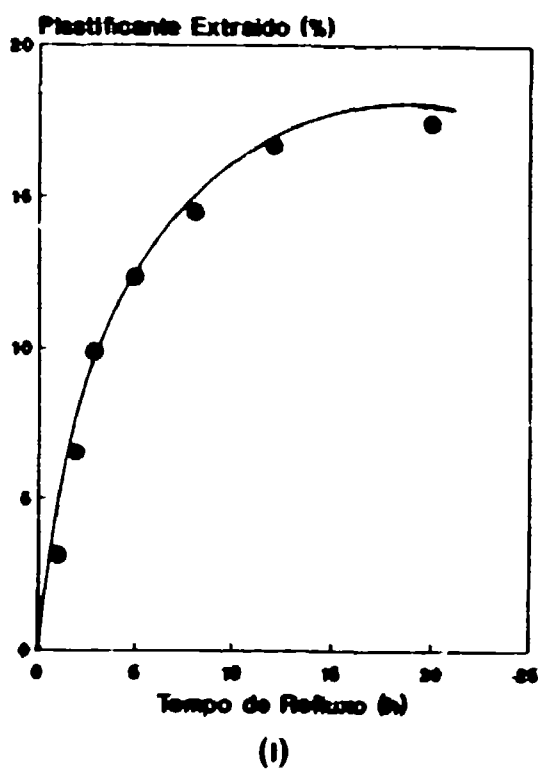


Fig. 19- (I) Extração do plastificante de filmes de PVC em metanol e (II) espectro de absorção no IR: (a) antes da extração e (b) após o processo.

## 4.2- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE

### 4.2.1- Hidrofilicidade

Desde que a tendência de um líquido de se espalhar na superfície polimérica aumenta, à medida que o ângulo de contato diminui, esta medida pode ser utilizada na avaliação da hidrofilicidade do polímero. Assim, quando o ângulo de contato tende a zero ( $\theta = 0^\circ$ ), o líquido molha o polímero e quando  $\theta = 180^\circ$ , não molha<sup>43</sup>.

O conteúdo de água nos hidrogéis do DMAA e AA é mostrado na Figura 20 (c, d). Como pode ser visto, o conteúdo de água aumentou com o nível de enxertia para os copolímeros de enxerto (DMAA e AA).

Para o PEBD-g-DMAA e PVC-g-AA o conteúdo de água nos hidrogéis foi saturado ao redor de 40% de enxertia. Este comportamento sugere que apenas as cadeias enxertadas na superfície foram intumescidas e que o percentual maior de enxertia deve-se às cadeias hidrofílicas, enxertadas no interior da matriz polimérica, que não foram alcançadas pela água.

O gráfico na Figura 20 (a, b) mostra o ângulo de contato dos copolímeros de enxerto derivados do DMAA e AA com diferentes níveis de enxertia. Como pode ser visto, o ângulo de contato diminuiu, à medida que o grau de enxertia aumentou, demonstrando que um alto percentual de enxertia tornou as superfícies hidrofílicas.



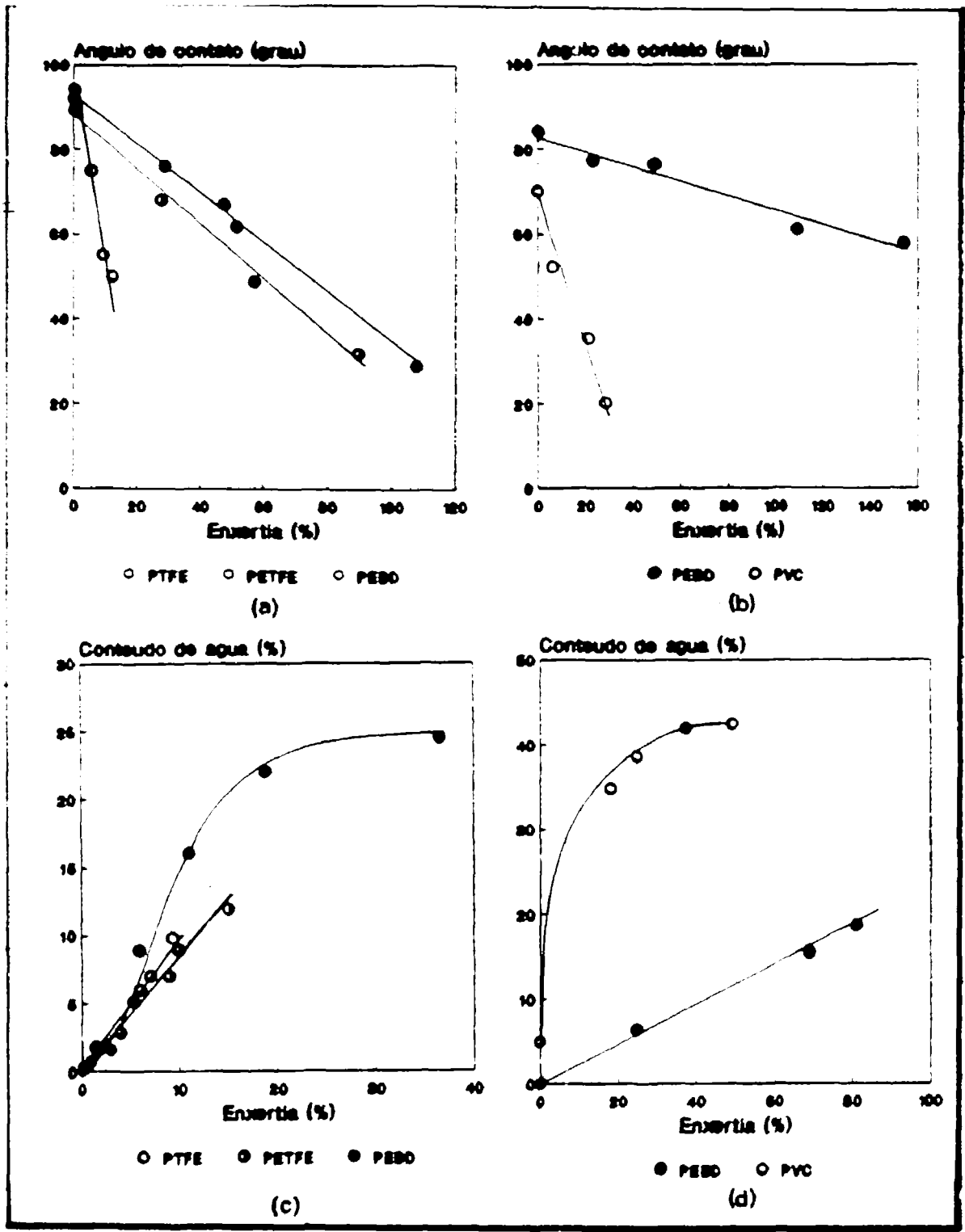


Fig. 20- Medidas do ângulo de contato para os copolímeros de enxerto derivados do: (a) DMAA e (b) AA e conteúdo de água para os copolímeros de enxerto derivados do: (c) DMAA e (d) AA.

Os dois parâmetros, medida do ângulo de contato e conteúdo de água, evidenciaram o caráter hidrofílico das superfícies poliméricas, após o processo de enxertia dos monômeros DMAA e AA.

#### 4.2.2- Estudos espectroscópicos

O espectro no infravermelho dos polímeros e copolímeros foram obtidos utilizando a técnica de múltipla reflexão interna (FTIR-MIR). Os espectros mostrados nas Figuras 21-23 referem-se ao enxerto do DMAA nos filmes de PTFE, PETFE e PEBD, via raios gama, e no filme de PETFE, via elétrons acelerados.

Como pode ser observado na Figura 21, os filmes de PTFE enxertados com o DMAA apresentaram bandas de absorção a  $1617\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas à vibração de estiramento do grupo  $>\text{C}=\text{O}$  do DMAA. As bandas de absorção a  $1147\text{ cm}^{-1}$ ,  $639\text{ cm}^{-1}$  e  $504\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas, respectivamente, aos grupamentos  $-\text{CF}_2$ ,  $-\text{CF}_3$  e  $=\text{CF}_2$  do PTFE<sup>109-110</sup>.

Na Figura 22, o espectro de reflectância do PETFE-g-DMAA mostra uma banda de absorção a  $1624\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao grupo  $>\text{C}=\text{O}$  do DMAA, e  $1120$  e  $407\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes às vibrações  $-\text{CF}$  e  $-\text{CF}_2$ , características das unidades  $-\text{CF}_2\text{CF}_2-$  no PETFE. O espectro FTIR-MIR para o PETFE-g-DMAA, obtido via raios gama e elétrons acelerados, apresentaram bandas de absorção similares.

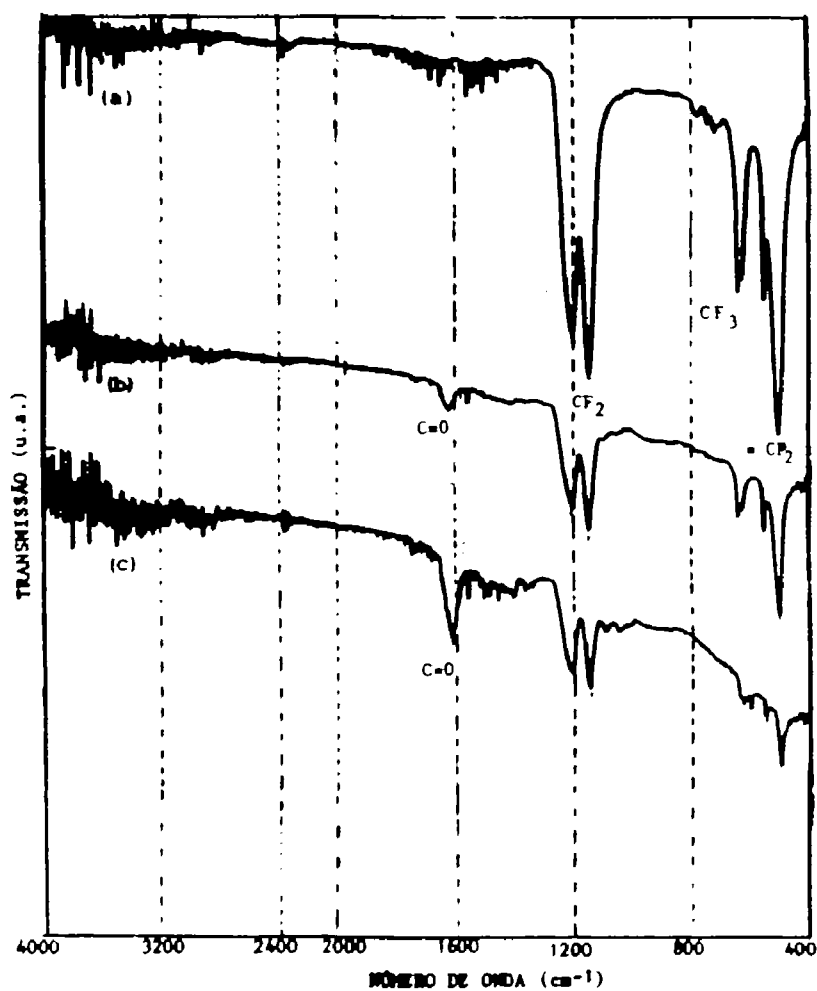


Fig. 21- Espectro de reflectância (FTIR-MIR) para os copolímeros de enxerto: (a) PTFE não modificado; (b) PTFE-g-DMAA (g: 1%); (c) PTFE-g-DMAA (g: 9%). g: percentual de enxertia.

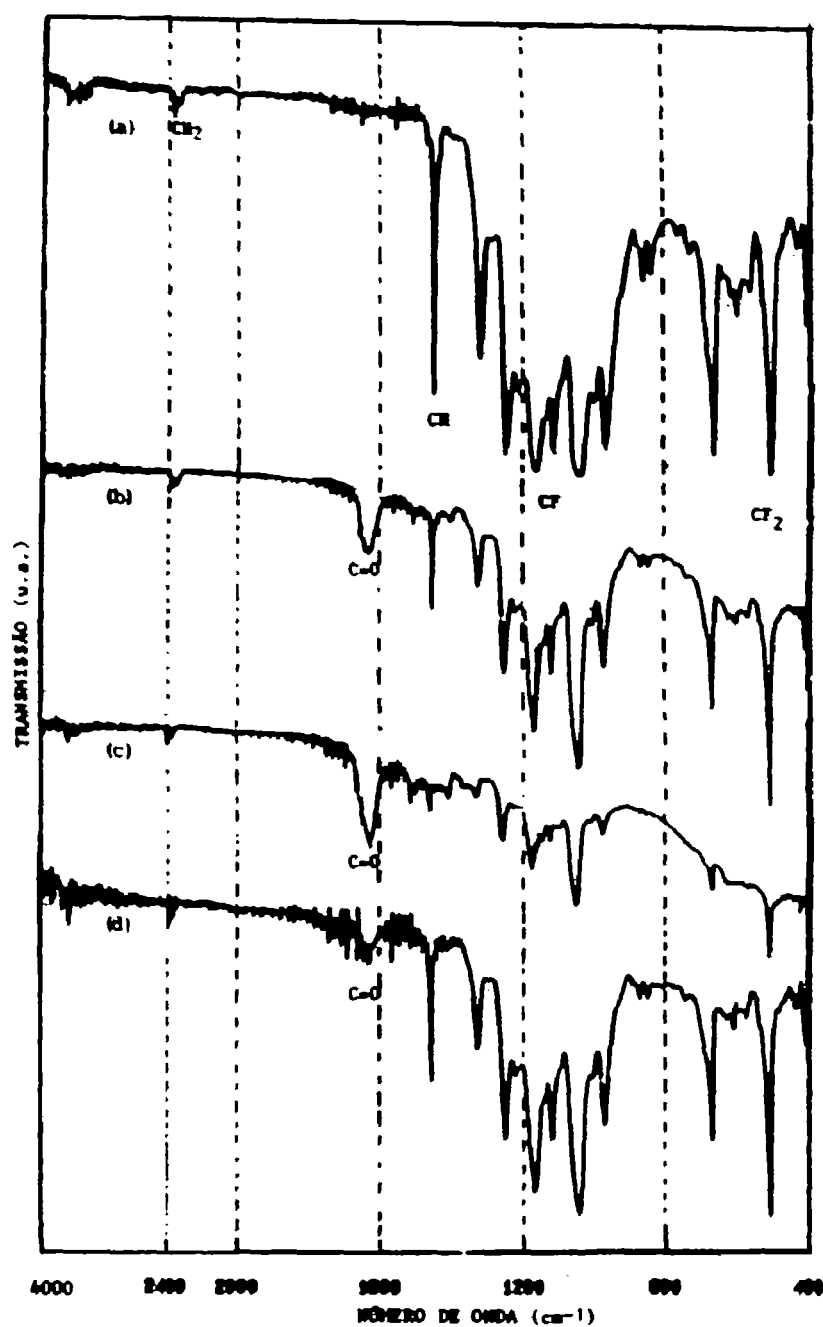


Fig. 22- Espectro FTIR-MIR para filmes de: (a) PETFE não modificado; (b) PETFE-g-DMAA (g: 11%); (c) PETFE-g-DMAA (g: 29%), (d) PETFE-g-DMAA (e) (g: 72%).

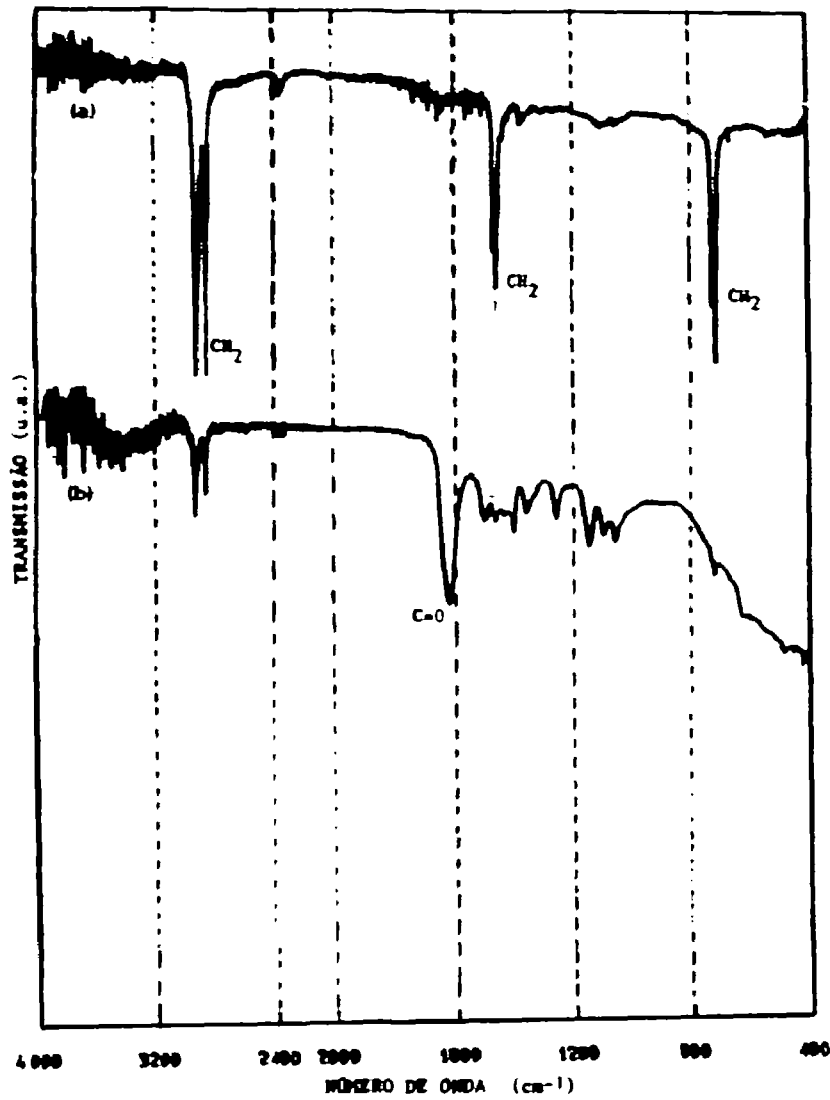


Fig. 23- Espectro FTIR-MIR para filmes de: (a) PE não modificado; (b) PEBD-G-DMAA (g: 116t).

A Figura 23 mostra o espectro de reflectância do PEBD e PEBD-g-DMAA. A banda de absorção a  $1617\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento do  $>\text{C}=\text{O}$ , característica do DMAA. As absorções a  $2848 - 2817\text{ cm}^{-1}$  e  $1463\text{ cm}^{-1}$ , correspondem às vibrações  $-\text{CH}-$  e  $-\text{CH}_2-$ , características do PE. A absorção a  $730-720\text{ cm}^{-1}$  é correspondente à vibração  $-\text{CH}_2-$  da fase cristalina do PEBD<sup>111</sup>.

Os espectros de reflectância dos filmes de PEBD e PVC enxertados com AA, via irradiação simultânea, são apresentados na Figura 24. O aparecimento de uma banda de absorção a  $1701\text{ cm}^{-1}$  é característica do grupo  $>\text{C}=\text{O}$  do PAA. Nota-se uma diminuição bastante acentuada nas bandas de absorção, devido aos grupamentos  $-\text{CH}_2-$  a  $2817\text{ cm}^{-1}$  da matriz de PEBD e PVC, bem como a  $680\text{ cm}^{-1}$ , característica da ligação C-Cl no PVC<sup>112</sup>. Os espectros FTIR-MIR dos copolímeros obtidos com elétrons acelerados foram similares aos da irradiação simultânea.

A distribuição das cadeias de PDMAA e PAA nas superfícies poliméricas foi estimada quantitativamente através da medida da razão dos picos  $\text{C}=\text{O}/\text{C}-\text{F}$ ,  $\text{C}=\text{O}/\text{C}-\text{H}$  e  $\text{C}=\text{O}/\text{C}-\text{Cl}$ , a partir dos espectros obtidos no FTIR-MIR.

A Figura 25 mostra os valores da razão  $\text{C}=\text{O}/\text{CF}$  e  $\text{C}=\text{O}/\text{CH}$  em função do percentual de enxertia para os sistemas PTFE-g-DMAA e PEBD-g-DMAA, obtidos via raios gama, e, PETFE-g-DMAA, obtidos via raios gama e elétrons acelerados (Figura 25-b). A Figura 26 apresenta os valores da razão  $\text{C}=\text{O}/\text{CH}$  e  $\text{C}=\text{O}/\text{C}-\text{Cl}$  para o PE-g-AA e PVC-g-AA, obtidos utilizando os dados da irradiação simultânea.

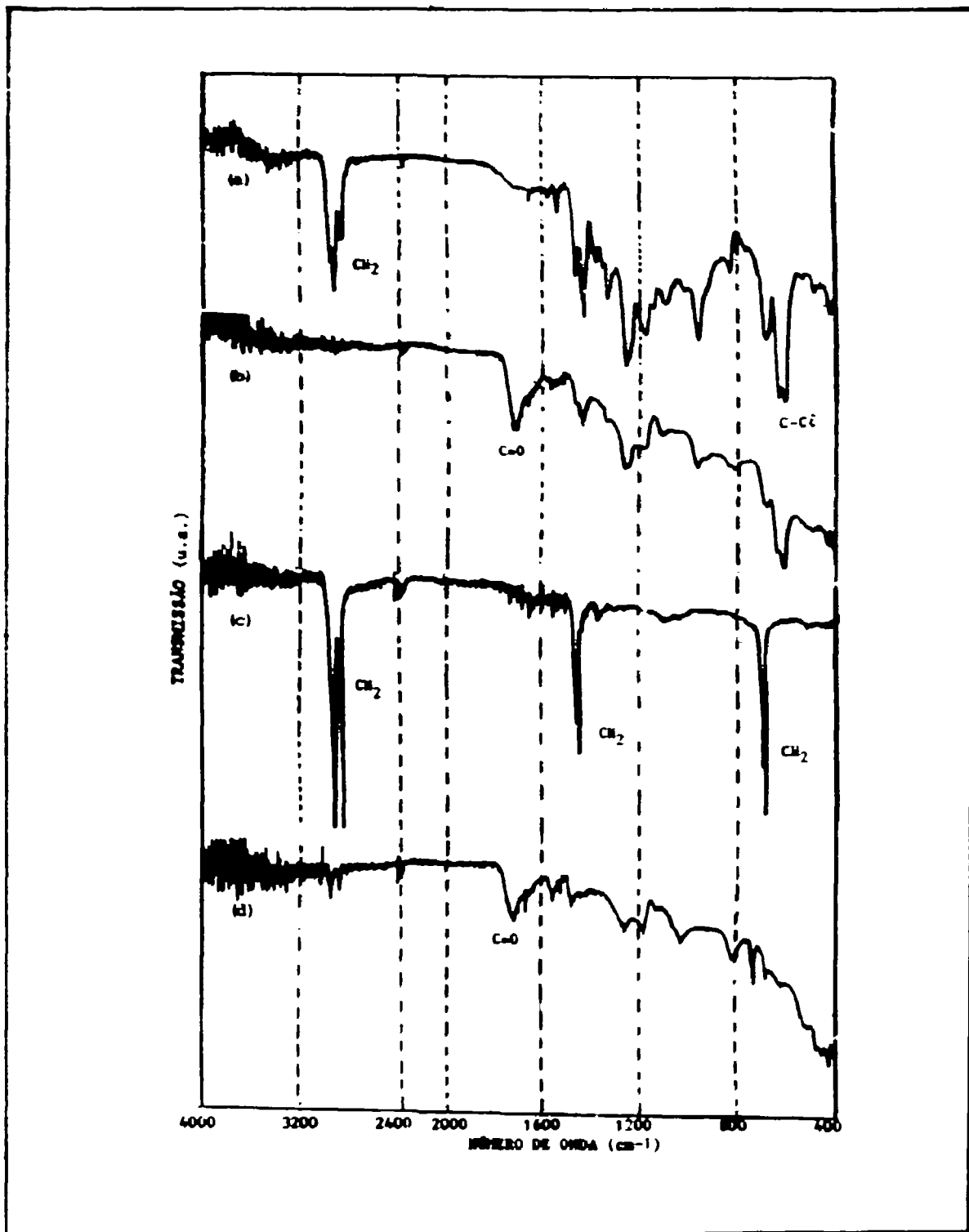


Fig. 24- Espectro FTIR-MIR para filmes de: (a) PVC não modificado; (b) PVC-g-AA (g: 20%); (c) PEBD não modificado; (d)PEBD-g-AA (g: 154%).

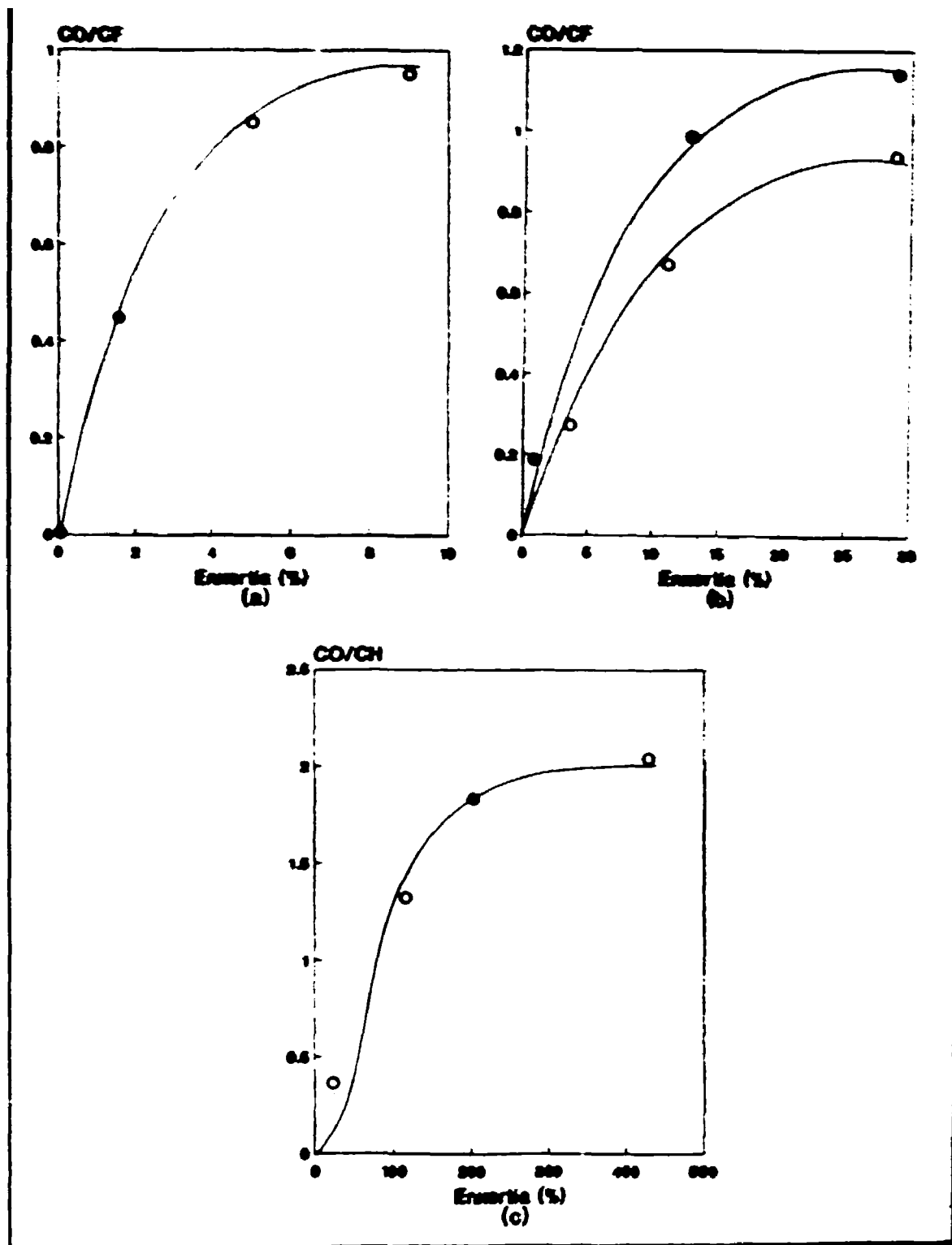


Fig. 25- Razão CO/CF e CO/CH para os sistemas : (a) PTFE-g-DMAA, (b) PETFE-g-DMAA e (c) PEBD-g-DMAA em função do percentual de enxertia obtidas a partir dos espectros FTIR-MIR. (○)  $R\gamma$  e (●)  $e^-$ .



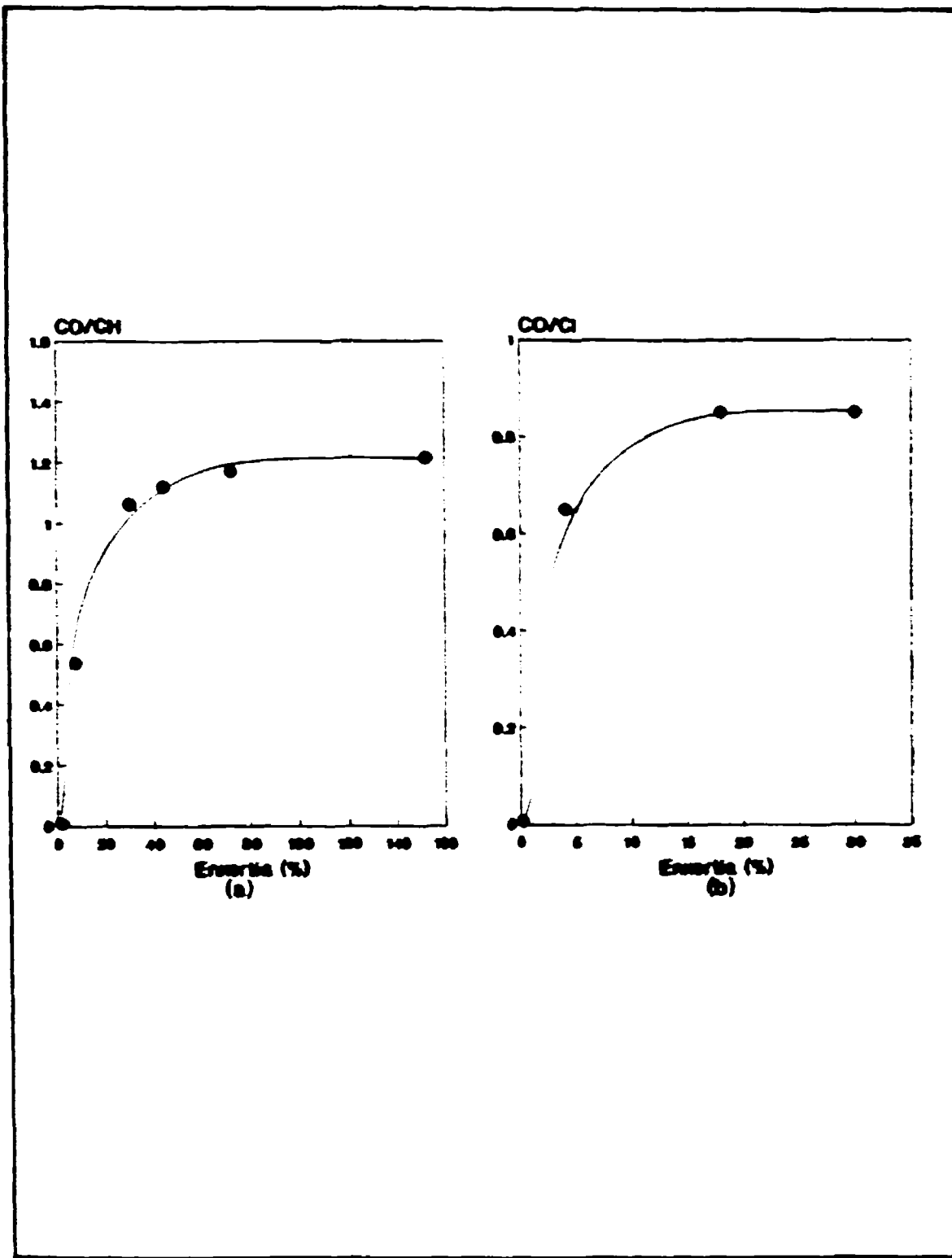


Fig. 26- Razão CO/CH e CO/Cl para os sistemas: (a) PEBD-g-AA e (b) PVC-g-AA obtidas a partir dos espectros FTIR-MIR.

Pode-se notar pelas duas figuras mencionadas que as razões C=O/C-F, C=O/C-H e C=O/C-Cl aumentam, tendendo a um nivelamento em um determinado percentual de enxertia. Isto poderia significar, que a distribuição das cadeias enxertadas nas superfícies poliméricas aumentam com o incremento do nível de enxertia. O patamar observado poderia ser interpretado como uma distribuição homogênea das cadeias de PDMAA e PAA a nível de superfície<sup>113</sup>.

O nivelamento do valor da razão entre os picos C=O/C-F, no sistema PETFE-g-DMAA (20% de enxertia), foi maior que no PTFE-g-DMAA (8% de enxertia), sugerindo que a distribuição das cadeias enxertadas de DMAA no PETFE é mais homogênea que no PTFE.

Um fato especial foi observado para o filme de PEBD. No sistema PEBD-g-DMAA foi observado uma saturação na razão entre os picos C=O/C-H (Figura 25) a um percentual de enxertia de 200%. Isto pode ser devido ao fato de que a enxertia do DMAA está ocorrendo também no interior da matriz polimérica. Tal fato foi comprovado pela observação de um grande aumento nas dimensões do filme de PEBD inicialmente utilizado no processo de enxertia, conforme foi representado na Figura 27.

Os filmes de PTFE e PETFE enxertados com o DMAA, via raios gama e elétrons acelerados, e o PVC enxertado com o AA ( $\gamma$  e  $e^-$ ) não tiveram suas dimensões alteradas.

A Figura 28 mostra a fotografia da variação dimensional do filme de PEBD, enxertado com o DMAA, via raios gama.

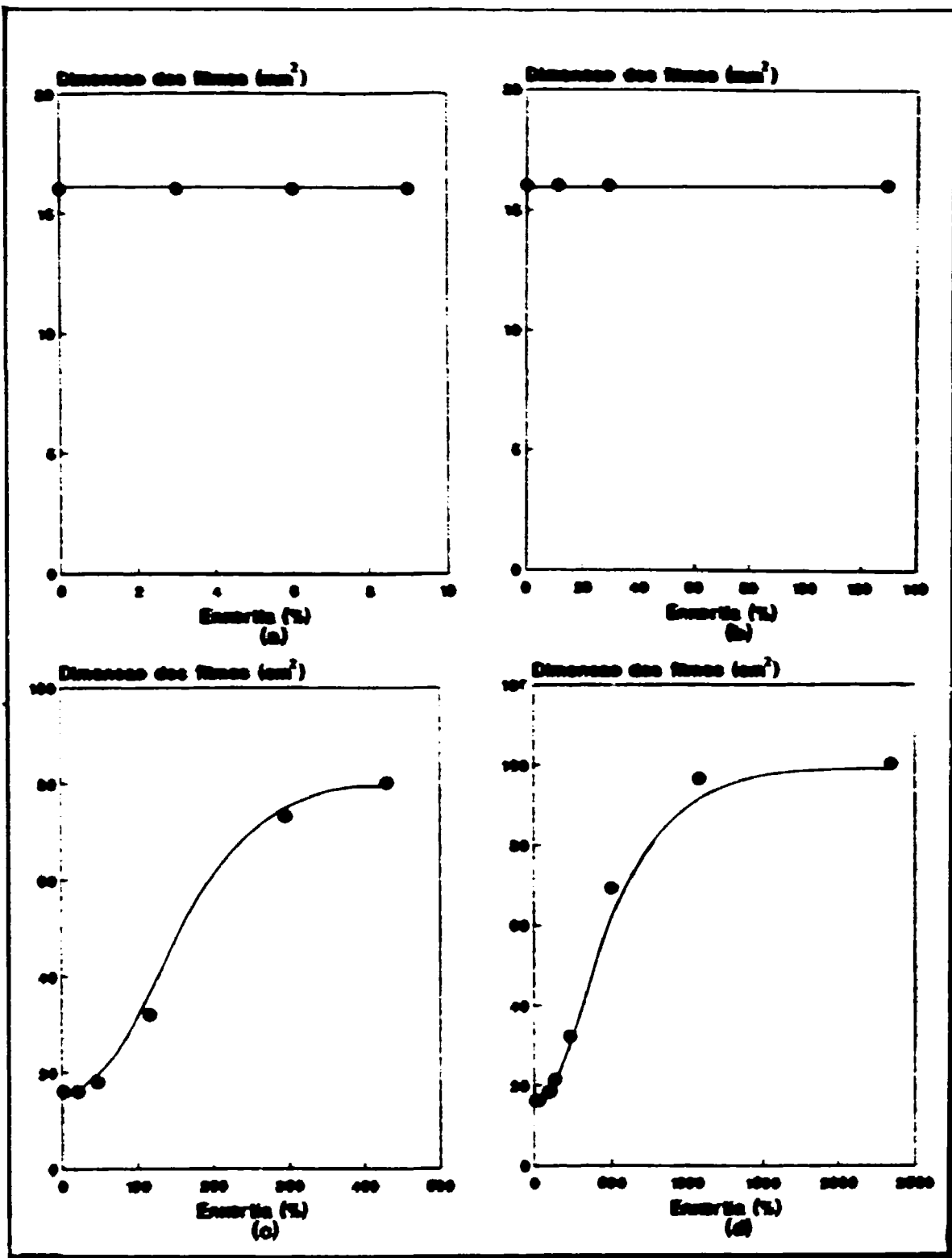


Fig. 27- Variação dimensional para os filmes de (a) PTFE-g-DMAA; (b) PETFE-g-DMAA; (c) PEBD-g-DMAA e (d) PEBD-g-AA.

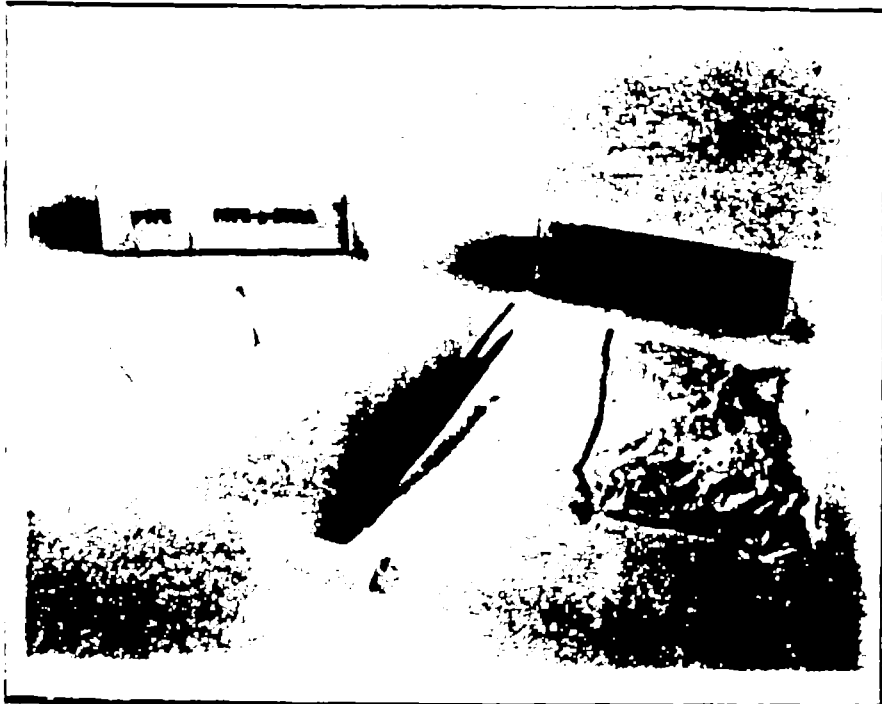


Fig. 28- Fotografia da variação dimensional do filme de PEBD antes e após enxerto com DMAA via raios gama.

Uma vez que a composição química de superfícies poliméricas pode influenciar grandemente a sua compatibilidade com o tecido sanguíneo<sup>114</sup>, foi utilizada a técnica de espectroscopia eletrônica para análise química (ESCA) na determinação da composição química dos polímeros e copolímeros de enxerto sintetizados.

As Figuras 29-31 mostram os picos de  $C_{1s}$ ,  $F_{1s}$ ,  $O_{1s}$  e  $N_{1s}$  para os filmes virgens de PTFE, PETFE, PEBD e seus copolímeros de enxerto, PTFE-g-DMAA, PETFE-g-DMAA e PE-g-DMAA.

A Figura 29 mostra espectro do  $C_{1s}$  para o PTFE. Nota-se que o filme não modificado apresentou dois picos, um a 285 eV e outro a 292 eV. Estes valores sugerem a presença de unidades  $-CH_2-$  (285 eV) e unidades  $-CF_2-$  (292 eV). Uma vez que se observou um pico correspondente ao  $O_{1s}$  (532 eV), presume-se que seja oriundo de alguma oxidação, ocorrida durante o processo industrial de fabricação do filme polimérico. Com o incremento do percentual de enxertia, observou-se um aumento na intensidade dos picos  $C_{1s}$  (285 eV),  $O_{1s}$  (532 eV) e  $N_{1s}$  (399 eV) na superfície do PTFE, característicos da PDMAA enxertada.

Para o PETFE (Figura 30), observou-se uma diminuição na intensidade do pico correspondente às unidades  $-CF_2-$  (292 eV) e um incremento no correspondente às unidades  $-CH_2-$  (285 eV), à medida que o percentual de enxertia do PDMAA aumentou. Tal fato sugere que as cadeias de PDMAA são enxertadas preferencialmente nas unidades  $-CF_2-$  do esqueleto polimérico. Este resultado foi comprovado pela diminuição na intensidade do pico a 688 eV ( $F_{1s}$ ).

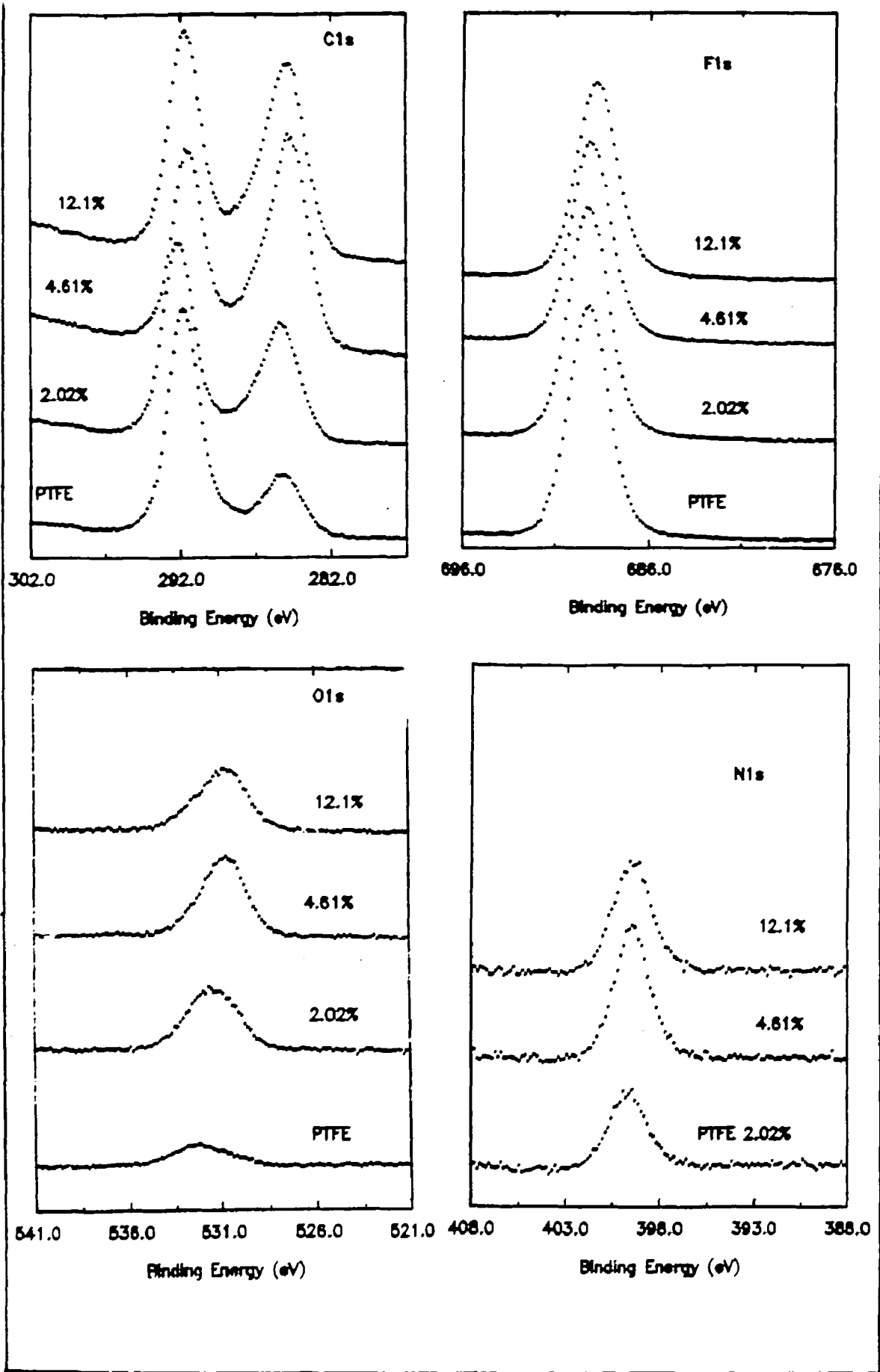


Fig. 29- Espectros  $C_{1s}$ ,  $F_{1s}$ ,  $O_{1s}$  e  $N_{1s}$  para os filmes de PTFE antes e após enxertia com o DMMA.

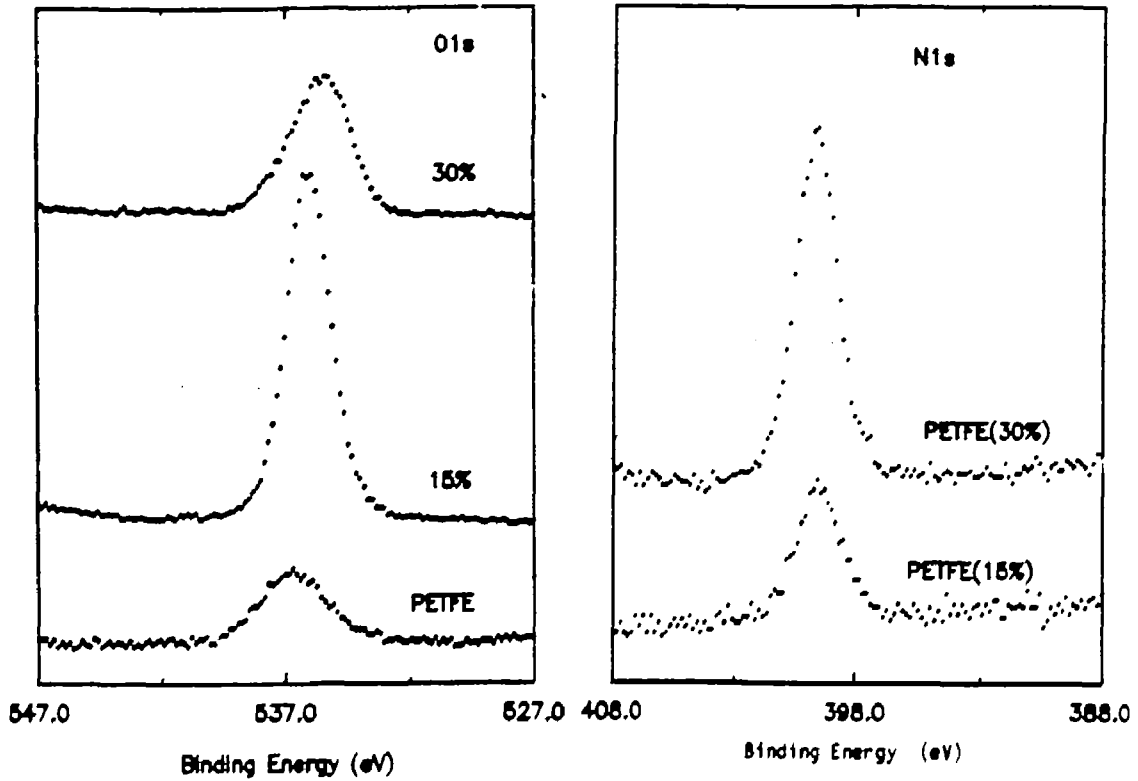
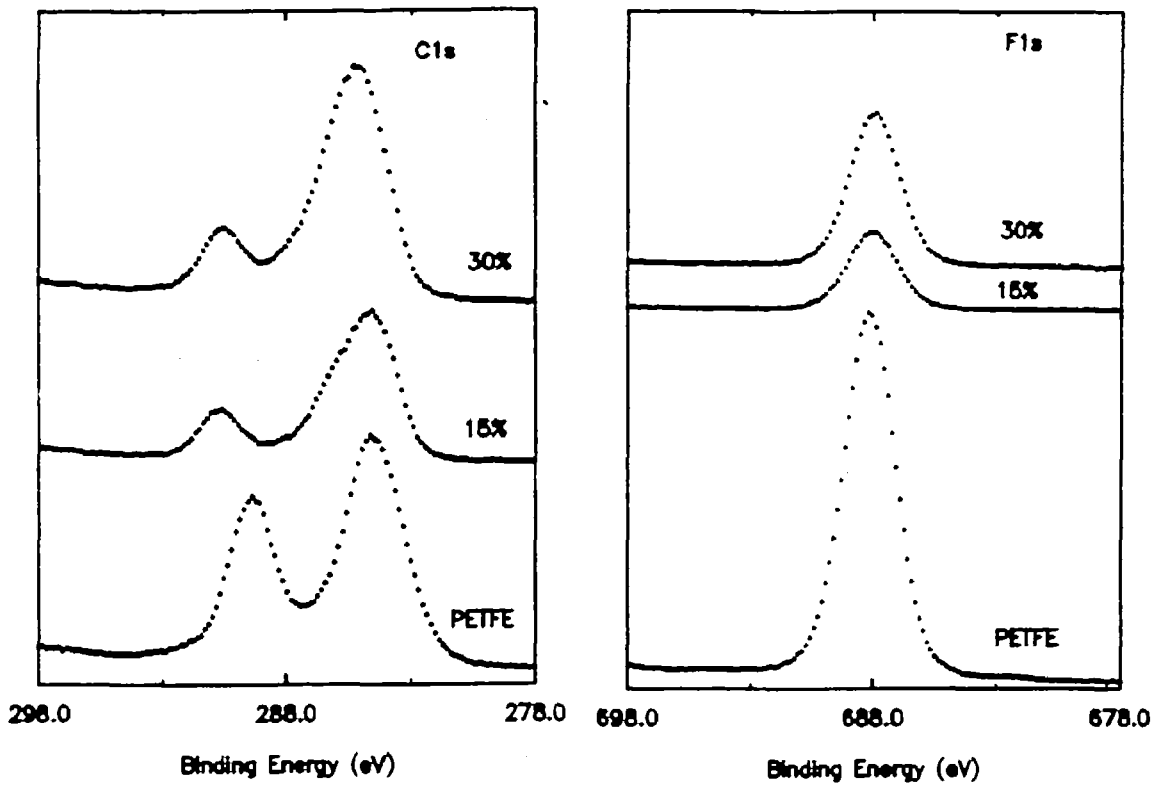


Fig. 30- Espectros  $C_{1s}$ ,  $F_{1s}$ ,  $O_{1s}$  e  $N_{1s}$  para os filmes de PETFE antes e após enxertia com o DMAA.

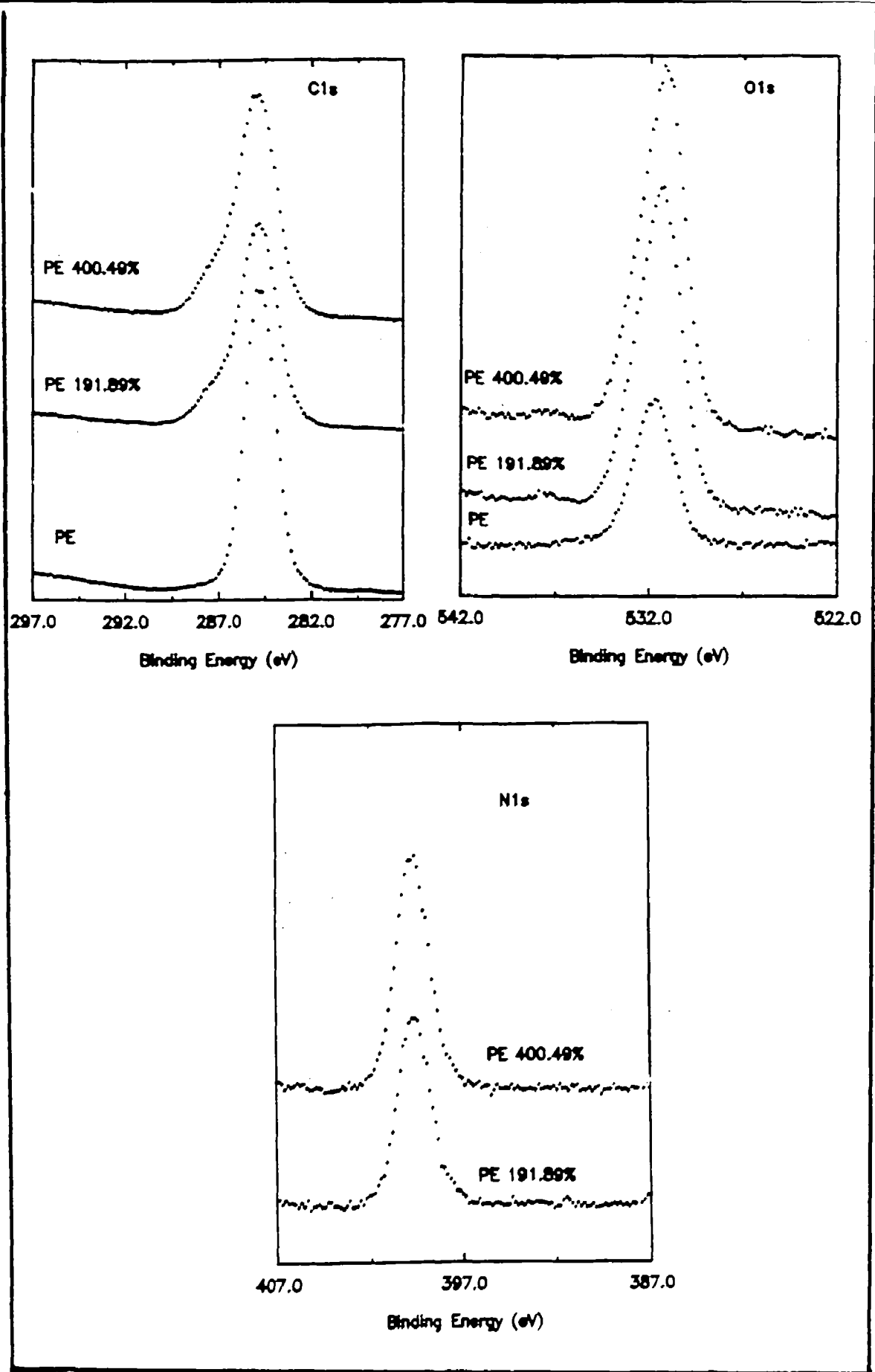


Fig. 31- Espectros C<sub>1s</sub>, O<sub>1s</sub> e N<sub>1s</sub> para os filmes de PEBD antes e após enxertia com o DMAA.



O filme de PEBD (Figura 31) mostrou um sinal de  $O_{1s}$  (532 eV) correspondente a  $>C=O$ , provavelmente devido também à oxidação do material durante o processo de fabricação. Com o aumento no percentual de enxertia do PDMAA, observou-se um incremento nas intensidades dos picos correspondentes ao  $O_{1s}$  (532 eV) e  $N_{1s}$  (399 eV).

Em uma melhor visualização, os resultados obtidos por ESCA nos polímeros PTFE, PETFE e PEBD e seus copolímeros de enxerto foram resumidos nas Tabelas 5 e 6 junto com as ligações químicas correspondentes<sup>115-116</sup>.

Verificou-se o aparecimento da ligação  $-CH_2$  (284,6 eV),  $>C=O$  (530,3-531,7 eV) e  $N_{1s}$  (399,7 eV) nos filmes de PTFE, PETFE e PEBD, características das cadeias de PDMAA enxertadas. Foi observado ainda o aparecimento de insaturações no PTFE do tipo  $-CF=CH-$ , resultantes do processo de enxertia e que não foram detectadas no infravermelho, provavelmente por estarem muito próximas da superfície. Para os filmes de PETFE e PEBD houve o aparecimento das ligações C-N (287,1-287,5 eV) e  $>C=O$  (531,7-532,1 eV), após a enxertia do DMAA.

Tabela 5- Composição da superfície determinada por ESCA dos filmes de PEBD, PETFE e PTFE não enxertados.

| Polímero | Estrutura                                                           | Energia de Ligação (eV)         | Ligação Química Correspondente |
|----------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| PEBD     | $-\text{[CH}_2\text{-CH}_2\text{]}_n\text{-}$                       | 284,6                           | $-\text{CH}_2\text{-}$         |
|          |                                                                     | 531,5 ( $\text{O}_{1s}$ )       | $>\text{C=O}$                  |
| PETFE    | $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{-CF}_2\text{CF}_2\text{]}_n\text{-}$ | 284,6                           | $-\text{CH}_2\text{-}$         |
|          |                                                                     | 286,0                           | $-\text{CF}_2\text{-}$         |
|          |                                                                     | 288,1                           | $-\text{CF=CH-}, >\text{C=O}$  |
|          |                                                                     | 290,7                           | $-\text{CF}_2\text{-}$         |
| PTFE     | $-\text{[CF}_2\text{-CF}_2\text{]}_n\text{-}$                       | 284,6                           | $-\text{CH}_2\text{-}$         |
|          |                                                                     | 286,4                           | $-\text{CF}_2\text{-}$         |
|          |                                                                     | 288,8                           | $-\text{CF=CH-}$               |
|          |                                                                     | 291,5                           | $-\text{CF}_2\text{-}$         |
|          |                                                                     | 530,7/531,7 ( $\text{O}_{1s}$ ) | $>\text{C=O}$                  |
|          |                                                                     | 688,9                           | $\text{F}_{1s}$                |

Tabela 6- Composição da superfície determinada por ESCA dos copolímeros de enxerto PE-g-DMAA, PETFE-g-DMAA e PTFE-g-DMAA.

| Copolímero   | Estrutura                                                                          | Energia de Ligação (eV)   | Ligação Química Correspondente |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| PEBD-g-DMAA  | $-\text{CH}_2 - \underset{ }{\text{CH}} -$                                         | 284,6                     | $-\text{CH} -$                 |
|              | $[\text{CH}_2 - \underset{ }{\text{CH}}]_{n-1}$                                    | 287,1                     | $-\text{C}-\text{N}$           |
|              | $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$                                                        | 530,7                     |                                |
|              |                                                                                    | 531,7 ( $\text{O}_{1s}$ ) | $>\text{C}=\text{O}$           |
|              |                                                                                    | 688,9                     | $\text{F}_{1s}$                |
| PETFE-g-DMAA | $-\text{CH}_2 - \underset{ }{\text{CH}} - \text{CF}_2 - \underset{ }{\text{CF}} -$ | 284,6                     | $-\text{CH}_2 -$               |
|              | $\text{CH}_2$                                                                      | 286,0                     | $-\text{CF}_2 -$               |
|              | $\text{CH}_2$                                                                      |                           |                                |
|              | $\text{CH}_2$                                                                      | 287,5/399,6               | $\text{C}-\text{N}-$           |
|              | $\text{C}=\text{O}$                                                                | 290,8                     | $-\text{CF}_2 -$               |
|              | $\text{N}(\text{CH}_3)_2$                                                          | 532,1 ( $\text{O}_{1s}$ ) | $>\text{C}=\text{O}$           |
|              | 688,1                                                                              | ( $\text{F}_{1s}$ )       |                                |
| PTFE-g-DMAA  | $-\text{CF}_2 - \underset{ }{\text{CF}} -$                                         | 284,6                     | $-\text{CH}_2 -$               |
|              | $[\text{CH}_2 - \underset{ }{\text{CH}}]_{n-1}$                                    | 286,4                     | $-\text{CF}_2 -$               |
|              | $\text{C}=\text{O}$                                                                | 288,8                     | $-\text{CF}=\text{CH}-$        |
|              | $\text{N}(\text{CH}_3)_2$                                                          | 291,7                     | $-\text{CF}_2 -$               |
|              |                                                                                    | 530,3/531,7               | $>\text{C}=\text{O}$           |
|              |                                                                                    | 399,7                     | $\text{N}_{1s}$                |
|              | 688,5                                                                              | $\text{F}_{1s}$           |                                |

Segundo Battaerd a caracterização de copolímeros de enxerto por infravermelho pode levar a erros, uma vez que não existem diferenças significativas entre o espectro IR dos copolímeros de enxerto e os das blendas poliméricas<sup>117</sup>.

Informações quantitativas foram então obtidas nos espectros do ESCA para o PEBD e PEBD-g-DMAA, calculando-se a razão entre as intensidades CN/CH, levando-se em consideração a área de cada pico. Para o PETFE/PETFE-g-DMAA e PTFE/PTFE-g-DMAA foram calculadas as razões C=O/C-F.

Os resultados obtidos foram representados na Figura 32, mostrando que as razões C=O/CF e CN/CH aumentaram com o percentual de enxertia e foram concordantes com os espectros FTIR-MIR.

Observou-se um nivelamento a um percentual de enxertia maior para o PETFE (15%), do que para o PTFE (5%), indicando a maior homogeneidade das cadeias de PDMAA enxertadas na superfície do PETFE.

Para o PE observou-se um nivelamento na razão entre as intensidades dos picos CN/CH a 192%, que aliado à variação dimensional do filme sugere uma enxertia também no interior da matriz polimérica.

Os resultados dos estudos espectroscópicos comprovaram a distribuição das cadeias enxertadas de PDMAA e PAA nos copolímeros obtidos por radiação.

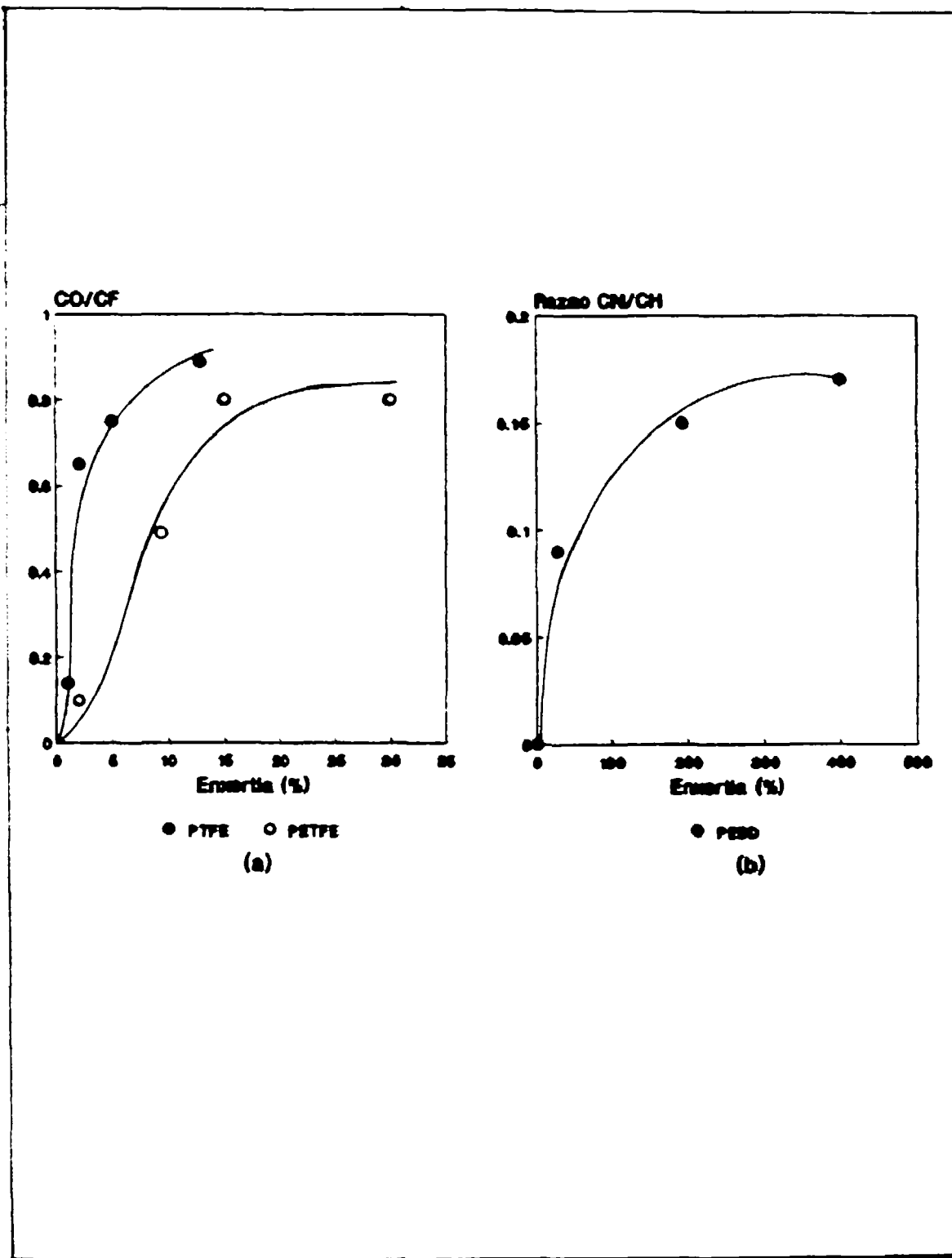


Fig. 32- (a) Razão CO/CF para os sistemas PTFE-g-DMAA, PETFE-g-DMAA e (b) CN/CH para o PEBD-g-DMAA obtidos a partir do ESCA.

#### 4.2.3- Análise Térmica

Sabe-se que a enxertia induzida pela radiação ionizante tem início nas regiões amorfas da matriz polimérica e progride para as regiões cristalinas, alterando conseqüentemente o grau de cristalinidade do material<sup>103</sup>.

Uma variação na cristalinidade de um polímero com o processo de enxertia é indicativo de alterações morfológicas do material e indica uma possível enxertia no interior da matriz polimérica.

A Figura 33 mostra a variação na cristalinidade relativa dos filmes com o processo de enxertia dos monômeros DMAA.

Foi observado uma diminuição na cristalinidade relativa dos filmes de PTFE e PEBD com o aumento no percentual de enxertia do DMAA (Figura 33), sugerindo que a enxertia ocorreu da fase amorfa para as regiões cristalinas dos polímeros.

Nas condições experimentais estudadas, não foi observado mudanças na cristalinidade relativa do PTFE (Figura 33-a). Tal fato deve-se possivelmente à alta cristalinidade do PTFE que pode ter impedido a difusão da solução monômero/solvente na matriz, justificando assim os baixos níveis de enxertia atingidos para este substrato polimérico, que foi de 12% no máximo. Esse resultado deveria ser o esperado, uma vez que a enxertia começa destruindo as regiões amorfas, progredindo em seguida para as regiões cristalinas da matriz polimérica, conforme a difusão da solução monômero/solvente<sup>103</sup>.

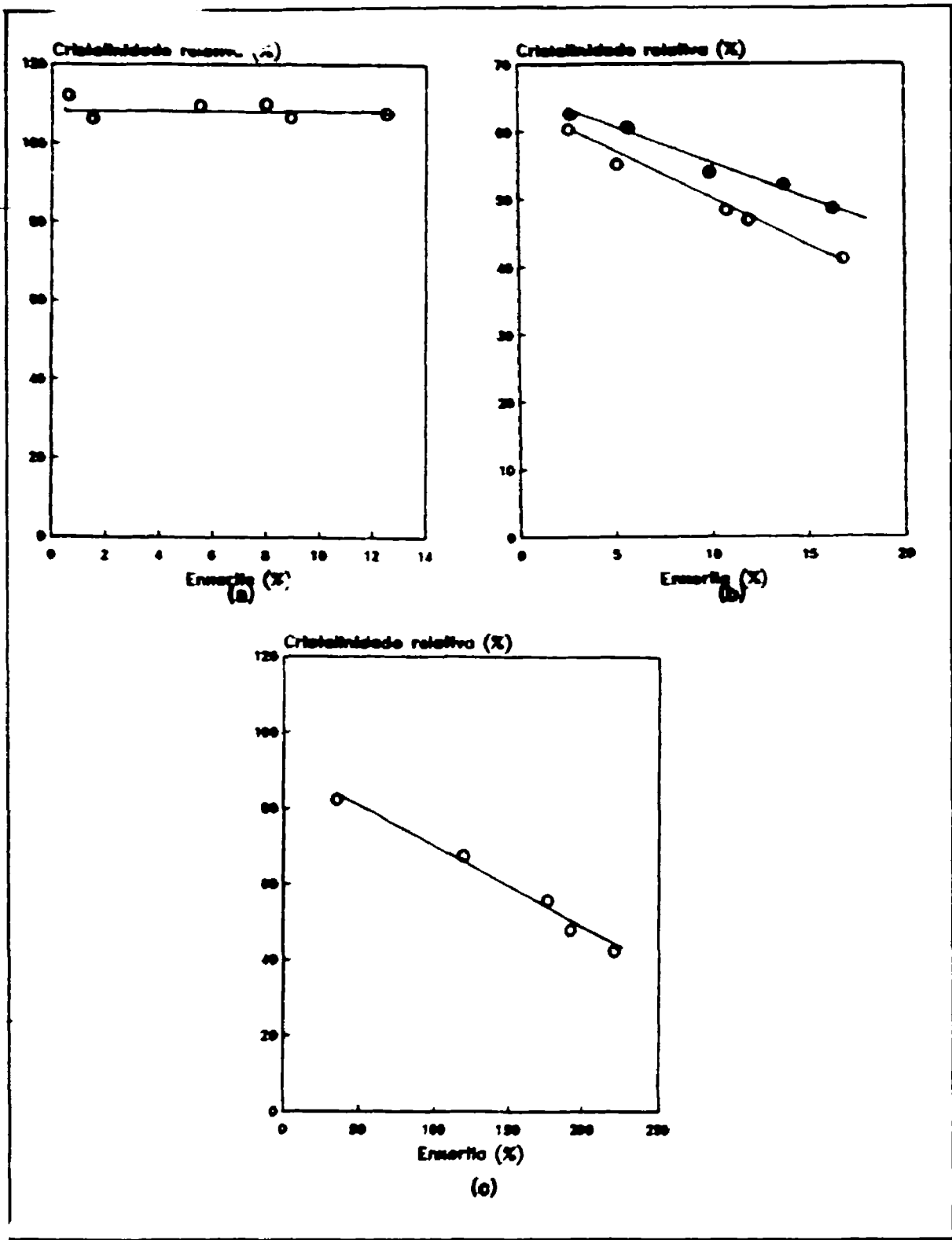


Fig. 33- Variação no grau de cristalinidade de acordo com o percentual de enxertia do DMAA sobre: (a) PTFE, (b) PETPE (o) raios gama e (e) elétrons (c) PEBD.

A enxertia de monómeros hidrofílicos pode alterar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos substratos poliméricos, devido à introdução de grupamentos com uma maior "flexibilidade" na cadeia do polímero inicial.

Um parâmetro importante que determina certas propriedades das superfícies poliméricas é a tensão crítica de superfície ( $\gamma_c$ ).

Estudos realizados por Hayes<sup>118</sup> e Lee<sup>119</sup> permitiram relacionar a tensão crítica de superfície ( $\gamma_c$ ) e a temperatura de transição vítrea de um polímero por:

$$\gamma_c^{0,86} = (0,03RT_g - 1,5) (n\phi^2 \cdot V_n^{-0,71})$$

onde  $n$  é o grau de liberdade;  $V_n$ , volume molar e  $\phi$ , parâmetro de interação.

Embora possua algumas limitações<sup>119</sup>, esta equação foi utilizada para calcular a tensão crítica de superfície ( $\gamma_c$ ) dos sistemas PTFE-g-DMAA, PETFE-g-DMAA, PEBD-g-DMAA, PEBD-g-AA e PVC-g-AA.

A Figura 34 mostra as curvas obtidas para a  $\gamma_c$ , calculada segundo a equação de Hayes<sup>118</sup> para os sistemas correspondentes ao DMAA e AA. Pode-se observar, que a tensão crítica de superfície e também a  $T_g$  diminuem com o aumento no percentual de enxertia do DMAA sobre o PTFE e PETFE, permanecendo praticamente constante para o PEBD. Na utilização do monómero AA, observou-se um aumento da  $\gamma_c$  com a enxertia sobre o PEBD. O PVC não teve sua tensão crítica de superfície alterada com a enxertia do monómero AA.



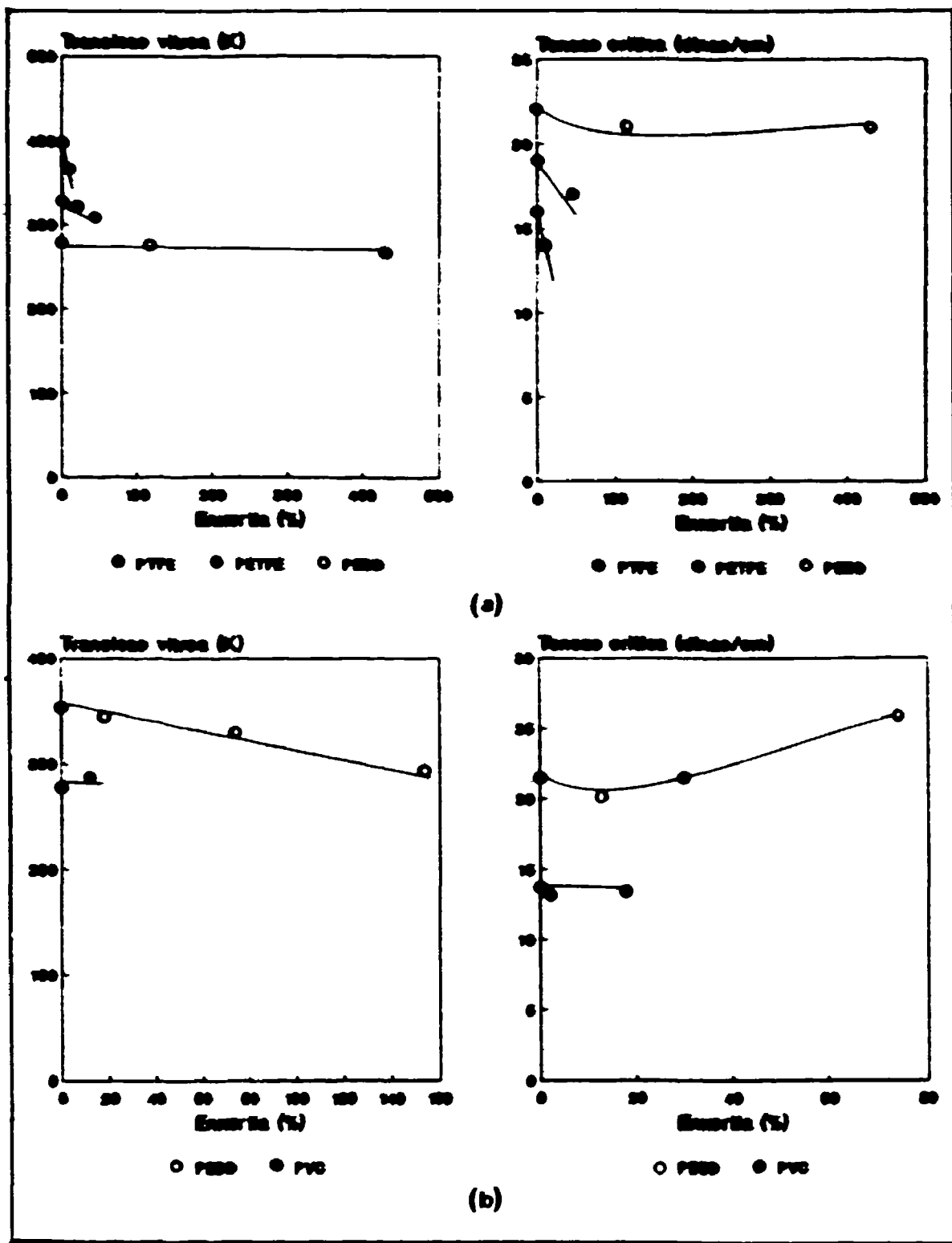


Fig. 34- Temperatura de transição vítrea (Tg) e tensão crítica de superfície para os copolímeros de enxerto derivados do (a) MMA e (b) AA.

Bayer <sup>120</sup> demonstrou a importância da tensão crítica de superfície,  $\gamma_c$ , no estudo da trombogenicidade de superfícies sintéticas. Um material de alta tensão crítica de superfície ao ser colocado em contato com o sangue poderá ser trombogênico e por outro lado, um material de baixa tensão crítica de superfície possuiria propriedades hemocompatíveis.

#### 4.2.4- Análise topográfica por MEV

As superfícies poliméricas após o processo de enxertia foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme mostram as Figuras 35-37.

Observa-se que a rugosidade na superfície da matriz de PTFE e PETFE é bastante aumentada, após o processo de enxertia do DMAA (Figura 35 e 36). Acredita-se que o aparecimento destas rugosidades seja devido a efeitos de tensão superficial surgido com o processo de enxertia. O mesmo efeito foi observado para os copolímeros de enxerto PVC-g-AA (Figura 37).

As superfícies do sistema PEBD-g-DMAA e PEBD-g-AA não apresentaram mudanças na sua topografia.

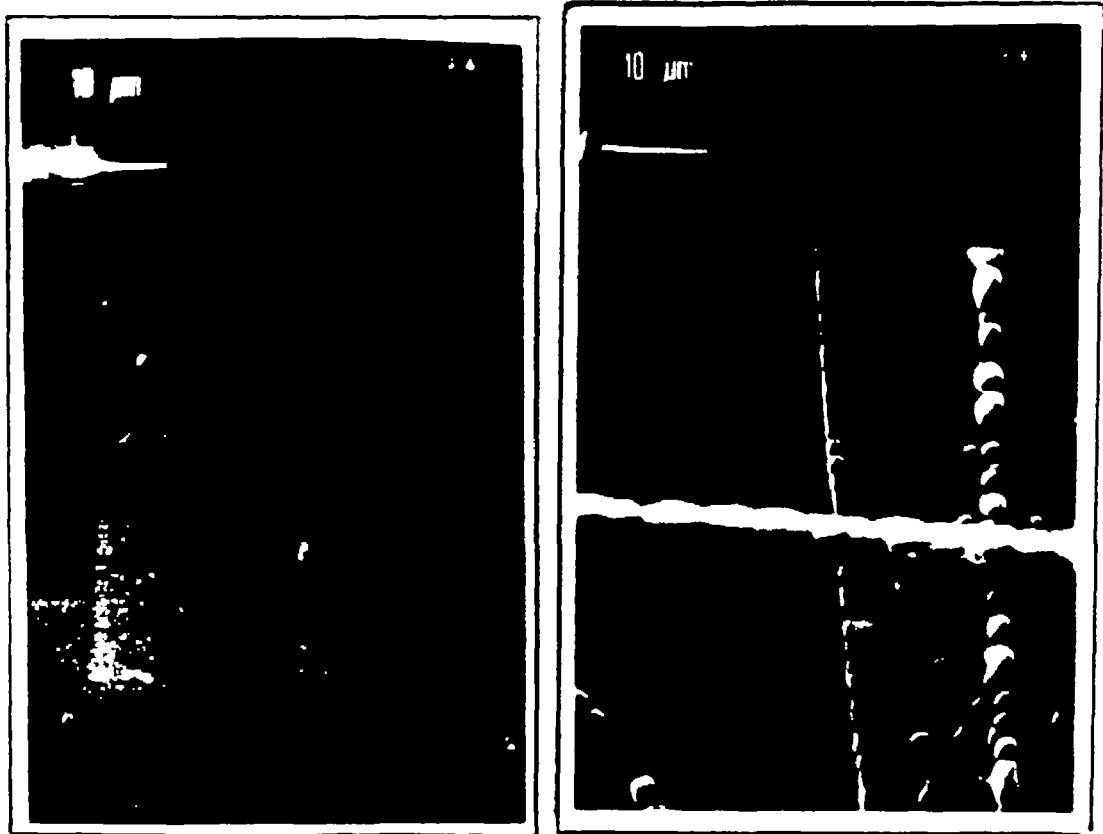


(a)



(b)

Fig. 35- Micrografia no MEV mostrando: (a) PTFE não modificado (aumento: 1000 X) e (b) PTFE-g-DMAA (g: 12%-aumento: 1000X).



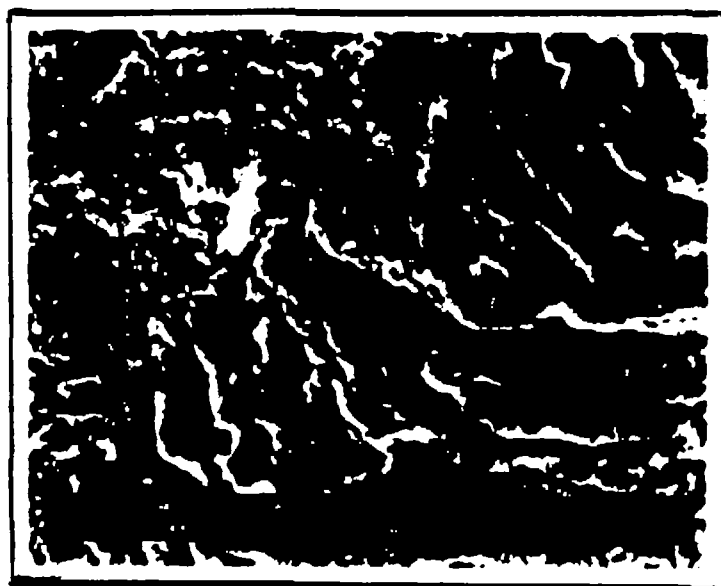
(a)

(b)

Fig. 36- Micrografia no MEV mostrando: (a) PETFE não modificado (aumento: 1000 X) e (b) PETFE-g-DMAA (g: 9%-aumento: 1000X).



(a)



(b)

Fig. 37- Micrografia no MEV mostrando: (a) PVC não modificado (aumento: 1000 X) e PVC-g-AA (g: 40%-aumento: 744X).

#### 4.3- AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE DOS COPOLÍMEROS DE ENXERTO

##### 4.3.1- Adsorção de proteínas séricas

As interações entre os biomateriais e o meio biológico compreendem uma série de eventos complexos. O primeiro evento observável no contato de uma superfície não fisiológica com o sangue é a adsorção protéica, que pode influenciar os demais eventos, como adesão plaquetária e a formação de trombos.

Diversos estudos realizados demonstraram que os copolímeros de enxerto, formados por segmentos hidrofílicos apresentam com frequência comportamentos hemocompatíveis<sup>61,121</sup>. Lyman e outros observaram que os copolímeros de poli(éter-uretano-uréia) adsorvem mais albumina e menos fibrinogênio que outros polímeros e relacionar as propriedades antitrombogênicas com a presença da albumina<sup>122</sup>.

Okano e colaboradores<sup>61,121</sup>, utilizando diversos copolímeros de bloco de metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA), observaram que a estrutura de microfases separadas, especialmente estruturas lamelares ou esféricas de segmentos hidrofílicos, imersas em regiões hidrofóbicas, possuem propriedades antitrombogênicas, apresentando os domínios hidrofílicos maior afinidade pela albumina do que pelo fibrinogênio e pela  $\gamma$ -globulina, enquanto que os domínios hidrofóbicos tem comportamento oposto.

As Figuras 38 e 39 mostraram a adsorção de proteínas séricas sobre as superfícies não enxertadas e enxertadas. A enxertia do DMAA sobre as matrizes poliméricas de PTFE, PETFE e PEBD aumentaram a adsorção de albumina (Figura 38) e diminuíram a adsorção de fibrinogênio e  $\gamma$ -globulina (Figura 39), à medida que se aumentou o percentual de enxertia do DMAA nas superfícies poliméricas.

A enxertia do AA sobre o PEBD e o PVC levaram a um aumento de adsorção tanto de albumina quanto de fibrinogênio, em relação aos filmes originais (Figura 40).

A enxertia dos monômeros hidrofílicos DMAA e AA sobre as matrizes poliméricas deveria levar a um aumento na adsorção de albumina e possivelmente a uma diminuição de adsorção de fibrinogênio e  $\gamma$ -globulina, segundo os trabalhos de Okano <sup>61</sup>. Este comportamento só foi verificado na copolimerização com DMAA. A adsorção de fibrinogênio para os copolímeros de enxerto de AA, relativamente aos polímeros não modificados mostrou um comportamento inverso ao DMAA, predizendo uma possível trombogenicidade.

A adsorção de fibrinogênio tem grande importância no fenômeno da hemocompatibilidade dos materiais poliméricos, uma vez que, por ser um dos fatores da coagulação, facilita a adesão de plaquetas, participando de reações de troca com outras proteínas, importantes no mecanismo de coagulação sanguínea <sup>122,123</sup>.

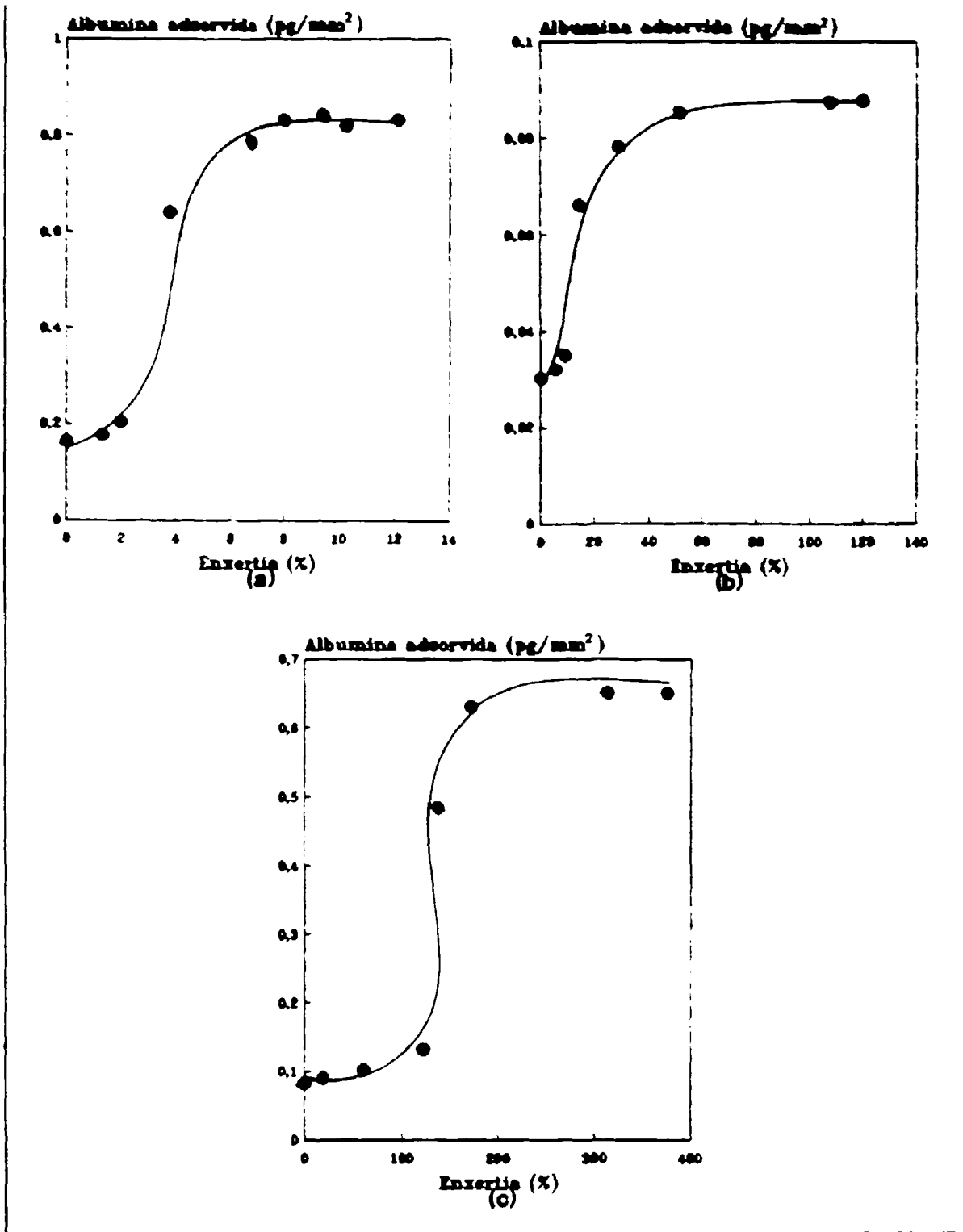


Fig. 38- Adsorção de BSA pelos copolímeros de enxerto: (a) PTFE-g-DMAA, (b) PETFE-g-DMAA e (c) PEED-g-DMAA.



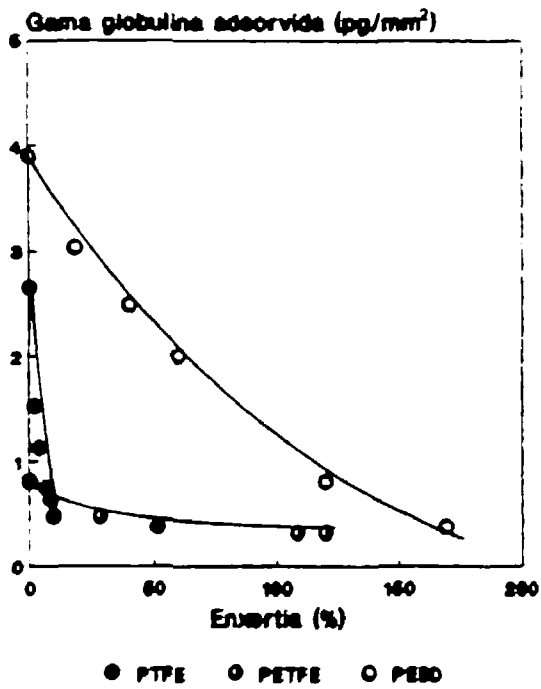
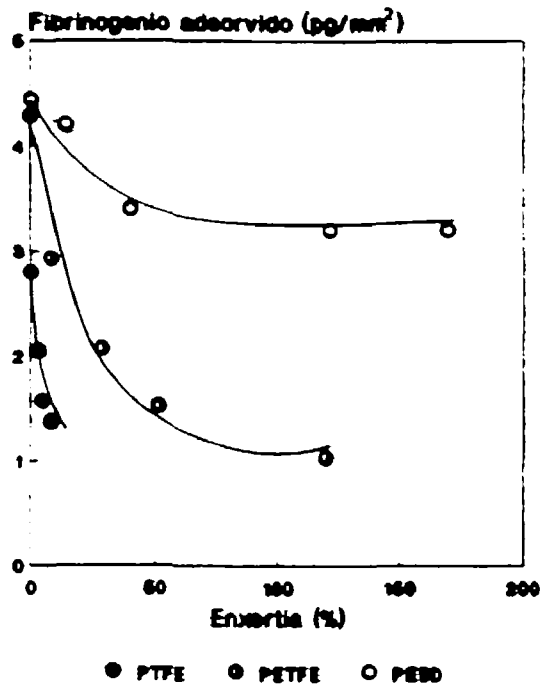
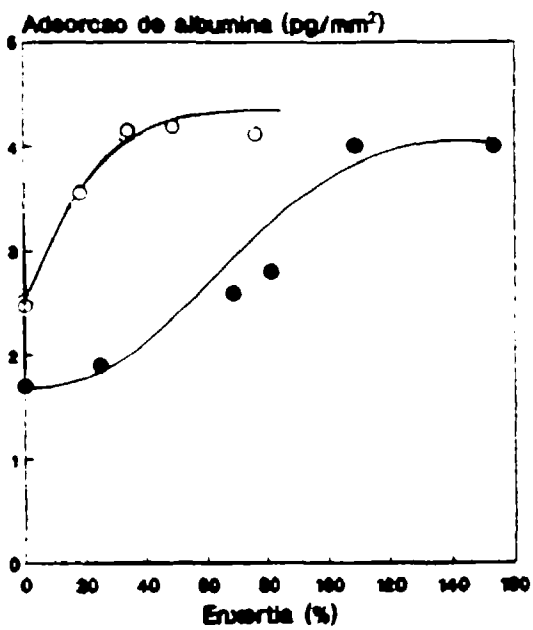
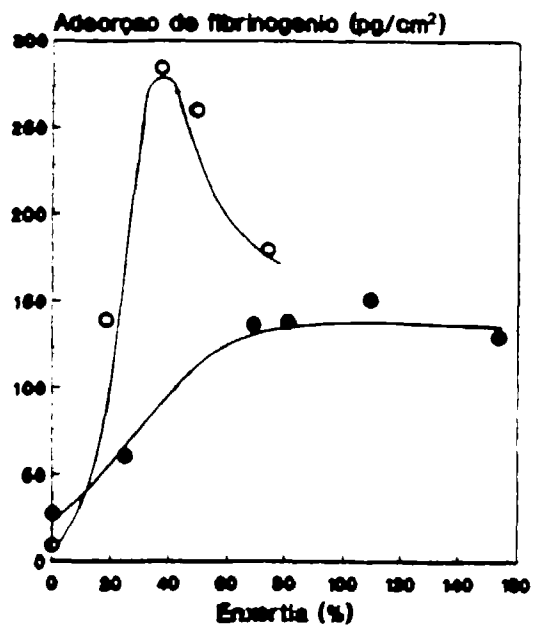


Fig. 39- Adsorção de fibrinogênio e gama globulina sobre os copolímeros de enxerto derivados do DMAA.



○ PVC ● PEBD

(a)



○ PVC ● PEBD

(b)

Fig. 40- Adsorção de albumina (a) e (b) fibrinogênio nos copolímeros de enxerto PEBD-g-AA e PVC-g-AA.

#### 4.3.2- Adesão de plaquetas

Uma vez que a membrana plaquetária é composta de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, representadas por regiões protéicas e lipídicas<sup>124</sup>, respectivamente, um polímero sintético com esta alternância de regiões poderia vir a ter propriedades hemocompatíveis<sup>61,121,122</sup>. Num primeiro estágio, após o contato com o fluido biológico, a camada protéica formada inicialmente permitiria a acomodação da plaqueta na superfície sintética, sem alterações morfológicas de sua estrutura, o que impediria a ativação da cascata de coagulação<sup>122</sup>.

Portanto, a diminuição na adsorção de fibrinogênio e  $\gamma$ -globulina em relação ao BSA nos copolímeros de enxerto PTFE-g-DMAA, PETFE-g-DMAA e PEBD-g-DMAA sugere que, se estes materiais forem colocados em contato com o sangue, o número de plaquetas aderidas deve ser bem menor, em relação aos materiais originais, segundo Neumann<sup>125</sup>.

As superfícies modificadas apresentaram poucas plaquetas aderidas, em comparação aos polímeros iniciais, como pode ser observado nas micrografias do MEV (Figuras 41-43). Um número maior de plaquetas do sangue aderiram às superfícies não enxertadas do que nas enxertadas, evidenciando uma tendência bastante significativa destas a um comportamento hemocompatível.

As superfícies rugosas dos copolímeros de enxerto PTFE-g-DMAA poderiam dificultar a identificação das plaquetas, uma vez que estas são muito pequenas, quando comparadas às rugosidades do copolímero (possuem cerca de: 3  $\mu$ m de diâmetro)<sup>59</sup>. Pode-se também investigar o processo de adesão plaquetária, utilizando-se a epi-fluorescência ao lado das micrografias no MEV.



(a)



(b)

Fig. 41- Micrografia no MEV das superfícies após o ensaio de adesão de plaquetas: (a) PTFE não modificado (aumento: 500X) e (b) PTFE-g-DMAA (g: 12% - aumento: 500X).

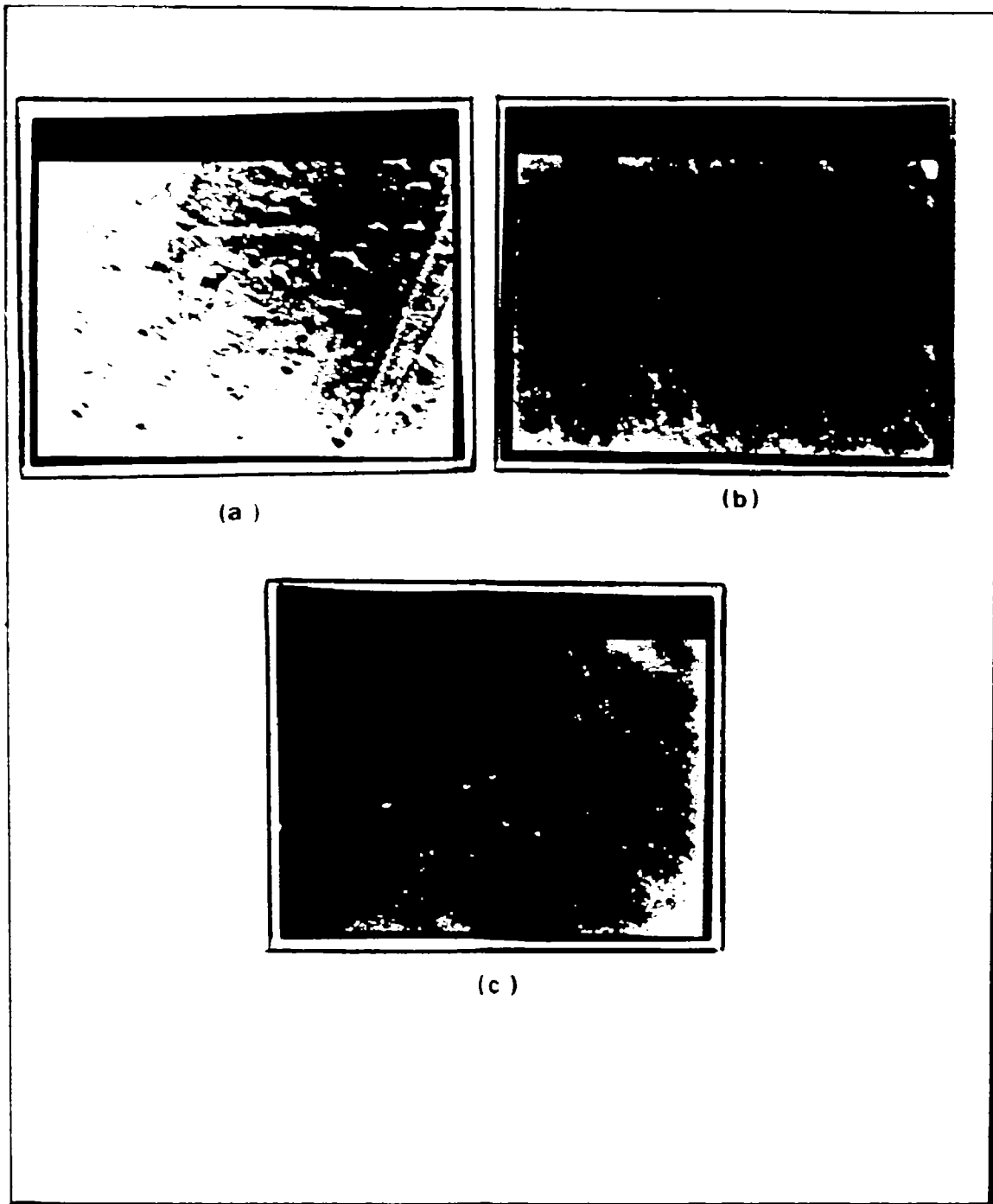
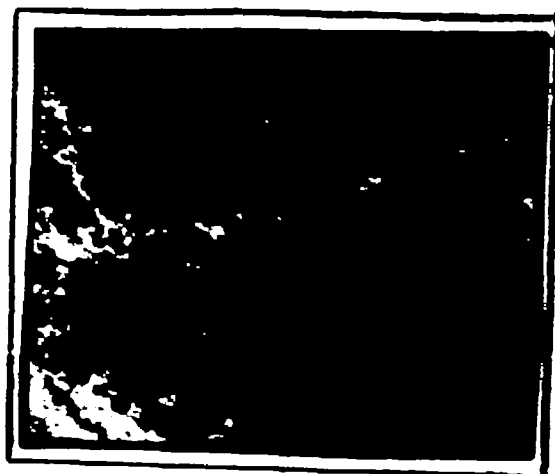


Fig. 42- Micrografia no MEV das superfícies após o ensaio de adesão de plaquetas. (a) PETFE não modificado (aumento: 1000X); (b) PETFE-g-DMAA (g: 19%-aumento 1030 X) e (c) PETFE-g-DMAA (g: 40%-aumento: 1000X).



(a)



(b)

Fig. 43- Micrografia no MEV das superfícies após o ensaio de adesão de plaquetas: (a) PEBD não modificado (aumento: 1000 X); (b) PEBD-g-DMAA (g: 19%-aumento: 1000X).

A Figura 44 mostra a micrografia de fluorescência para a superfície rugosa de PTFE-g-DMAA com nível de enxertia de 7%. A análise das plaquetas aderidas foi concordante com a micrografia no MEV.

O princípio da técnica de epi-fluorescência baseia-se na incorporação de alaranjado de acridina ao DNA mitocondrial. A localização das plaquetas é feita então por excitação do corante com luz UV<sup>126</sup>.

Os dados apresentados na Tabela 7 obtidos a partir de micrografias no microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostram que o número de plaquetas aderidas é maior nas superfícies não enxertadas que nos respectivos copolímeros de enxerto. Semelhantemente ao silicone grau médico, as superfícies modificadas apresentaram bons indícios de antitrombogenicidade em relação aos polímeros iniciais.

Pode-se observar que os níveis maiores de enxertia acusam uma maior adesão plaquetária, chegando no caso do PEBD-g-DMAA (g: 170%) à formação de coágulo.

Por outro lado, os copolímeros de enxerto PTFE-g-DMAA e PETFE-g-DMAA com menores níveis de enxertia apresentaram baixa adesão de plaquetas.

Isto sugere que existe um nível ideal de enxertia para uma adesão plaquetária mínima nas superfícies enxertadas, se bem que o comportamento trombogênico inicial do substrato virgem foi melhorado. Parece razoável a proposta de Okano<sup>61,121</sup>, uma vez que as superfícies de PEBD não apresentaram uma diminuição na adsorção de fibrinogênio em níveis elevados de enxertia (acima de 50% para o PEBD-g-DMAA), conforme é mostrado na Figura 39 (a). Isto propiciaria altas adesões de plaquetas.



Fig. 44- Micrografia de epi-fluorescência de PTFE-g-DMAA (g:12%) após ensaio de adesão de plaquetas. Aumento: 100X.



A enxertia do AA não levou à obtenção de superfícies hemocompatíveis como pode-se observar na Tabela 7. Este intento só foi conseguido após imobilização do BSA.

#### 4.3.3- Formação de trombos

A formação de trombos é um processo indesejável, resultante da rápida deposição protéica (preferencialmente, o fibrinogênio), seguido de uma série de reações complexas, envolvendo ativação e adesão plaquetária, liberação dos fatores da coagulação e deposição de leucócitos e hemácias. O resultado final deste processo é a formação de trombos na superfície polimérica. Este trombos, composto de fibrina e plaquetas agrupadas, podem causar danos no sistema circulatório, como por exemplo a obstrução de capilares e arteríolas<sup>127</sup>.

A Figura 45 mostra ilustrativamente a micrografia da superfície do poli(cis-isopreno-g-ácido acrílico) (NR-g-AA), obtida em nosso laboratório com características trombogênicas. Observa-se nesta micrografia uma grande quantidade de fibrina e hemácias, após o desencadeamento do mecanismo de coagulação, que dá origem ao coágulo na superfície do copolímero.

A Figura 46 mostra as curvas que representam a cinética da formação de trombos nas superfícies dos copolímeros de enxerto, derivados do DMAA.

Tab. 7- Avaliação da hemocompatibilidade dos copolímeros de enxerto derivados do DMAA e AA obtidos via raios gama e elétrons acelerados.

| Filme                  | Radiação   | E (%) | Número de Plaquetas aderidas | Resíduo de Fibrina |
|------------------------|------------|-------|------------------------------|--------------------|
| PTFE                   |            | 0     | 20 ± 5                       | pouco              |
| PTFE-g-DMAA            | raios gama | 5     | 0                            | nenhum             |
| PTFE-g-DMAA            | raios gama | 9     | 8 ± 1                        | nenhum             |
| PTFE-g-DMAA            | raios gama | 12    | 10 ± 3                       | nenhum             |
| PETFE                  |            | 0     | 95 ± 8                       | muito              |
| PETFE-g-DMAA           | raios gama | 29    | 19 ± 6                       | nenhum             |
| PETFE-g-DMAA           | raios gama | 52    | 30 ± 4                       | nenhum             |
| PETFE-g-DMAA           | raios gama | 120   | 50 ± 8                       | pouco              |
| PETFE-g-DMAA           | elétrons   | 20    | 15 ± 5                       | nenhum             |
| PETFE-g-DMAA           | elétrons   | 80    | 20 ± 2                       | nenhum             |
| PEBD                   |            | 0     | coágulo                      | muito              |
| PEBD-g-DMAA            | raios gama | 19    | 10 ± 3                       | pouco              |
| PEBD-g-DMAA            | raios gama | 40    | 36 ± 8                       | pouco              |
| PEBD-g-DMAA            | raios gama | 170   | coágulo                      | muito              |
| PEBD-g-AA              | raios gama | 95    | coágulo                      | muito              |
| PEBD-g-AA*             | raios gama | 80    | 30 ± 8                       | nenhum             |
| PEBD-g-AA*             | elétrons   | 48    | 20 ± 7                       | nenhum             |
| PVC                    | raios gama | 0     | coágulo                      | muito              |
| PVC-g-AA               | raios gama | 40    | coágulo                      | muito              |
| PVC-g-AA*              | elétrons   | 47    | 10 ± 2                       | nenhum             |
| Silicone grau médico** |            |       | 25 ± 3                       | nenhum             |

\* Após o processo de imobilização do BSA. \*\* Fornecido pelo INCOR.

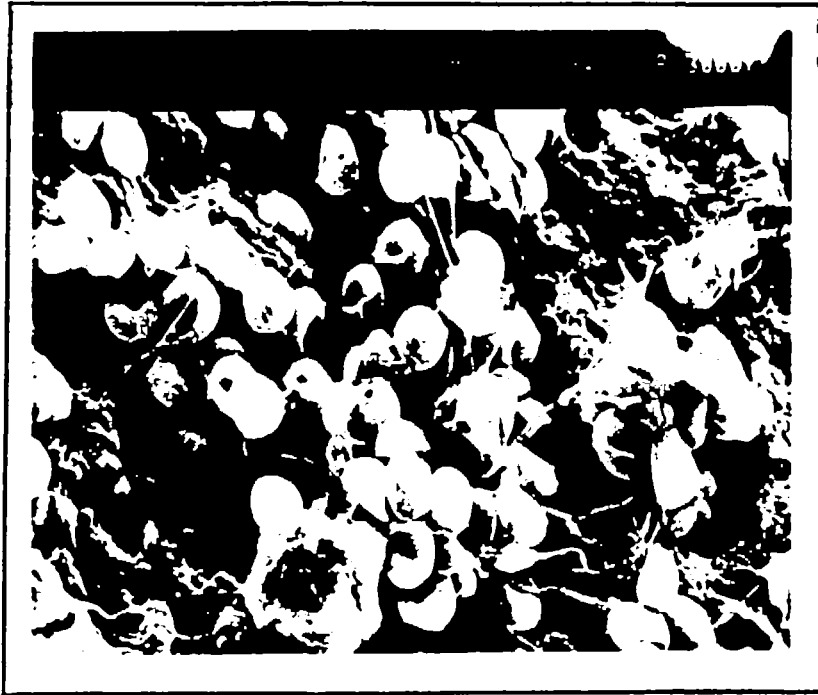


Fig. 45- Micrografia no MEV da superfície de NR-g-AA (9:400%) após ensaio de adesão de plaquetas. Aumento: 1760X.

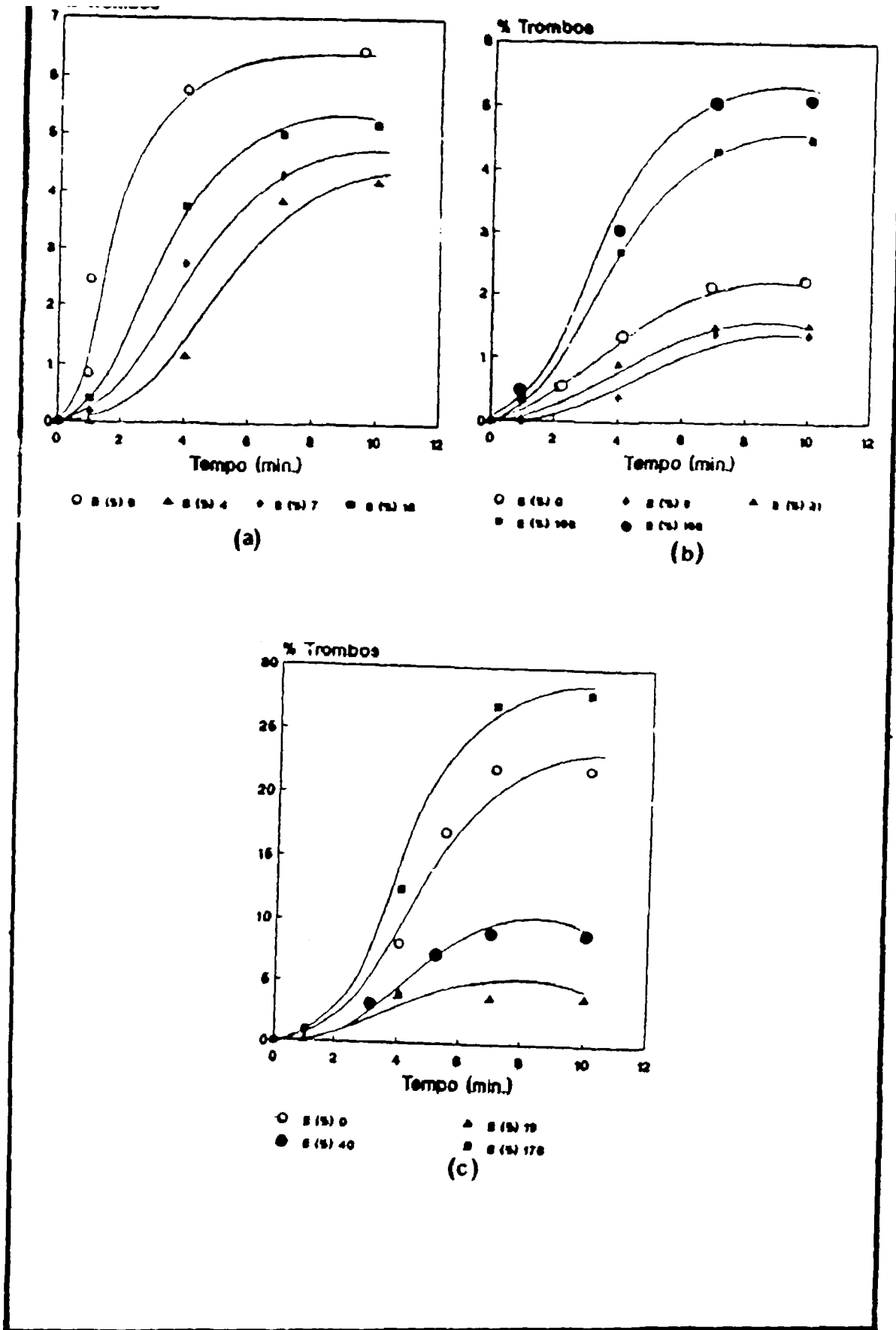


Fig. 46- Cinética da formação de trombos para os copolímeros de enxerto derivados do DMAA: (a) PTFE; (b) PETFE e (c) PEBD.

De acordo com Suzuki<sup>128</sup>, na copolimerização do hidrogel nos substratos poliméricos, a disposição das cadeias enxertadas no meio aquoso forma uma estrutura difusa, que confere uma energia livre perto de zero na interface entre a superfície estranha e o fluido biológico. Este modelo justifica a menor adesão plaquetária (e portanto maior antitrombogenicidade) em superfícies com maior conteúdo de água.

Assim a trombogenicidade do hidrogel PEBD-g-DMAA com percentual de enxertia de 170% pode ser devido à saturação no conteúdo de água atingido para estes hidrogéis, a partir de 20% de enxertia. Possíveis interações entre as cadeias de PDMAA enxertadas, com a formação de uma estrutura semelhante a de um hidrogel de ligações cruzadas, levaria a uma diminuição na mobilidade molecular, comprometendo o modelo da estrutura difusa proposto por Suzuki.

Na enxertia do DMAA sobre o PTFE observou-se que, embora haja um incremento na deposição de trombos com o nível de enxertia, todos os copolímeros de enxerto apresentaram melhores propriedades antitrombogênicas (maior conteúdo de água, menor adsorção de fibrinogênio, menor adesão plaquetária), que o substrato inicial.

Semelhantemente ao PEBD, observou-se que para os copolímeros de PETFE-g-DMAA altos níveis de enxertia levaram a uma diminuição na hemocompatibilidade destes hidrogéis.

#### 4.3.4- Imobilização de albumina

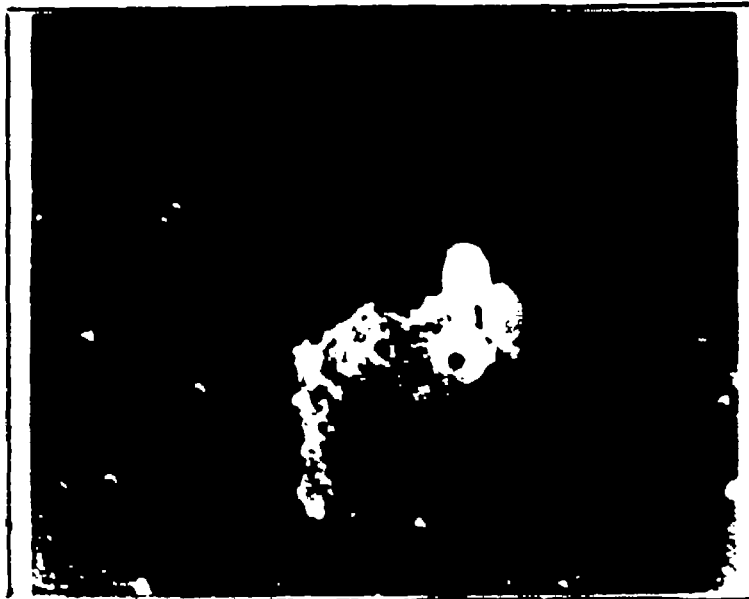
O monômero hidrofílico AA não gerou superfícies hemocompatíveis, uma vez que os copolímeros de enxerto PEBD-g-AA e PVC-g-AA apresentaram características trombogênicas com a formação de coágulo no ensaio de adesão plaquetária (Figura 47).

Face às características destas superfícies com grupos funcionais ácidos, elas puderam ser utilizadas para outra abordagem de obtenção de materiais hemocompatíveis ou seja, obtenção de superfícies capazes de inibir algum dos processos que produzem a cascata de coagulação.

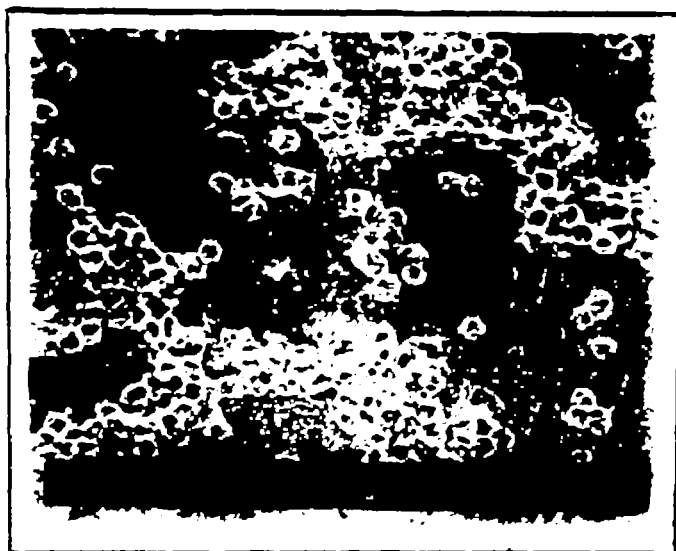
Optou-se pela imobilização da albumina de soro bovino (BSA) nestas superfícies, segundo metodologia desenvolvida por Coulett<sup>128</sup>.

A escolha da albumina foi feita com base nos trabalhos de Chang<sup>18</sup> que indicaram que o revestimento de albumina sobre o carvão ativado diminuiu a adesão de plaquetas.

A Figura 48 mostra que no acoplamento da albumina nas superfícies do PEBD-g-AA e PVC-g-AA, o rendimento aumentou com o percentual de enxertia. Isto poderia ser associado ao processo de conversão de carboxilas das cadeias de PAA enxertadas a azidas. A alta solubilidade do PAA em metanol levaria à obtenção de um grande percentual de ésteres metílicos. Estes seriam ativados facilmente às azidas, acarretando então um percentual de acoplamento da proteína crescente com o nível de enxertia.



(a)



(b)

Fig. 47- Micrografia no MEV após ensaio de adesão de plaquetas para os copolímeros derivados do AA: (a) PVC-g-AA (g: 42%-aumento: 1640X) e (b) PEBD-g-AA (g: 48%-aumento: 748X).

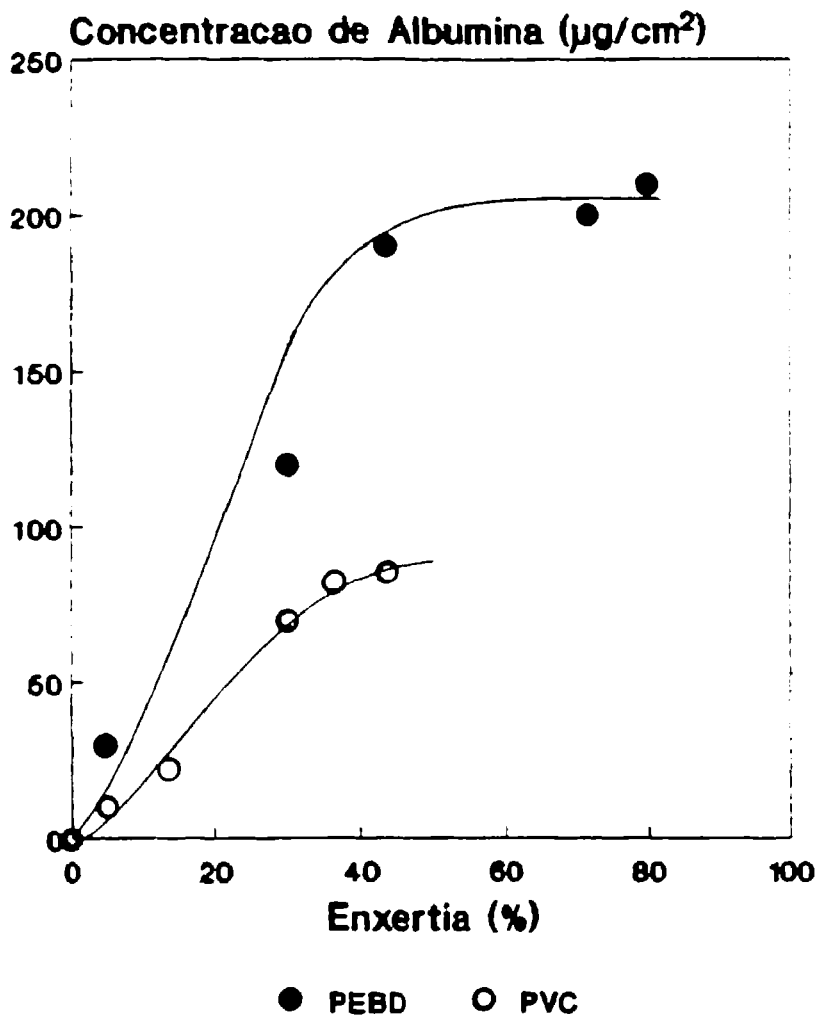


Fig. 48- Imobilização do BSA nos copolímeros de enxerto PEBD-g-AA e, PVC-g-AA.



O ensaio de adesão de plaquetas nas superfícies de **PEBD-g-AA-i-BSA** e **PVC-g-AA-i-BSA** (copolímeros de enxerto derivados do **AA** com a **BSA** imobilizada) mostrou que as superfícies tornaram-se mais hemocompatíveis, em relação aos copolímeros de enxerto iniciais **PEBD-g-AA** e **PVC-g-AA**, conforme é mostrado na Figura 49. Tal fato vai de encontro aos trabalhos de Chang<sup>18,19</sup> e outros que demonstram que a imobilização da **BSA** confere características de hemocompatibilidade a uma dada superfície sintética.

A Figura 50 mostra a cinética de formação de trombos para os copolímeros de enxerto derivados do **AA**, tornando evidente que, após o processo de imobilização do **BSA**, as superfícies tiveram melhorias em sua hemocompatibilidade, em relação às superfícies dos copolímeros de enxerto originais.

A menor adsorção de fibrinogênio nos filmes de **PEBD** e **PVC** (Figura 51) corrobora o comportamento antitrombogênico melhorado dos copolímeros de enxerto, derivados do **AA** com o biocomponente imobilizado.



(a)



(b)

Fig. 49- Micrografia no MEV após ensaio de adesão de plaquetas sobre as superfícies dos copolímeros: (a) PVC-g-AA-i-BSA (g: 42%, i:  $85\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e (b) PEBD-g-AA-i-BSA (g: 48%, i:  $192\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). g: percentual de enxertia e i: quantidade de proteína imobilizada.



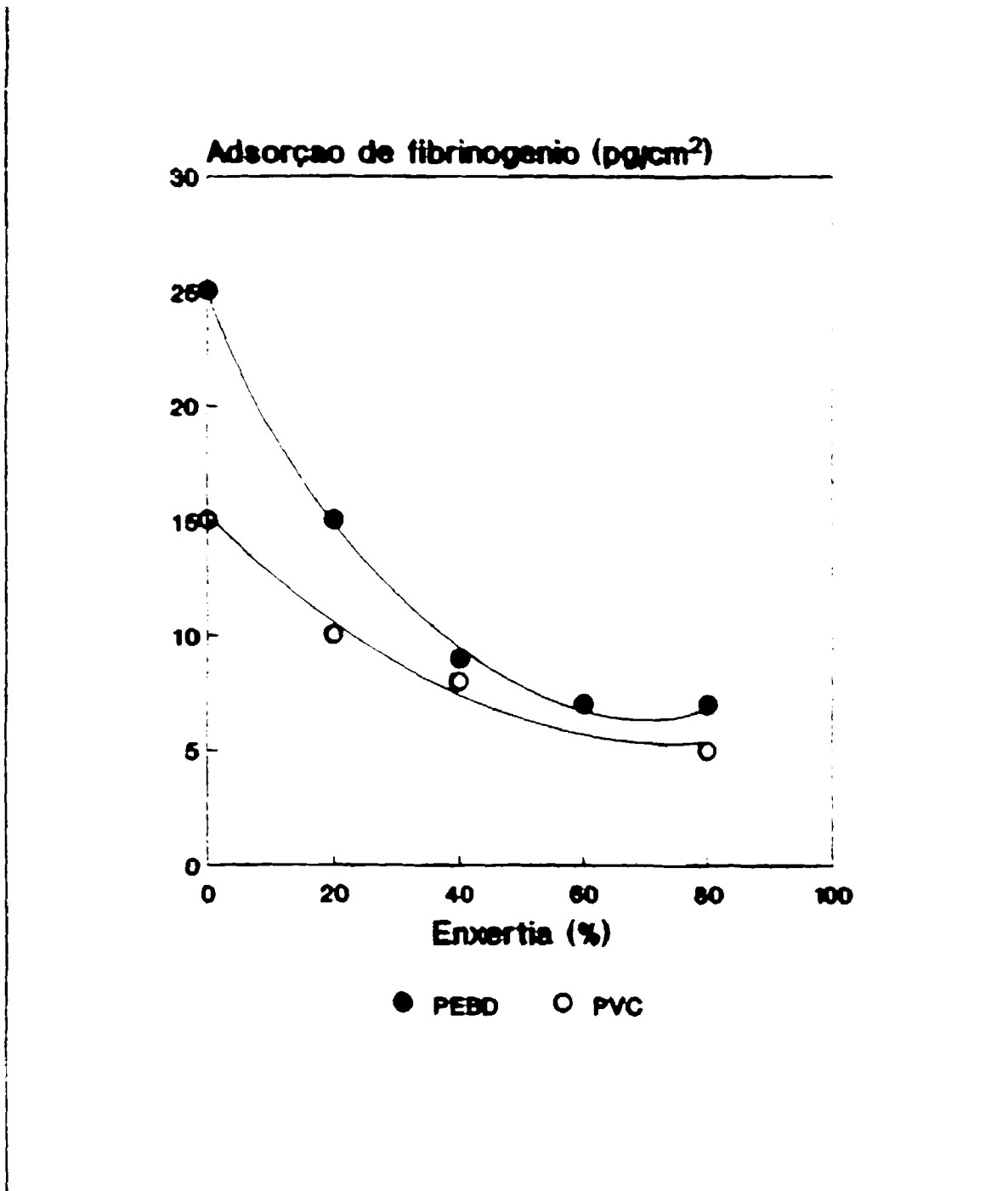


Fig. 51- Adsorção de fibrinogênio nos copolímeros de enxerto derivados do AA após imobilização do BSA.

## 5- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- 1- O método da irradiação simultânea foi efetivo na copolimerização de todos os substratos poliméricos estudados.
- 2- O método da peroxidação mostrou ser eficiente e prático para a obtenção dos copolímeros PETFE-g-DMAA, PEBD-g-AA e PVC-g-AA. O método foi pouco eficiente para a enxertia do DMAA sobre o PTFE e PEBD.
- 3- A homopolimerização na enxertia do AA sobre o PEBD e PVC foi diminuída com a adição do comonômero DMA, descartando-se a utilização de íons metálicos que se complexavam na matriz polimérica.
- 4- Baixas taxas de dose e baixas doses de irradiação demonstraram ser mais efetivas na obtenção dos copolímeros de enxerto.
- 5- Os estudos espectroscópicos com FTIR-MIR e ESCA mostraram uma distribuição homogênea do PDMAA e PAA sobre os substratos poliméricos estudados.
- 6- As superfícies poliméricas dos substratos enxertados tornaram-se hidrofílicas.
- 7- Os valores da tensão crítica de superfície indicaram a biocompatibilidade dos copolímeros de enxerto obtidos.

- 8- As superfícies dos copolímeros de PTFE, PETFE e PVC tornaram-se rugosas com excessão do PEBD.
- 9- Houve um aumento na adsorção de albumina nos copolímeros de enxerto, relativamente aos filmes não modificados.
- 10- O fibrinogénio e a  $\gamma$ -globulina foram menos adsorvidas nos copolímeros derivados do DMAA com o incremento da enxertia. Os copolímeros do AA adsorveram mais fibrinogénio.
- 11- A imobilização da albumina nas superfícies dos copolímeros do AA reduziu sensivelmente a adsorção de fibrinogénio.
- 12- Os níveis de enxertia que renderam superfícies mais hemocompatíveis foram:

|              |                               |
|--------------|-------------------------------|
| PTFE-g-DMAA  | nível igual ou inferior a 12% |
| PETFE-g-DMAA | nível igual ou inferior a 30% |
| PEBD-g-DMAA  | nível igual ou inferior a 40% |
- 13- A imobilização da albumina nos copolímeros de AA levou à obtenção de materiais com propriedades hemocompatíveis.
- 14- Não foi observada uma relação entre a rugosidade e a trombogenicidade das superfícies poliméricas.
- 15- Os vários ensaios *in vitro* para avaliação da hemocompatibilidade dos filmes poliméricos apresentaram resultados coerentes.
- 16- Padronizaram-se técnicas de obtenção e avaliação de materiais poliméricos, que poderão contribuir significativamente para o desenvolvimento de novos biomateriais na área cardiovascular.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- WILLIAMS, D.F. Biomaterials and biocompatibility: An introduction. In: WILLIAMS, D.F. *Fundamental aspects of biocompatibility*. Florida, CRC Press, 1990, v.I, p.2.
- 2- WILLIAMS, D.F. Review tissue-biomaterial interactions. *J. Mater. Sci.*, 22: 3421-45, 1987.
- 3- HERRING, M.; GARDNER, A.; GLOVER, J. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*, 84 (4): 498-504, 1978.
- 4- HEIMKE, G. Ceramics. In: RECUM, A.F. ed. *Handbook of biomaterials evaluation*. USA, Macmillan Publishing Co, 1986, cap.3, p.38-54.
- 5- RATNER, B.D. Biomedical applications of hydrogels: Review and critical appraisal. In: WILLIAMS, D.F. ed. *Biocompatibility of clinical implant materials*. USA, CRC Press, 1981, p. 146-75.
- 6- PISKIN, E. Synthetic polymeric membranes: biological applications. In: PISKIN, E.; HOFFMAN, A.S., eds. *Polymeric biomaterials*. Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers, 1986, p. 136-60.
- 7- DÖRRE, E.; *Alumina: Processing, properties and applications*. Germany, Springer-Verlag, 1984, p.278.

- 8- VERT, M.; Design and synthesis of bioresorbable polymers for the controlled release of drugs. In: ILLUM, L.; DAVIS, S.S., eds. *Polymers in controlled drug delivery*, p.117-30.
- 9- DONG, C.L.; HOFFMAN, A.S. A new method for immobilization of biomolecules using preirradiation grafting at low temperature. *Radiat. Phys. Chem.*, 28 (2): 177-82, 1986.
- 10- WITCHERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 9: 117, 1960.
- 11- CHEN, W.K.W.; MESROBIAN, R.B.; BALLANTINE, D.S.; METZ, D.J.; GLINES, A. Studies on graft copolymers derived by ionizing radiation. *J. Polym Sci.*, 23: 903-13, 1957.
- 12- CHAPIRO, A.; MATSUMOTO, A. Influence de la temperature sur le greffage du styrène sur des films de poly(tetrafluoroéthylène) et de poly(chlorure de vinyle) par la méthode radiochimique directe. *J. Polym. Sci.*, 57: 743-61, 1962.
- 13- HOFFMAN, A.S.; GILLILAND, E.R.; MERRIL, E.W.; STOCKMAYER, W.H. Irradiation grafting of styrene to high pressure and low pressure polyethylene films. *J. Polym. Sci.*, 34: 461-80, 1959.
- 14- RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; HANSON, S.R.; HARKER, L.A.; WHIFFEN, J.D. Blood-compatibility-water-content relationships for radiation-grafted hydrogels. *J. Polym. Sci.: Polym. Symp.*, 66: 363-75, 1979.



- 15- SAUNDERS, C.B.; DICKSON, L.W.; SINGH, A. Gamma and electron beam curing of polymers and composites. Canada, Atomic Energy of Canada Limited, 1987. p.1-6.
- 16- OMICHI, H.; OKAMOTO, J. Synthesis of ion-exchange membranes by radiation-induced multiple grafting of methyl  $\alpha,\beta,\beta$ -trifluoro-acrylate. *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.*, 20: 521-28, 1982.
- 17- GARNETT, J.L.; JANKIEWICZ, S.V.; LEVOT, R.; SANGSTER, D.F. Insolubilization of biologically active materials with novel radiation graft copolymers. *Radiat. Phys. Chem.*, 25(4-6): 509-16, 1985.
- 18- CHANG, T.S. Platelet-surface interaction: Effect of albumin coating or heparin complexing on thrombogenic surfaces. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 52: 275-85, 1974.
- 19- CHANG, T.M.S. Biomedical applications of artificial cells containing immobilized enzymes, proteins, cells and other biologically active materials. In: LASKIN, A.I. *Enzymes and immobilized cells in biotechnology*. California, Benjamin/Cummings Publishing Co, 1985, p. 263-81.
- 20- IMANISHI, Y. Polyetherurethanes with specific properties. *Makromol. Chem. Suppl.*, 12: 83-104, 1985.
- 21- SUGITACHI, A.; TANAKA, M.; KAWAHARA, T.; TAKAGI, K. Antithrombogenicity of UK-immobilized polymer surfaces. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 26: 274-78, 1980.

- 22- RATNER, B.D. Biomedical applications of synthetic polymers. In: ALLEN, G.; BEVINGTON, J. eds. *Comprehensive polymer science*. USA, Pergamon Press, 1989. v.7, p.201-47.
- 23- IAEA. *Radiation technology in biotechnology and biomedicine*. Seattle, 12-15 December, 1988. Washington, 1988.
- 24- OTSUHATA, K.; RAZZAK, M.T.; CASTANARES, R.L.; TABATA, Y.; OHASHI, F.; TAKEUCHI, A. Effect of surface texture of grafted films on antithrombogenicity. *Radiat. Phys. Chem.*, 25 (4-6): 537-48, 1985.
- 25- RAZZAK, M.T.; OTSUHATA, K.; TABATA, Y. Radiation-induced grafting of N,N-dimethylacrylamide onto polytetrafluoroethylene. *J. Appl. Polym. Sci.*, 33: 2345-51, 1987.
- 26- HENLEY, E.J.; CHONG, G. Gamma radiation-induced solution polymerization of ethylene. *J. Polym. Sci.*, 57: 867-79, 1962.
- 27- YGIT, F.; GUVEN, O. A kinetic investigation of radiation induced bulk polymerization of acrylic acid. *Radiat. Phys. Chem.*, 33 (2): 97-101, 1989.
- 28- HEGAZY, S.A.; MOKHTAR, S.M.; OSMAN, M.B.S.; MOSTAFA, A.E.K.B. Study on non-ionic membrane prepared by radiation-induced graft polymerization. *Radiat. Phys. Chem.*, 36 (3): 365-70, 1990.

- 29- KAETSU, I.; KUMAKURA, M.; YOSHI, F.; YOSHIDA, K.; NISAHYAMA, S.; ABE, O.; TANAKA, H.; NAKAMURA, S. Casting of plastic optical lenses by radiation polymerization and its practical production as photocondenser lenses. *Radiat. Phys. Chem.*, 25 (4-6): 879-86, 1985.
- 30- DAITON, F.S. Effect of gamma- and X- rays on dilute aqueous solutions of acrylonitrile. *Nature*, 160: 268-69, 1947.
- 31- CHAPIRO, A.; JEADRYCHOWSKA-BONAMOUR, A.M.; LELIEVRE, G. Molecular products in radiolysis of vinyl monomer. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 63: 134-40, 1977.
- 32- HOFFMAN, A.S. Applications of synthetic polymeric biomaterials in medicine and biotechnology. In: MARTUSCELLI, E.; MARCHETTA, C.; NICOLAIS, L. *Future trends in polymer science and technology*. USA, Technomic Publishing, 1987. p.193-214.
- 33- SANGSTER, D.F.; DWORJANYN, P.A.; GARNETT, J.L.; JANKIEWICZ, S.V. Additive effects in UV and radiation. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation technology for immobilization of bioactive materials: Proceeding of the final research co-ordination meeting on...held in Beijing, 15-18 June, 1987*. Vienna, 1988. p. 7-24.
- 34- COOPER, W.; VANGHAN, G.; MILLER, S.; FIELDEN, M. Graft copolymers from natural rubber latex using visible, ultraviolet and  $\gamma$ -ray initiation. *J. Polym. Sci.*, 34: 651-70, 1959.

- 35- KIAEI, D.; SAFRANJ, A.; CHEN, J.P.; JOHNSTON, A.B.; ZAVALA, F.; DEELDER, A.; CASTELINO, J.B.; MARKOVIC, V.; HOFFMAN, A. S. Immobilization of proteins on glow discharge treated polymers. *Radiat. Phys. Chem.*, 38 (6): 463-67, 1992.
- 36- METZ, D.J. Graft copolymers - A new technology? *Nucleonics*, 16 (4): 73-7, 1958.
- 37- WILSON, J.E. *Radiation chemistry of monomers, polymers and plastics*. New York, N.Y., Marcel Dekker, 1974. cap. 5, p. 253-303.
- 38- RESTAINO, A.J.; REED, W.N. Kinetics of the gamma-induced graft copolymerization of vinyl acetate to Teflon. *J. Polym. Sci.*, 36: 499-510, 1959.
- 39- STANNETT, V.T. Radiation grafting state-of-the-art. *Radiat. Phys. Chem.*, 35 (1-3): 82-7, 1990.
- 40- HEGAZY, S.; ISHIGAKI, I.; OKAMOTO, J. Radiation grafting of acrylic acid onto fluorine-containing polymers. I- Kinetic study of preirradiation grafting onto poly(tetrafluoroethylene). *J. Appl. Polym. Sci.*, 26: 3117-24, 1981.
- 41- SIMPSON, J.T. Radiation grafted adhesive primers. *Radiat. Phys. Chem.*, 25 (4-6): 483-90, 1985.
- 42- CHAPIRO, A. Radiation induced polymerization. *Radiat. Phys. Chem.*, 14: 101-16, 1979.

- 43- ANDRADE, J.; SMITH, L.M.; GREGONIS, D.E. The contact angle and interface energetics. In: ANDRADE, J.D. (Editor). *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers*. USA, Plenum Press, 1985, p. 249-92.
- 44- IKADA, Y.; SUZUKI, M.; TAMADA, Y. Polymer surfaces possessing minimal interaction with blood components. In: SHALABY, S.W.; HOFFMAN, A.S.; RATNER, B.D.; HORBETT, T.A. eds. *Polymers as biomaterials*. New York, N.Y., Plenum Press, 1984, p. 135-47.
- 45- BILLMEYER, F.W. *Textbook of polymer science*. Singapore, John Wiley & Sons, 1984. p. 101-25.
- 46- MANDELKERN, L. The crystalline state. In: MARK, J.; EISENBERG, A.; GRAESSLEY W.W.; MANDELKERN, L.; KOENIG, J.L. eds. *Physical properties of polymers*. USA, American Chemical Society, 1984. p.155-237.
- 47- ARMENIADES, C.D.; BAER, E. Transitions and relaxations in polymers. In: KAUFMAN, M.S.; FALCETTA, J. eds. *Introduction to polymer science and tecnology*. USA, John Wiley & Sons, 1977. p. 240-61.
- 48- HEDVIG, P. Electron spin resonance study of radiation degradation of polytetrafluoroethylene. *J. Polym. Sci.; Part A-1*, 7: 1145-52, 1969.
- 49- ZHONG, X.; YU, L.; SUN, J.; ZHANG, Y. XPS studies on radiation induced structural changes in the copolymer of tetrafluoroethylene and ethylene. *J. Appl. Polym. Sci.* 47: 21-4, 1993.

- 50- BOVEY, F.A. *The effects of ionizing radiation on natural and synthetic high polymers.* New York, N.Y., Interscience Publishers, 1958. p. 97-127, 149-155.
- 51- MAGNANI, A. Surface infrared spectroscopy (ATR/FT-IR) of biomaterials. In: 5th EUROPEAN SCHOOL ON BIOMATERIALS. Proceedings of the final research co-ordination meeting on...held in Siena, 20th-23rd April, 1993. Siena, 1993.
- 52- HARRICK, N.J. Studies of physics and chemistry of surfaces from frustrated total internal reflection. *Phys. Rev. Letters*, 4: 224-6, 1960.
- 53- HARRICK, N.J. Surface chemistry from spectral analysis of totally internally reflected radiation. *J. Phys. Chem.* 64: 1110-5, 1960.
- 54- KNUTSON, K.; LYMAN, D.J. Surface infrared spectroscopy. In: ANDRADE, J.D. *Surface interfacial aspects of biomedical polymers.* USA, Plenum Press, 1985. p. 197-247.
- 55- KÄMPF, G. *Characterization of plastics by physical methods.* Germany, Carl Hanser Publishers, 1986. p.253-61.
- 56- RATNER, B.D.; YOON, S.C.; MATEO, N.B. Surface studies by ESCA of polymers for biomedical applications. In: FEAST, W.J.; MUNRO, H.S. eds. *Polymers surfaces and interfaces.* Great Britain, John Wiley & Sons, 1987. p. 231-51.

- 57- CAMPA, J.G. Aplicaciones de la calorimetria diferencial de barrido a polimeros amorfos. In: PERKIN ELMER HISPANIA S.A. Seminario de polimeros y nuevos materiales held in Madrid, 22-23 de Enero de 1992. Madrid, 1992.
- 58- RATNER, B.D.; JOHNSTON, A.B.; LENK, T.J. Biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.: Appl. Biomat.*, 21 (A-1): 59-90, 1987.
- 59- BRUCK, S.D. *Blood compatible synthetic polymers*. USA, Charles C. Thomas, 1974. cap. II, p. 58-72.
- 60- NORDE, W.; LYKLEMA, J. Why proteins prefer interfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 2 (3): 183-202, 1991.
- 61- OKANO, T.; NISHIYAMA, S.; SHINOHARA, I. AKAIKE, T.; SAKURAI, Y. Interaction between plasma protein and microphase separated structure of copolymers. *Polym. J.* 10 (2): 223-8, 1978.
- 62- BEUGELING, T. The interaction of polymer surfaces with blood. *J. Polym. Sci.: Polym. Symp.*, 66: 419-28, 1979.
- 63- JOSEFOWICZ, M.; JOSEFONVICZ, J. Antithrombogenic polymers. *Pure Appl. Chem.*, 56 (10): 1335-44, 1984.
- 64- KAETSU, I. Radiation techniques in the formulation of synthetic biomaterials. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation technology on bioengineering and biomedical application: proceedings of the consultants meeting on... held in Seattle (USA), 12-15 December, 1988*. Vienna, 1989, p.4.

- 65- TANAKA, A.; SONOMOTO, K. Immobilized biocatalysts in organic solvents. *Chemtech* : 112-7, 1990.
- 66- NORITOMI, H.; WATANABE, A.; KISE, H. Enzymatic reactions in aqueous-organic media VII. Peptide and ester synthesis in organic solvents by  $\alpha$ -Chymotrypsin immobilized through non-covalent binding to poly(vinyl alcohol). *Polym. J.*, 21 (2): 147-53, 1989.
- 67- PITTMAN, C.U. Polymer supports in synthesis. *Polym. News*, 16: 16-7, 1991.
- 68- HOFFMAN, A. Adsorption and immobilization of proteins on gas discharge-treated surfaces. *J. Appl. Polym. Sci. : Appl. Polym. Symp.* 46: 341-59, 1990.
- 69- BEDDOWS, C.G.; GUTHRIE, J.T. The immobilization of enzymes onto hydrolized polyethylene-g-co-2-HEMA. *J. Appl. Polym. Sci.*, 35: 135-44, 1988.
- 70- VENKATARMAN, S.; HORBETT, T.A.; HOFFMAN, A.S. The reactivity of  $\alpha$ -Chymotrypsin immobilized on radiation-grafted hydrogel surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, 8: 111-23, 1977.
- 71- GARNETT, J.L.; KENYON, R.S.; LIDDY, M.J. Enzyme immobilization by covalent attachment to novel polymer matrices prepared by a radiation grafting technique. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 735-6, 1974.
- 72- BEDDOWS, C.G.; GUTHRIE, J.T.; ABDEL-HAY, F.I. The use of graft copolymers as enzyme supports immobilization of proteins and enzymes on a hydrolized nylon-co-acrylonitrile system. *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 2885-9, 1981.



- 73- BEDDOWS, C.G.; GIL, M.H.; GUTHRIE, J.T. Immobilization of BSA, enzymes and cells of bacillus stearotherophilus onto cellulose, polygalacturonic acid and starch based graft copolymers containing maleic anhydride. *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 51-7, 1986.
- 74- BORZIN, G.A.; MILLER, I.F. The kinetics of protein adsorption on synthetics and modified natural surfaces. *J. Colloid. Interface Sci.*, 86 (2): 539-58, 1982.
- 75- DILLMAN, Jr. W.I.; MILLER, I.F. On the adsorption of serum proteins on polymers membrane surfaces. *J. Colloid. Sci.*, 44 (2): 221-41, 1973.
- 76- SAWYER, P.N.; SOPHIE, Z.; OSHAUGHNESSY, A.M. Hemocompatibility assessment. In: RECUM, A.F. ed. *Handbook of biomaterials evaluation*. USA, Macmillan Publishing, Co, 1986.
- 77- IMAI, Y.; NOSE, Y. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 6: 165-72, 1972.
- 78- BISCAYART, P.L.; PALADINI, A.C.; VITA, N.; ROGUIN, L.P. Preparations of <sup>125</sup>I labelled human growth hormone of high quality binding properties endowed with long term stability. *J. Immunoassay*, 10(1): 37-56, 1989.
- 79- HUNTER, W.M.; GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194 (4827): 495-6, 1962.

- 80- BARTOLINI, P. Efeitos da radioiodação sobre as atividades biológica, imunológica, de ligação a receptores e propriedades fisico-químicas do hormônio de crescimento humano. São Paulo, 1984. (Tese de doutoramento, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 81- ROYALS, E.E. *Advanced organic chemistry*. USA, Prentice Hall, 1956, p. 600.
- 82- RASMUSSEN, J.R.; STEDRONSKY, E.R.; WHITESIDES, G.M. Introduction, modification and characterization of functional groups on the surface of low-density polyethylene film. *J. Amer. Chem. Soc.*, 99(14): 4736-45, 1977.
- 83- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54, 1976.
- 84- WANG, U.P. Radiation grafting of acrylic acid, methacrylic acid and polyfunctional methacrylates onto poly(vinylchloride). *Radiat. Phys. Chem.*, 25 (4-6): 491-9, 1985.
- 85- CHAPIRO, A.; BOZZI, A. Synthesis of perm-selective membranes by grafting methacrylic acid into air-irradiated teflon-fep films. *Radiat. Phys. Chem.*, 32 (2): 193-6, 1988.
- 86- SKUBA, N.D.; KÁLAL, J.; VACÍK, I.; VORONCOYA, O.S. Morphological foundation of hydrogel use for vascular occlusion. *Makromol. Chem. Suppl.*, 9: 145-50, 1985.

- 87- JANSEN, B.; ELLINGHORST, G. Radiation initiated grafting of hydrophilic and reactive monomers on polyetherurethane for biomedical application. *Radiat. Phys. Chem.*, 18 (5-6): 1195-1201, 1981.
- 88- KUMAKURA, M.; KAETSU, I. Radiation polymerization of 2- hydroxyethylmethacrylate- vinylpyrrolidone- water system. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 53: 1242-6, 1988.
- 89- IMRE, K.; ODIAN, G. Diffusion-controlled reaction. V. Effect of concentration-dependent diffusion coefficient on reaction rate in graft polymerization. *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.*, 17: 2601-26, 1979.
- 90- ODIAN, G.; DERMAN, A.; IMRE, K. Diffusion-controlled reaction. VI- Radiation graft polymerization of 4 - vinylpyridene to polyethylene. *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.*, 18: 737-48, 1980.
- 91- PREVOST-BÉRNAS, A.; CHAPIRO, A.; COUSIN, C.; LANDLER, Y.; MAGAT, M. The radiolysis of some organic liquids. *Discuss. Faraday Soc.*: 98-132, 1952.
- 92- RABIE, A.; ODIAN, G. Kinetics of diffusion-free radiation graft polymerization of styrene onto polyethylene. *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.*, 15: 469-88, 1977.
- 93- HUGLIN, M.B.; JOHNSON, B.L. Role of cations in radiation chemistry and homopolymerization. *J. Polym. Sci.*, 7: 1379-85, 1969.

- 94- GARGAN, K.; KRONFLI, E.; LOVEL, K.V. Pre-irradiation grafting of hydrophilic monomer onto polyethylene. I- The influence of homopolymerization inhibitors. *Radiat. Phys. Chem.*, 36 (6):757-61, 1990.
- 95- MANO, E.B. *Introdução a polímeros*. São Paulo, SP, Edgard Blücher, 1985, p. 57.
- 96- GOTTESMAN, R.T.; GOODMAN, D. Poly(vinyl chloride). In: TESS, R.W.; POEHLEIN, G.W. eds. *Appl. Polym. Sci. USA*, American Chemical Society, 1985. p. 383-440.
- 97- BENGOUGH, W.I.; FAIRSERVICE, W.H. Effects of salts of metals on vinyl polymerization. *Trans. Faraday Soc.*, 63 : 382-91, 1967.
- 98- LYMAN, D.J. Biomedical polymers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 146: 30-48.
- 99- GARNETT, J.L.; KENYON, R.S.; LEEDER, J.D. The importance of styrene as a comonomer in acid-catalyzed grafting to wool. *Polym. Letters Ed.*, 15: 93-6, 1977.
- 100- HEGAZY, A.El-S.; ISHIGAKI, I.; OKAMOTO, J. Radiation grafting of acrylic acid onto fluorine-containing polymers. I. Kinetic study of preirradiation grafting onto poly(tetrafluoroethylene). *J. Appl. Polym. Sci.*, 26: 3117-24, 1981.
- 101- OKAMOTO, J.; SUGO, T.; KATAKAI, A.; OMICHI, H. Complex-forming polymer prepared by electron beam radiation-induced graft polymerization. *Radiat. Phys. Chem.*, 25 (1-3): 333-42, 1985.

- 102- MANO, E.B. *Polímeros como materiais de engenharia*. São Paulo, SP, Edgard Blücher, 1991, p. 66, 92.
- 103- HARADA, J.; CHERN, R.T.; STANNETT, T. Acrylic acid grafted polyethylene by electron beam preirradiation method. *Polym. Preprints*, 31 (2): 370-1, 1990.
- 104- VOEVODSKI, V.V. Mechanism of radiation effects on organic solids. In: DOBÓ, J. ed. *Radiation chemistry*. Budapest, Akadémiai Kiadó, 1964. p. 111-45.
- 105- KIRK-OTHMER. *Encyclopedia of chemical technology*. USA, Wiley-Interscience, 1980, v.11, p.37.
- 106- BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H. *Polymer handbook*. 2. ed. USA, John Wiley & Sons, 1975.
- 107- ISHIGAKI, I.; SUGO, T.; SENOO, K.; OKADA, T.; OKAMOTO, J.; MACHI, S. Graft polymerization of acrylic acid onto polyethylene film by preirradiation method. I. Effects of preirradiation dose, monomer concentration, reaction temperature, and film thickness. *J. Appl. polym. Sci.*, 27: 1033-41, 1982.
- 108- KRAUKOPF, L.G. Plasticizers: Types, properties, and performance. In: NASS, L.J.; HEIBERGER, C.A. eds. *Encyclopedia of PVC*. USA, Marcel Dekker, 1988, v. 2, p. 143-261.
- 109- TABATA, Y.; SHIBANO, H.; SOBUE, H. Copolymerization of tetrafluoroethylene with ethylene induced by ionizing radiation *J. Polym. Sci.: Part A*, 2: 1977-986, 1964.

- 110- MOYNIHAN, R.E. The molecular structure of perfluorocarbon polymers. Infrared studies on polytetrafluoroethylene. *J. Am. Chem. Soc.*, 81: 1045-50, 1959.
- 111- CROMPTON, T.R. *The analysis of plastics*. Great Britain, Pergamon Press, 1984. p. 23-8.
- 112- RABIE, S.M.; MOHARRAM, M.A.; DAGHISTANI, A.Y. Infrared study of combined effect of  $\gamma$ -radiation and elevated temperature on poly(vinyl chloride). *J. Appl. Polym. Sci.*, 30: 279-87, 1985.
- 113- RAZZAK, M.T. *Radiation grafting studies on the modification of fluoropolymers and natural rubber for biomaterials*. Tokyo, 1988. (Tese de doutoramento, University of Tokyo).
- 114- SUNG, C.S.P.; HU, C.B. ESCA studies of surface chemical composition of segmented polyurethanes. *J. Biomed. Mater. Res.*, 13: 161-71, 1979.
- 115- CLARK, D.T.; FEAST, W.J.; MUSGRAVE, W.K.R.; RITCHIE, I. Applications of ESCA to polymer chemistry. Part VI. Surface fluorination of polyethylene. Application of ESCA to the examination of structure as a function of depth. *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.*, 13: 857-90, 1975.
- 116- KOZLOWSKI, C.; SHERWOOD, P.M.A. X-ray photoelectron spectroscopic studies of carbon fiber surfaces. VIII- A comparison of the type I and type II fibers and their interaction with thin resin films. *Carbon*, 25 (6): 751-60, 1987.

- 117- BATTAERD, H.A.J.; TREGGAR, G.W. *Graft copolymers*. USA, John Wiley & Sons, 1967.
- 118- HAYES, R.A. The relationship between glass temperature, molar cohesion, and polymer structure. *J. Appl. Polym. Sci.*, 5 (15): 318-21, 1961.
- 119- LEE, L.H. Relationships between surface wettability and glass temperature of high polymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 12: 719-30, 1968.
- 120- BAYER, R.E. The role of surface energy in thrombogenesis. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 48 (2): 257-72, 1972.
- 121- OKANO, T.; YUI, N.; TANAKA, J.; SANUI, K.; OGATA, N.; KATAOKA, K. Characterization of the microstructure of poly(propylene oxide)-segmented polyamide and its suppression of platelet adhesion. *Polym. J.*, 16 (2): 119-28, 1984.
- 122- LYMAN, D.J.; KNUTSON, K.; MCNEILL, B.; SHIBATANI, K. The effects of chemical structure and surface properties of synthetic polymers on the coagulation of blood. IV. The relation between polymer morphology and protein adsorption. *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 21: 49-54, 1975.
- 123- VROMAN, L.; ADAMS, A.L.; KLINGS, M.; FISCHER, G.C.; MUNOZ, P.C.; SOLENSKY, R.P. Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 283: 65-75, 1977.

- 124- DURRANI, A.A.; CHAPMAN, D. Modification of polymer surfaces for biomedical applications. In: FEAST, W.J.; MUNRO, H.S. eds. *Polymer surfaces and interfaces*. Great Britain, John Wiley & Sons, 1987, p. 189-200.
- 125- NEUMANN, A.W.; MOSCARELLO, M.A.; ZINGG, W.; HUM, O.S.; CHANG, S.K. Platelet adhesion from human blood to bare and protein-coated polymer surfaces. *J. Polym. Sci.: Polym. Symp.*, 66: 391-98, 1979.
- 126- ADAMS, G.A.; FEUERSTEIN, I.A. Visual fluorescent and radioisotopic evaluation of platelet accumulation and embolization. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 26: 17-23, 1980.
- 127- BAYER, R.E. Key events in blood interactions at nonphysiologic interfaces-A personal primer. *Artif. Organs.*, 2 (4), 1978.
- 128- SUZUKI, M.; TAMADA, Y.; IWATA, H.; IKADA, Y. Polymer surface modification to attain blood compatibility of hydrophobic polymer. In: MITTAL, K.L. ed. *Physicochemical aspects of polymer surfaces*. USA, Plenum Publishing, 1983, v.2, p. 923-41.
- 129- COULET, P.R.; JULLIARD, J.C.; GAUTHERON, D.C. A mild method of general use for covalent coupling of enzymes to chemically activated collagen films. *Biotechnol. Bioeng.*, 16: 1055-68, 1974.