

NÍKOLAS SINJI HARADA

**TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE TUBOS DE PVC PARA
CIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA EXTRACORPÓREA, UTILIZANDO O
PROCESSO DE HEPARINIZAÇÃO**

Monografia apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para conclusão da Graduação em
Engenharia de Materiais

São Paulo

2002

NÍKOLAS SINJI HARADA

**TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE TUBOS DE PVC PARA
CIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA EXTRACORPÓREA, UTILIZANDO O
PROCESSO DE HEPARINIZAÇÃO**

Monografia apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para conclusão da Graduação em
Engenharia de Materiais

Área de concentração:
Engenharia de Materiais

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Wang Shu Hui

Co-orientadora:
Eng^a. Helena T. Oyama

São Paulo
2002

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Wang Shu Hui e à Eng^a. Helena T. Oyama pelas diretrizes seguras e pelo apoio.

Ao Instituto do PVC e à FAPESP pelo suporte financeiro.

À todos os meus amigos e professores que estiveram ligados, direta ou indiretamente, à realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho tinha como objetivo a modificação superficial de cânulas de PVC, buscando-se uma melhora em sua hemocompatibilidade utilizando o método de imobilização de heparina na superfície dos mesmos. Foi utilizada uma solução de heparinato de benzalcônio em isopropanol para o tratamento do PVC e as modificações na superfície foram monitoradas em várias condições de tratamento e lavagem. As modificações superficiais induzidas pela heparina foram caracterizadas utilizando-se o espectrômetro de FT-IR/ATR para se conseguir resultados quantitativos. Verificou-se enorme influência do tempo de tratamento e lavagem, e do tipo de PVC utilizado, na quantidade de heparina imobilizada na superfície do material. Foi observada uma remoção parcial da heparina (de 20 a 30%) após a lavagem do material utilizando-se solução fisiológica com 0,9% de cloreto de sódio. O PVC mais flexível garante maior incorporação da heparina em sua superfície, sendo que tal comportamento foi atribuído à diferença de difusividade através do meio.

ABSTRACT

The aim of this study was to make superficial modification of PVC tubing looking for increasing its blood compatibility by using heparin immobilization. A solution of benzalkonium heparinate was used for the PVC treatment. The modification of the PVC surface was monitored after various treatment conditions. The modification of the PVC surface induced by heparin treatment was characterized by FTIR/ATR spectroscopy to obtain quantitative results. Times of treatments and PVC types have a deep influence on the observed amount of heparin on the PVC surface. A partial removal (20-30%) of heparin was observed after PVC surface washing by 0,9 % sodium chloride aqueous solution. More flexible PVC tubing allowed a higher incorporation of heparin on its surface and this behavior is attributed to the difference of diffusivity through the medium.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1) INTRODUÇÃO:	1
2) REVISÃO DA LITERATURA:	2
2.1) Fenômeno da coagulação:	2
2.1.1) Via intrínseca de coagulação:	3
2.1.2) Via extrínseca de coagulação:	4
2.1.3) Formação do coágulo:	4
2.2) Sistemas de controle da coagulação:	4
2.3) A heparina:	5
2.4) Formas de ligação da heparina nos materiais sintéticos:	8
2.4.1) Adsorção física da heparina:	8
2.4.2) Ligação covalente da heparina:	9
2.4.3) Ligação iônica da heparina:	9
2.4.4) Grafitização da heparina:	11
2.5) Métodos de caracterização do recobrimento superficial com heparina:	11
2.5.1) ATR-FTIR e ESCA:	12
2.5.2) Microscopia eletrônica de varredura:	12
2.5.3) Cromatografia:	12
2.6) Testes de biocompatibilidade:	13
3) MATERIAIS E MÉTODOS:	14
3.1) Materiais:	14
3.2) Métodos:	14
3.2.1) Adequação dos corpos de prova:	14
3.2.2) Aplicação do heparinato de benzalcônio:	14
3.2.3) Lavagem dos corpos de prova após tratamento:	15
3.2.4) Verificação da presença de heparina nas amostras de PVC:	15
3.2.5) Levantamento da curva de calibração de heparina sódica:	15
3.2.6) Verificação das diferenças entre os tipos de PVC utilizados:	16
3.2.7) Quantificação da heparina na superfície do PVC:	16
3.2.8) Verificação visual da modificação da superfície do PVC com MEV:	16

4) RESULTADOS:	17
5) DISCUSSÃO:	31
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	33

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Absorbância do PVC tipo 1 tratado e lavado.....	25
Tabela II - Absorbância do PVC tipo 2 tratado e lavado	26
Tabela III - Resultados finais após diferentes condições de tratamento e lavagem.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cascata de coagulação.....	3
Figura 2: Estrutura da heparina. [18]	6
Figura 3: Representação da passagem do plasma sangüíneo no tubo de material heparinizado. [19]	8
Figura 4: Heparina ligada covalentemente no substrato. [11].....	9
Figura 5: Heparina ligada ionicamente. [11].....	10
Figura 6: Heparina ligada no substrato pelo processo Carmeda. [11]	10
Figura 7: Heparina grafitizada na superfície do substrato. [11].....	11
Figura 8: Espectro FTIR de amostra de PVC.....	18
Figura 9: Espectros do PVC tratado (preto) e não tratado (cinza).	19
Figura 10: Espectros da amostra tratada e lavada.	20
Figura 11: Espectro da amostra tratada (cinza) e lavada (preto).....	21
Figura 12: Espectros FTIR: (1) do PVC (em cinza) e (2) do BAC heparin (em preto)	21
Figura 13: Espectro da heparina sódica.....	23
Figura 14: Curva de calibração da heparina, para o pico de 1230 cm ⁻¹	24
Figura 15: Comparação entre as curvas de calibração da heparina sódica.	24
Figura 16: Análise de DMTA do PVC tipo 1 (cinza) e do PVC tipo 2 (preto).....	25
Figura 17: Relação entre tempo de tratamento e quantidade de heparina no PVC tipo 1...	27
Figura 18: Relação entre tempo de lavagem e quantidade de heparina permanecente no PVC tipo 2 (para tempo de tratamento = 15 minutos).	27
Figura 19: Influência do tempo de tratamento na quantidade de heparina presente na superfície do PVC tipo 1, após lavagem de 30 minutos.	28
Figura 20: MEV da superfície do material após tratamento.	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR	- Refletância total atenuada
BAC-HEPARIN	- Heparinato de benzalcônio
DMTA	- Dynamic mechanical thermal analysis
FT-IR	- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
PVC	- Poli(cloreto de vinila)

1) INTRODUÇÃO:

O trabalho tem como objetivo pesquisar a modificação superficial de poli(cloreto de vinila) (PVC) com a finalidade de obter uma superfície mais tromborresistente, utilizando-se para tal a imobilização de heparina. O tratamento consistiu na aplicação da solução de heparinato de benzalcônio em isopropanol no PVC, material utilizado em tubos para circulação sanguínea extracorpórea.

A monitoração da modificação é parte do trabalho, e foi feita através da variação das condições de tratamento e da análise da superfície do PVC. O método de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) por refletância total atenuada (ATR) foi empregado na caracterização da superfície modificada, além da utilização de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para o desenvolvimento de um método quantitativo, construiu-se uma curva de calibração utilizando-se soluções contendo diferentes concentrações de heparina, e medindo-se no espectro infravermelho a absorbância resultante de cada solução. Comparando-se a absorbância dos espectros da superfície modificada do PVC com a curva de calibração é possível determinar quantitativamente a concentração de heparina.

Quantificar o nível de modificação torna possível a verificação da eficiência do tratamento estático e dinâmico de superfície do PVC e as vantagens e desvantagens de sua aplicação em procedimentos hospitalares.

2) REVISÃO DA LITERATURA:

A interação entre o sangue e materiais sintéticos apresenta grande interesse acadêmico e prático. Há uma grande necessidade de se obter materiais compatíveis com o sangue, tanto para próteses quanto para sistemas de circulação extra-corpórea. Geralmente, quando há contato entre o sangue e materiais que não são compatíveis com ele, ocorre a coagulação ou deposição de uma camada de proteína no material, seguido de deposição de plaquetas. Além do problema de coagulação há também uma complicação extra que é a danificação das hemácias ao entrarem em choque com a superfície estranha. [1] [5] [6] [17]

Apesar do extenso uso de materiais poliméricos para fabricação de produtos para uso biomédico, sua biocompatibilidade ainda apresenta-se insatisfatória. Há ocorrência de eventos indesejáveis quando há fluxo de sangue e contato com estes polímeros. Mecanicamente, as propriedades do polímero são muito diferentes das apresentadas pelos vasos sanguíneos. Tais diferenças produzem turbulência no fluxo sanguíneo, o que induz a hemólise e a ativação e agregação de plaquetas. [15] [16]

2.1) Fenômeno da coagulação:

Quando o sangue entra em contato com o polímero, a formação do coágulo geralmente é resultado da indução da cascata de coagulação, pelo contato em si, produtos liberados no fluxo sanguíneo e a ativação de plaquetas e hemólise devido à turbulência causada no fluxo. A formação do coágulo é resultado de reações bioquímicas catalisadas por enzimas nas quais células sanguíneas e proteínas plasmáticas estão envolvidas. [1] [2] [3]

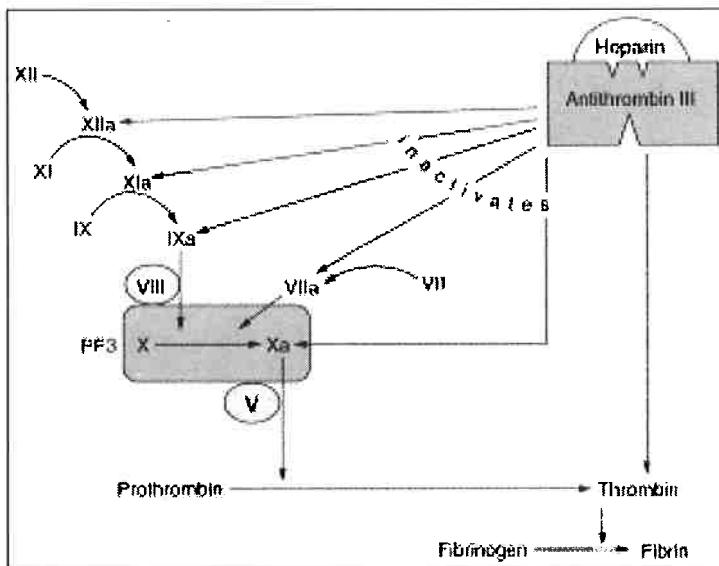


Figura 1: Cascata de coagulação.

Em menos de um minuto de contato entre o sangue e o polímero, há ocorrência de adsorção de proteínas e glicoproteínas em sua superfície, formando um recobrimento protéico sobre ela. Dependendo da natureza da superfície, algumas das proteínas depositadas podem iniciar diferentes vias de coagulação.

Inicialmente, o fator de von Willebrand (fator VIII) age como mediador da anexação das plaquetas na superfície. Então alguns constituintes internos são liberados de plaquetas agregadas para o plasma. Essas transformações são essenciais, tornando disponíveis tanto proteínas específicas como fosfolipídios da membrana das plaquetas, que são de suma importância para a aceleração e controle do processo de coagulação. A ativação de plaquetas também pode ser iniciada pela trombina, adenil-difosfato e outros reagentes. Também pode ser produzida por turbulência no fluxo sanguíneo e é função da taxa de fluxo.

2.1.1) Via intrínseca de coagulação:

O contato com superfícies artificiais com o sangue provoca a ativação da fase de contato, que é a ativação do mecanismo de coagulação. Este processo envolve diversas proteínas como o quininogênio de alto peso molecular (HMWK), pré-calcreína, calcreína, fatores XII e XIIa e fatores XI e XIa. Seus complexos são ligados à superfície estranha por uma

cascata de reações enzimáticas que resulta numa maior quantidade de fator XIa ligado à superfície.

A enzima XIa inicia uma seqüência de reações enzimáticas que resultam no fator IIa (trombina). A taxa das reações é lenta e dependente do cálcio, porém, podem ser aceleradas pela presença do fator de plaqueta 3 (PF3), das membranas de plaquetas, e dos co-fatores VIIIa e Va.

2.1.2) Via extrínseca de coagulação:

Esta é uma via alternativa para a ativação da coagulação, que ocorre quando o sangue entra em contato com superfícies naturais diferentes do endotélio do vaso sanguíneo. Na presença de tromboplastina do tecido (fator III) e íons de cálcio, o fator VII é ativado e essa atividade enzimática provoca a ativação dos fatores IX e X. À partir de então, a formação da trombina ocorre como na via intrínseca.

2.1.3) Formação do coágulo:

O contato de materiais com o sangue provoca a formação de trombina, como foi descrito anteriormente, que é a principal enzima da coagulação do sangue e possui várias funções.

A trombina é capaz de induzir a agregação de plaquetas e sua liberação. Também é capaz de catalisar sua própria formação. Além do mais, a trombina é a principal responsável pela ativação do fator XIII. É capaz de ativar o fibrinogênio em uma reação de hidrólise que leva aos fibrinopeptídeos A e B e o polímero solúvel de fibrina. As ligações cruzadas da fibrina solúvel são catalisadas pelo fator XIII, formando o coágulo de fibrina insolúvel. Plaquetas agregadas, outras células sanguíneas e proteínas do plasma também são presas na rede de fibrinas ligadas.

2.2) Sistemas de controle da coagulação:

Tendo em vista todo o processo de coagulação, a não formação de coágulos ocorre apenas quando o sangue entra em contato com um tipo de material: o endotélio dos vasos sanguíneos. Por esta observação podemos ver que o endotélio não apresenta-se uma

superfície anti-coagulante como também apresenta meios para controlar a cascata de coagulação.

Uma das formas que o endotélio se utiliza para este controle é pelo sistema fibrinolítico. A ativação do sistema fibrinolítico é resultante da hidrólise do plasminogênio, catalisada enzimaticamente pelo fator XIIa. A plasmina, que é uma enzima formada durante esta reação, promove reações que acarretam na fibrinólise e subsequente destruição do coágulo.

Outra forma para se inibir a formação de coágulos é a utilização de antiproteases e heparina. O sangue apresenta diversas proteínas que desempenham papéis importantes no controle da coagulação. Esses inibidores são capazes de formar complexos com diversas proteases, a várias taxas.

O mais potente inibidor plasmático é a antitrombina III, que forma um complexo estável e inativo com proteases como os fatores IIa, IXa, Xa, XIa e a calicreína. A reação é irreversível e lenta. A heparina, presente em tecidos subendoteliais e endoteliais atua como catalisador da formação do complexo antitrombina III - trombina. A heparina interfere nas etapas finais da cascata de coagulação, impedindo a transformação da protrombina em trombina, o que provoca a não ocorrência da conversão de plasminogênio em plasmina. A heparina se liga à antitrombina III, tornando a sua molécula muito mais ativa no seu papel de provocar a inibição da trombina. [14] [17]

2.3) A heparina:

É um mucopolissacarídeo sulfatado composto por cadeias alternadas de D-glucosamina e ácido úrico. Seu peso molecular varia de 5.000 até 30.000 daltons. Comercialmente falando, a heparina é derivada de tecidos bovinos e porcinos, mais precisamente da mucosa intestinal porcina e do pulmão bovino.

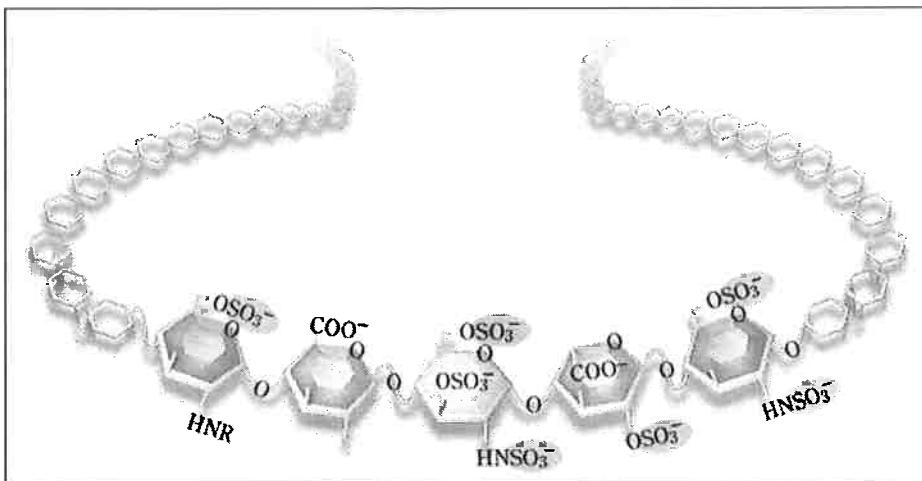


Figura 2: Estrutura da heparina. [18]

Sua ação é a de acelerar a atividade da antitrombina III (ATIII). Isto ocorre devido a presença de uma seqüência de pentassacarídeos com alta afinidade de se ligar à ATIII. A interação da heparina com a ATIII provoca uma mudança conformacional na ATIII, que acelera sua habilidade de inativar as enzimas de coagulação como a trombina (fator IIa), fator Xa e o fator IXa. A heparina catalisa a inativação da trombina pela ATIII, atuando como um molde ao qual a enzima e o inibidor se ligam para formar um complexo ternário. As moléculas de heparina que não possuem pelo menos 18 sacarídeos não conseguem ligar-se à enzima e à ATIII simultaneamente, não desempenhando o papel esperado. Em quantidades superiores às necessárias para catalisar a atividade da ATIII, a heparina catalisa a inativação da trombina através de um segundo fator plasmático, o cofator II da heparina. É necessário aproximadamente 20 vezes mais heparina para inativar a trombina ligada à fibrina do que a trombina livre. Como a heparina não quebra os coágulos existentes, é necessário atingir rapidamente a sua quantidade terapêutica.

A heparina interfere nas etapas finais da cascata de coagulação, mais precisamente na conversão da protrombina (fator II) em trombina. Caso houvesse formação de trombina, esta promoveria conversão do fibrinogênio (fator I) em fibrina, originando o coágulo. O papel da heparina é a de impedir a conversão da protrombina em trombina, ocasionando uma parada na cascata de coagulação.

A trombina (fator IIa), por ação enzimática, converte o fibrinogênio em fibrina e também ativa os cofatores V e VIII, acelerando a formação do coágulo de fibrina pela via intrínseca. A ação enzimática da trombina é impedida por uma glicoproteína do plasma, a

antitrombina III. A heparina liga-se à antitrombina III, tornando a glicoproteína mais ativa em relação à inibição da trombina, impedindo assim a conversão do fibrinogênio. A antitrombina III também atua como inibidor dos produtos ativados dos fatores IX, X, XI e XII e, a heparina consequentemente impede a ação destes fatores. A funcionalidade da heparina varia de acordo com o seu peso molecular. Quanto maior o peso molecular da heparina, mais efetiva é a inibição da trombina.

A duração dos efeitos da heparina depende da velocidade de sua remoção da circulação. A estrutura macromolecular da heparina sugere sua distribuição quase que limitada às células endoteliais e à corrente sanguínea. Certa porcentagem da heparina presente é captada pelos pulmões e pelo figado e o restante é filtrado para a urina, inativada por uma enzima chamada de heparinase ou absorvida na superfície das hemácias.

Sendo a heparina extremamente ácida, para uso clínico é preparada como um sal de sódio ou cálcio. A mais utilizada é a heparina sódica. Por se tratar de um produto de extração biológica, os preparados podem sofrer variações de atividade entre diferentes lotes. O padrão mais utilizado para determinar a potência de um extrato de heparina é o da farmacopéia internacional (unidades internacionais, UI). No caso da farmacopéia americana, é definido uma unidade de heparina (1 USP) como a quantidade de heparina necessária para manter a fluidez de um mililitro de plasma de carneiro por uma hora, após a sua recalcificação. [12] [13] [17]

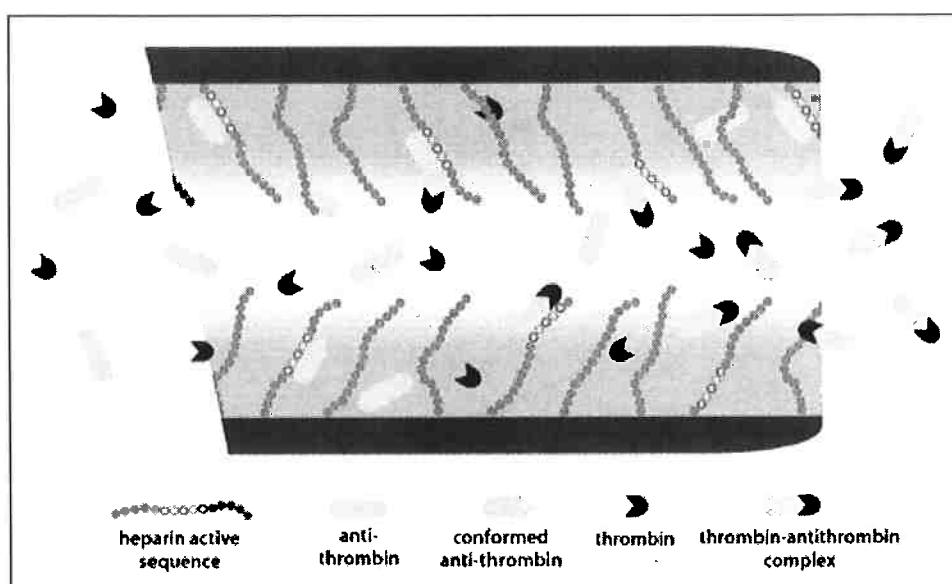


Figura 3: Representação da passagem do plasma sanguíneo no tubo de material heparinizado. [19]

É admitido que cada um miligrama de heparina corresponde à atividade de aproximadamente 100 UI. Em geral as doses de heparina usadas na circulação extra-corpórea são de 3 a 4 miligramas por quilo de peso corporal do paciente (ou 300 a 400 UI/kg). A heparina geralmente é injetada pelo cirurgião no interior do átrio direito do paciente, antes das canulações. A duração do efeito da heparina é dependente da quantidade de heparina administrada e da velocidade de eliminação da droga. Alguns pacientes necessitam de doses maiores de heparina que outros e isto é conhecido como resistência à heparina. O problema de contato do sangue com materiais sintéticos em suscitado a busca de alternativas à anticoagulação sistêmica. Diversos projetos incluem a produção de cânulas, tubos, oxigenadores e reservatórios, com superfícies impregnadas de moléculas de heparina, ou com as moléculas de heparina quimicamente ligadas aos materiais, buscando a redução da necessidade de anticoagulação.

2.4) Formas de ligação da heparina nos materiais sintéticos:

Pesquisas foram e estão sendo realizadas buscando-se a melhoria da performance de biocompatibilidade dos materiais. Em sua maioria, procuram efetuar modificações químicas para melhorar a hemocompatibilidade, ligando-se a heparina no material. Atualmente, há diversas formas de se ligar a heparina mas todas têm seu princípio dentro deste grupo: adsorção física da heparina, ligação covalente, ligação iônica e grafitização.

2.4.1) Adsorção física da heparina:

A primeira tentativa de se heparinizar um material foi feita com um recobrimento constituído de grafite e cloreto de benzalcônio, em 1963 por Gott et al. A heparina era ligada eletrostaticamente pelos seus grupos aniónicos ao detergente cloreto de benzalcônio, que havia sido anteriormente adsorvido no substrato impregnado de grafite. Como este detergente com a heparina eletrostaticamente ligada se desadsorvia da superfície quando exposto ao plasma ou outras soluções contendo plasma, as tentativas de melhoria da ação da heparina imobilizada continuaram a ser feitas. Muito freqüentemente os grupos

aniônicos da heparina são ligados com grupos de amônio quaternário fixados na superfície do material. [5]

2.4.2) Ligação covalente da heparina:

Quando se busca a ligação da heparina ao material (substrato) covalentemente, em primeiro lugar é feita a funcionalização do substrato. Para tal, utiliza-se um solvente para atacar a superfície do substrato e permitir que haja cargas livres na mesma. Estas cargas são de vital importância para o processo já que nelas é que vão ser ligados os espaçadores hidrofilicos, que servirão de ponte entre a heparina e o substrato. Estes espaçadores criam uma superfície inerte ou passiva no substrato, reduzindo a adsorção de proteínas e a adesão celular. Também mantém a bioatividade da heparina por causa de seu comprimento e a mobilidade que sua cadeia, o que permite que a heparina interaja com as células sanguíneas.

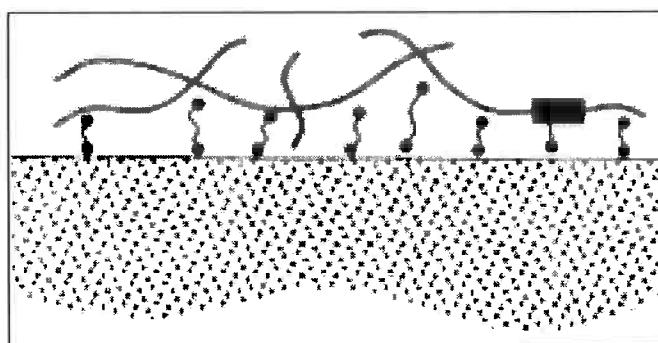


Figura 4: Heparina ligada covalentemente no substrato. [11]

A mobilidade e o distanciamento são de imensa importância no processo de heparinização pois a heparina possui apenas uma parte que é importante para a não coagulação do sangue (segmento de pentassacarídeos). Estes segmentos não podem estar ligados e devem ter uma boa mobilidade para poder ter um desempenho otimizado, o que só pode ser alcançado com o uso de espaçadores hidrofilicos. A heparina pode ser ligada aos espaçadores covalentemente através dos grupos carboxil, hidroxil ou amina presentes em sua molécula.

2.4.3) Ligação iônica da heparina:

A heparina possui um caráter aniónico forte e, devido à isso, é possível ligá-la ionicamente a superfícies catiônicas. Vários estudo foram realizados, sempre preparando-se polímeros poliacatiônicos sendo tratados com heparina, de diversas formas. Uma das formas possíveis

é o complexo formado pelo cloreto de tridodecil metil amônio e a heparina (TDMAC-heparina). Independente da técnica utilizada, as superfícies biocompatíveis formadas apresentavam bom desempenho até que começasse a liberar a heparina ionicamente ligada, na corrente sanguínea. Isto ocorre especialmente quando compostos com a albumina, que possui forte afinidade iônica, estão presentes.

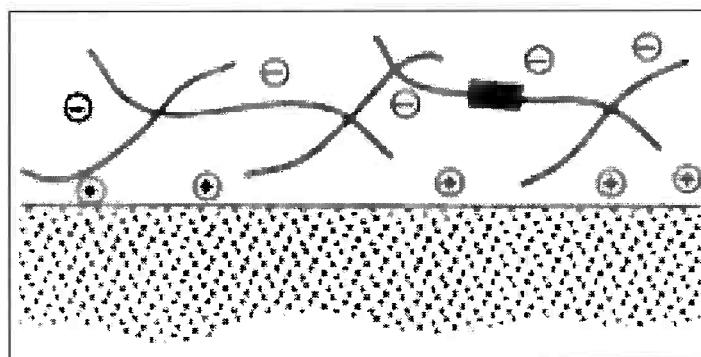


Figura 5: Heparina ligada ionicamente. [11]

Um exemplo deste tipo de ligação é o processo Carmeda. Se baseia no ataque da superfície do biomaterial com ácido para criar sítios iônicos. Em seguida, há a adsorção de polietileno imina, formando uma ligação iônica deste com o substrato. A heparina degradada, que contém um grupo aldeído no fim de cadeia, é ligada à superfície aminada. Para se conseguir uma ligação estável é feita uma aminaçãao redutora. [4] [6] [11]

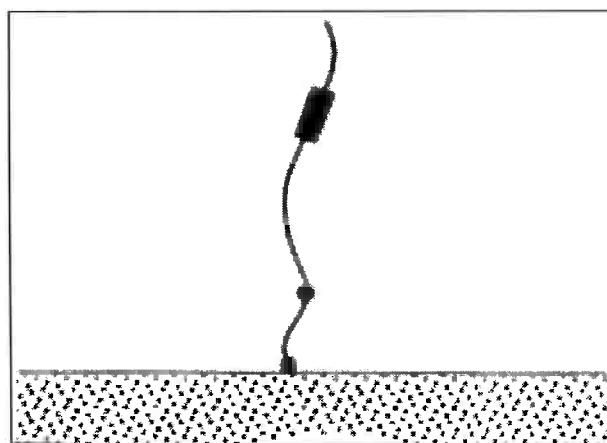


Figura 6: Heparina ligada no substrato pelo processo Carmeda. [11]

2.4.4) Grafitação da heparina:

A modificação da superfície do polímero pelo tratamento com diferentes fontes de energia provoca a formação de radicais na superfície polimérica. Algumas das formas de energia que podem ser utilizadas são a radiação ionizante e a descarga elétrica. Comparando-se este tipo de modificação superficial com as modificações químicas de outros procedimentos, vê-se que há algumas vantagens em se utilizar o primeiro procedimento citado. As principais são a não necessidade de se utilizar um catalisador ou iniciador químico e a possibilidade de tratamento de objetos com formatos complexos. Além disso, o processo de descarga de plasma também pode ser utilizado para incorporar grupos funcionais na superfície do material. Por exemplo, para se incorporar o grupamento $-NH_2$ no substrato, utiliza-se descargas de amônia. Porém, um ponto negativo que torna sua aplicação restrita é o seu custo.

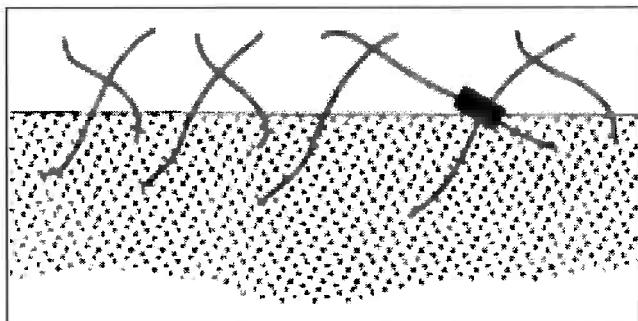


Figura 7: Heparina grafitizada na superfície do substrato. [11]

A preparação da superfície para este tipo de tratamento superficial segue os seguintes passos: inicialmente a superfície é exposta à fonte de energia, para gerar os radicais livres na superfície. Havendo monômeros nesta superfície ativada, a cadeia polimérica irá iniciar sua propagação à partir dos sítios reativos formados. Neste ponto, pode haver dois eventos simultâneos: a grafitização e a homopolimerização. O processo final envolve uma extração completa do homopolímero e do monômero com um bom solvente.

2.5) Métodos de caracterização do recobrimento superficial com heparina:

Vários métodos diferentes podem ser aplicados no estudo da modificação superficial de polímeros, dentre os quais os mais usualmente utilizados são a espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (ATR - FTIR), a espectroscopia de elétrons

para análise química (ESCA), a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a cromatografia. [9]

2.5.1) ATR-FTIR e ESCA:

Estes dois processos permitem a obtenção de espectros do substrato, que possui picos característicos referentes às ligações químicas entre os elementos formadores do polímero e da heparina que está modificando sua superfície. Fazendo-se uma comparação entre os espectros do polímero antes e depois de ser modificado, e sabendo-se quais os picos característicos, pode-se verificar se a modificação superficial foi efetiva ou não, devido à presença de ligações químicas diferentes.

No caso do ATR-FTIR, os espectros são fornecidos como absorbância pelo comprimento de onda da vibração das ligações químicas do material. Os picos característicos da heparina que são mais utilizados são os de comprimento de onda de cerca de 1200 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} , referentes ao grupo SO_3^- presente na heparina. [7]

Para o ESCA, o espectro é dado como intensidade por energia da ligação. Um dos grupos que pode ser utilizado para a caracterização da heparina é o NHSO_3^- , do pico de 398,48 eV, no caso estudado por Chen et al. [8]

2.5.2) Microscopia eletrônica de varredura:

Utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura pode-se observar modificações superficiais no substrato, que indica a presença da heparina através do aspecto da superfície. Também pode ser utilizado a contagem de átomos do material para confirmação da modificação. Observa-se, da mesma forma, a distribuição do recobrimento superficial sendo possível a verificação da espessura da camada formada, fraturando-se o material com nitrogênio líquido e observando-a no MEV. [9]

2.5.3) Cromatografia:

A presença de heparina na superfície do polímero pode ser verificada utilizando-se o método colorimétrico usando as propriedades metacromáticas do azul de toluidina. Para

isto, mede-se a absorbância no comprimento de onda de 631 nm da solução antes e após o tratamento. Uma forma alternativa é a utilização da cromatografia iônica com detecção amperométrica pulsada, que fornece resultados com a devida sensibilidade e seletividade para a realização de uma análise quantitativa. Esta determinação pode ser feita com a hidrólise da heparina em glucosamina e ácido glucurônico, utilizando-se uma curva de calibração de glucosamina (resposta do detector pela quantidade de glucosamina). [10]

2.6) Testes de biocompatibilidade:

A biocompatibilidade dos materiais pode ser estudada utilizando-se testes de natureza hematológica, biológica e física. No teste hematológico é verificado alterações do sangue que podem vir a ser causadas pelo contato com o material estranho. Essas alterações são medidas de acordo com o retardo da coagulação do sangue não heparinizado, liberação de hemoglobina das hemácias, contagem das plaquetas e leucócitos e o estudo das proteínas plasmáticas e dos fatores de coagulação. O teste biológico verifica a presença e o grau de toxicidade do material para os tecidos. Utilizando-se este teste foi verificado que os polímeros de polivinil, nylon, silicone e látex apresentam elevada inércia química e biológica. Não liberam produtos tóxicos nos tecidos e não absorvem elementos dos tecidos em que entram em contato. O teste físico verifica a correlação das propriedades físicas das superfícies estranhas e seus possíveis efeitos no sangue. Dessa forma, os materiais devem apresentar baixa tensão superficial, impermeabilidade, superfícies com o mínimo de coeficiente de atrito e apresentar cargas elétricas negativas. [17]

3) MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1) Materiais:

- heparina sódica (Liquemine®), ampolas de 5 ml com 5.000 UI por ml, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A..
- heparinato de benzalcônio (BAC Heparin), 1,5% (w/v) em isopropanol com 713 USP unidades de heparina/ml, STS Biopolymers, Inc..
- cloreto de benzalcônio USP, LABSYNTH.
- álcool isopropílico, LABSYNTH.
- soro fisiológico com 0,9% de cloreto de sódio.
- espectrômetro de FT-IR, MAGMA IR 560 E.S.P., Nicolet.
- acessório de refletância total atenuada A.R.K. modelo 0055-3XX com cristal de Germânio, Spectra-Tech Inc..
- tubos de circulação sangüínea extracorpórea de PVC, fabricados por Afa Plásticos Ltda, obtidos no Instituto do Coração (InCor).
- bomba de vácuo.
- DMTA modelo Rheometrics Scientific DMTA V.
- microscópio eletrônico de varredura modelo Philips XL-30.

3.2) Métodos:

3.2.1) Adequação dos corpos de prova:

Para poder observar as amostras dos tubos de PVC no FT-IR foi necessário prensar a quente os tubos (no laboratório de Bioengenharia do InCor) formando placas de PVC. Para adequar suas dimensões às do cristal do FT-IR, cortou-se corpos de prova retangulares com dimensões de (8,90x70,30)mm, já que melhores resultados podem ser obtidos se toda a superfície do cristal estiver coberta.

3.2.2) Aplicação do heparinato de benzalcônio:

Colocou-se um volume de 20 ml da solução BAC heparin, na forma em que foi adquirida, em um tubo de ensaio com tampa. Para realizar o tratamento, os corpos de prova foram

imersos na solução contida nos tubos de ensaio por um tempo determinado, que variou de 5 minutos a uma hora. A secagem após o tratamento foi feita em ambiente aberto.

3.2.3) Lavagem dos corpos de prova após tratamento:

Utilizando os tubos de ensaio com tampa, colocou-se 20 ml de soro fisiológico dentro deles. A lavagem foi feita de modo estático, deixando os corpos de prova tratados no soro por um determinado tempo, que foi variável para poder ser observado a influência do tempo de lavagem na quantidade de heparina que permanece ligada à superfície da amostra.

3.2.4) Verificação da presença de heparina nas amostras de PVC:

Espectros FT-IR padrões foram obtidos de todas as amostras de PVC e dos agentes de modificação, heparina e BAC-heparin. Foi feita a evaporação de um pequeno volume (5ml) da solução de BAC heparin em uma placa de Petri, até completa evaporação com obtenção de resíduo sólido. O sólido BAC-heparin foi solubilizado utilizando-se álcool isopropílico, e esta nova solução foi aplicada em uma pastilha de KBr e em seguida evaporada. A pastilha de KBr recoberta com a amostra foi submetida à análise por espectrofotometria no infravermelho, utilizando-se o equipamento de análise por transmissão. Procedimento similar foi aplicado para obtenção de espectro da heparina sódica.

Comparando-se o espectro da heparina e do BAC-heparin com os de PVC tratado, pôde-se descobrir as freqüências de absorção dos picos característicos da heparina que não sofrem interferência do espectro do PVC.

3.2.5) Levantamento da curva de calibração de heparina sódica:

Modificando a concentração das soluções de heparina sódica, pôde-se, através de seus espectros de infravermelho, obter uma curva de calibração que nos fornecesse a quantidade de heparina presente nas amostras tratadas com BAC heparin e nas amostras lavadas. Isso foi possível uma vez que esperasse uma correlação linear entre as concentrações de

heparina e as diferentes absorbâncias observadas pelo FT-IR. Sabendo qual a absorbância, pôde-se determinar a quantidade de heparina que permaneceu ligada ao PVC.

3.2.6) Verificação das diferenças entre os tipos de PVC utilizados:

As cânulas de PVC utilizadas em circulação sanguínea extracorpórea apresentam dois tipos diferentes de material sendo um deles mais rígido e outro mais flexível, para que este possa passar em roletes que vão bombeiar o sangue. Apesar de haver dados disponíveis sobre os mesmos, obtidos através do fabricante, foi feita uma análise em DMTA para verificar as diferenças entre os materiais. Para tal, foram feitos corpos de prova com comprimento de 20 a 23 mm ($\pm 0,05$), largura de 4 a 5 mm ($\pm 0,05$) e espessura de 1 a 1.2 mm ($\pm 0,05$). Foi aplicada uma freqüência de 1 Hz durante o ensaio, com a faixa de temperatura entre -100 e 100 °C e taxa de aquecimento de 1 °C por minuto.

3.2.7) Quantificação da heparina na superfície do PVC:

A obtenção da curva de calibração da heparina nos permitiu quantificar a heparina presente na superfície das amostras de PVC. Para isso, utilizamos um de seus picos característicos que apresentasse absorbância suficiente para ser lido e diferenciado do espectro do PVC. Dessa forma, o pico escolhido foi o de comprimento de onda de 1035 cm⁻¹. Comparando-se a absorbância do pico no espectro da amostra com a curva de calibração, encontrou-se a quantidade relativa de heparina no PVC. Para resultados mais precisos, utilizamos a equação da curva de calibração para cálculo da quantidade de heparina presente na superfície do material.

3.2.8) Verificação visual da modificação da superfície do PVC com MEV:

Para confirmar os resultados obtidos através de análises espectrométricas, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura. As amostras do material modificado foram metalizadas em ouro para poderem ser vistas no MEV. Utilizou-se aumentos variáveis, até o máximo de 5000x.

4) RESULTADOS:

Inicialmente, de acordo com os objetivos propostos na concepção do trabalho, foi feito um levantamento de informações que pudessem auxiliar na obtenção e interpretação dos resultados desejados, buscando-se dados e informações obtidos em outras pesquisas referentes ao assunto que estamos tratando.

A primeira questão levantada foi a de que forma seria feita a heparinização do tubo de circulação extracorpórea de sangue, confeccionado em PVC. Várias formas foram utilizadas em diversos artigos que tratavam do assunto, sempre partindo da heparina e alguma solução que atuaria como uma ligação entre o PVC e o anticoagulante (heparina). Também havia modos de heparinização que utilizavam bombardeamento de partículas, mas que foram descartados por não estarem disponíveis, e além disso, é nosso objetivo desenvolver um processo simples de modificação que possa ser realizado sem investimento significativo em equipamento e treinamento (conforme solicitação do Instituto do PVC). Sabia-se que seria necessário ligar a heparina ao PVC utilizando-se um outro composto mas não havia sido decidido ainda qual seria o método utilizado para tal, nem qual o composto que seria a ligação entre heparina e PVC. Várias possibilidades foram encontradas, dentre as quais utilizar quitosana, poli(óxido de etileno), cloreto de benzalcônio, etc. Através de uma pesquisa mais aprofundada foi encontrada uma solução que poderia ser aplicada diretamente no material e que apresentaria os mesmos resultados que outros processos mais conhecidos. O ponto de partida para a modificação dos tubos de PVC foi a obtenção de tal solução (BAC Heparin 1,5% em isopropanol, 713 USP unidades de heparina/ml) e sua aplicação nos tubos de PVC para verificar sua eficácia.

Visto que inúmeros métodos poderiam ser utilizados para verificar a fixação da heparina no PVC ou não, foi escolhido o que estava disponível e poderia fornecer dados quantitativos, mediante calibração. Então foi decidido utilizar espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) com o acessório para refletância da superfície de um sólido ou líquido em contato com um cristal de Germânio (NICOLET - MAGMA IR 560 spectrometer - E.S.P. com A.R.K. - Attenuated Total Reflectance Kit), disponível no laboratório do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da USP.

Para obter melhores resultados foi necessário abrir os tubos e prensá-los para que pudessem ser cortados no formato do cristal do equipamento. Foram feitos oito corpos de prova dentre os dois tipos de PVC utilizados para confeccionar os tubos. Antes de tratar os corpos de prova com a solução de heparina belzacônio foi feito seu espectro de infravermelho (Figura 8) a fim de compará-lo com o espectro obtido após o seu tratamento (Figura 9).

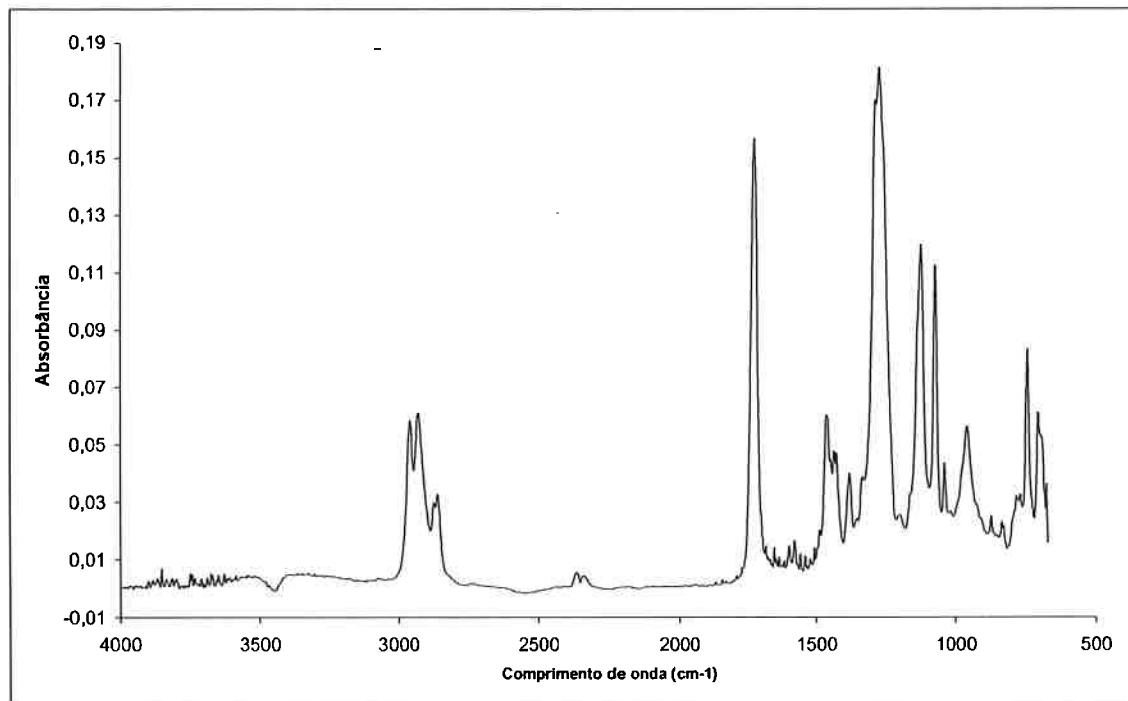


Figura 8: Espectro FTIR de amostra de PVC

Como os resultados obtidos para todas as amostras de PVC são semelhantes à acima, não foram todas incluí-las neste relatório.

O tratamento para modificação dos corpos de prova consistiu na sua imersão na solução BAC-heparin por uma hora. Retirados da solução, ficaram por um dia na estufa para retirar o excesso. Assim, foi feito novo espectro dos corpos de prova (Figura 9), desta vez já tratados, para verificar a presença ou não da heparina em sua superfície.

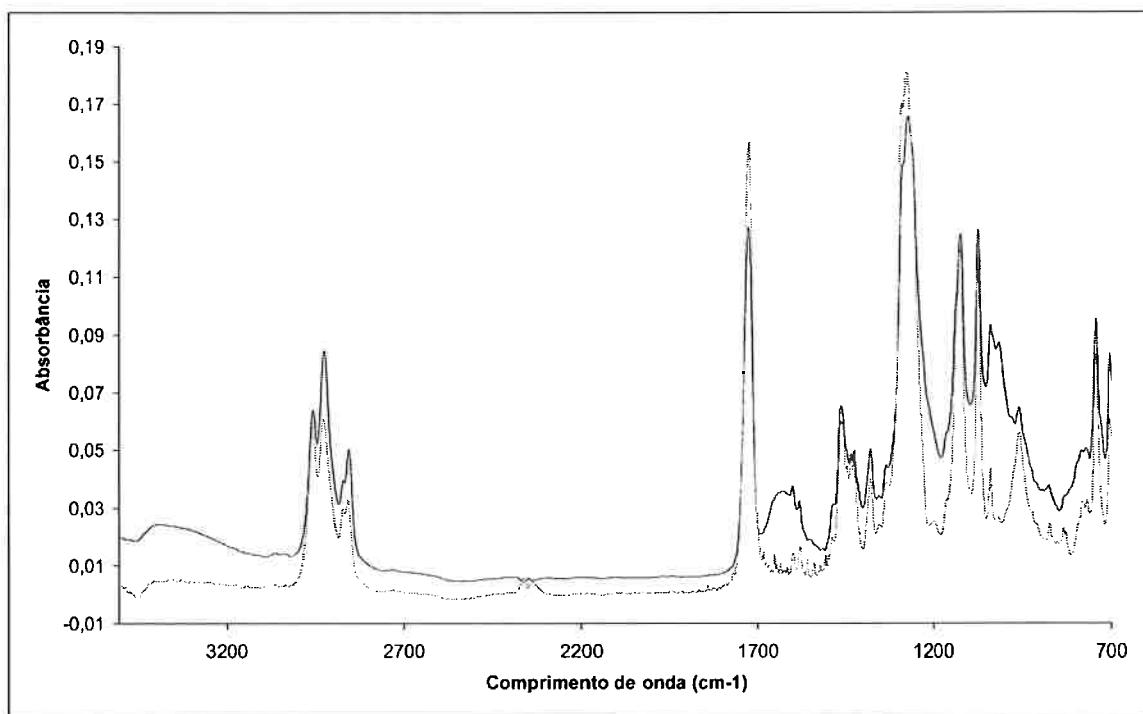


Figura 9: Espectros do PVC tratado (preto) e não tratado (cinza).

Comparando com os espectros obtidos anteriormente, é possível notar certas diferenças em especial em determinados comprimentos de onda, o que demonstra a presença de diferenças entre os corpos de prova pré e pós tratamento. Após o tratamento e o levantamento do espectro, os corpos de prova foram divididos em 2 grupos, sendo que em um deles os corpos foram lavados por um período de 1 hora e no outro grupo, 30 minutos. Novamente foram obtidos os espectros dos 2 grupos de amostras a fim de se fazer a comparação entre eles. Nesta etapa do projeto todos os tratamentos foram feitos estaticamente, da mesma forma que a lavagem dos corpos de prova.

Após obtido o espectro do PVC e tratada a amostra com a solução de BAC heparin, obteve-se o espectro da amostra tratada. Após tratamento de uma hora e obtenção de espectro (amostra tratada), lavou-se a amostra por uma hora e obteve-se novo espectro (amostra lavada). Os dois espectros estão juntos na Figura 10.

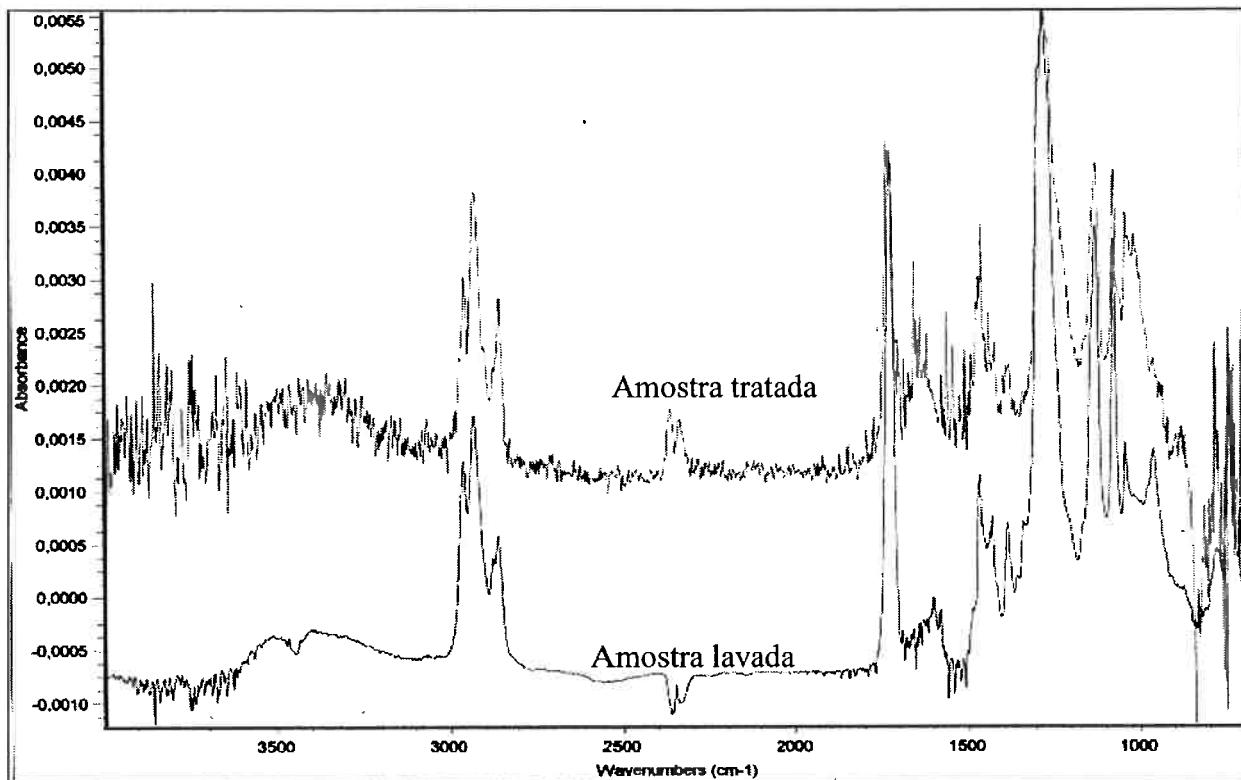


Figura 10: Espectros da amostra tratada e lavada.

Percebe-se que os espectros acima, em especial o da amostra tratada, apresentam muita interferência, não sendo possível deduzir muitas informações a partir deles. A interferência ocorreu devido à presença de ar entre a amostra e a superfície do cristal, isto é, não há contato efetivo entre a amostra e o cristal, o que nos permite deduzir que há algo entre os dois, no caso, macromoléculas de heparina. Para tentar resolver esse contratempo aumentou-se o número de espectros acumulados para 256, uma vez que os espectros acima foram feitos com 32 espectros acumulados. Assim, esperava-se diminuir drasticamente a interferência. O espectro conseguido, para a amostra tratada, aparece na Figura 11.

Para termos certeza de que a heparina estava realmente presente na amostra de PVC, foi feito o levantamento do espectro do BAC-heparin. Na Figura 12 é apresentado o espectro do PVC (em cinza) e do BAC heparin (em preto).

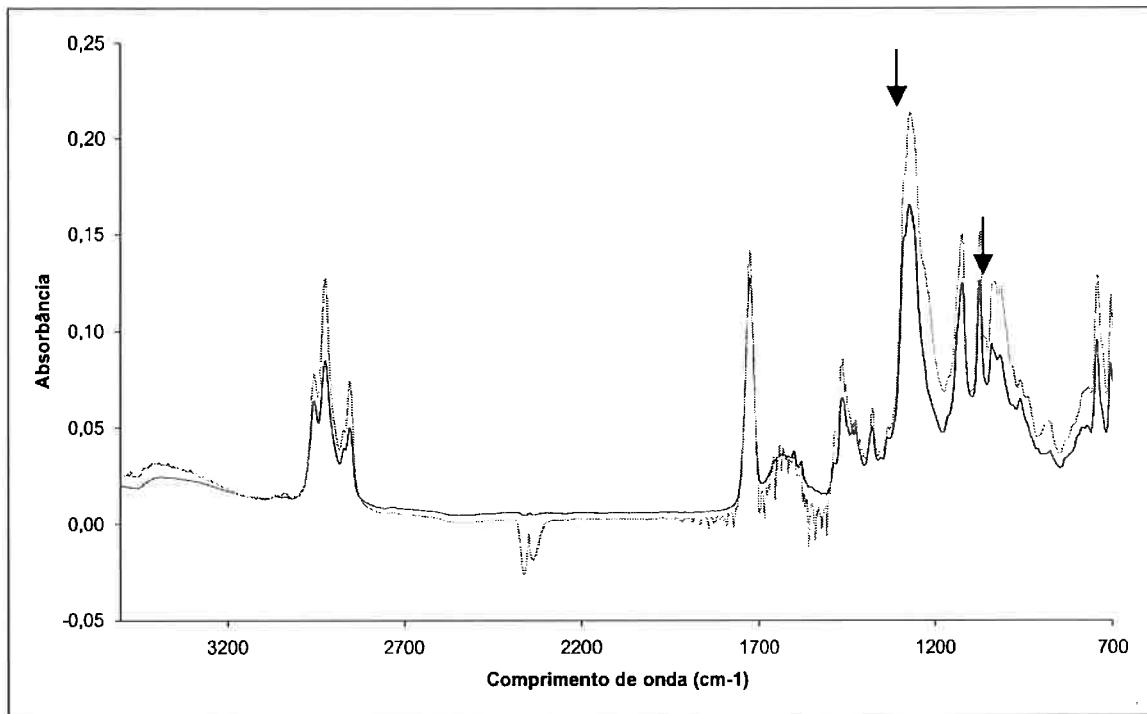


Figura 11: Espectro da amostra tratada (cinza) e lavada (preto).

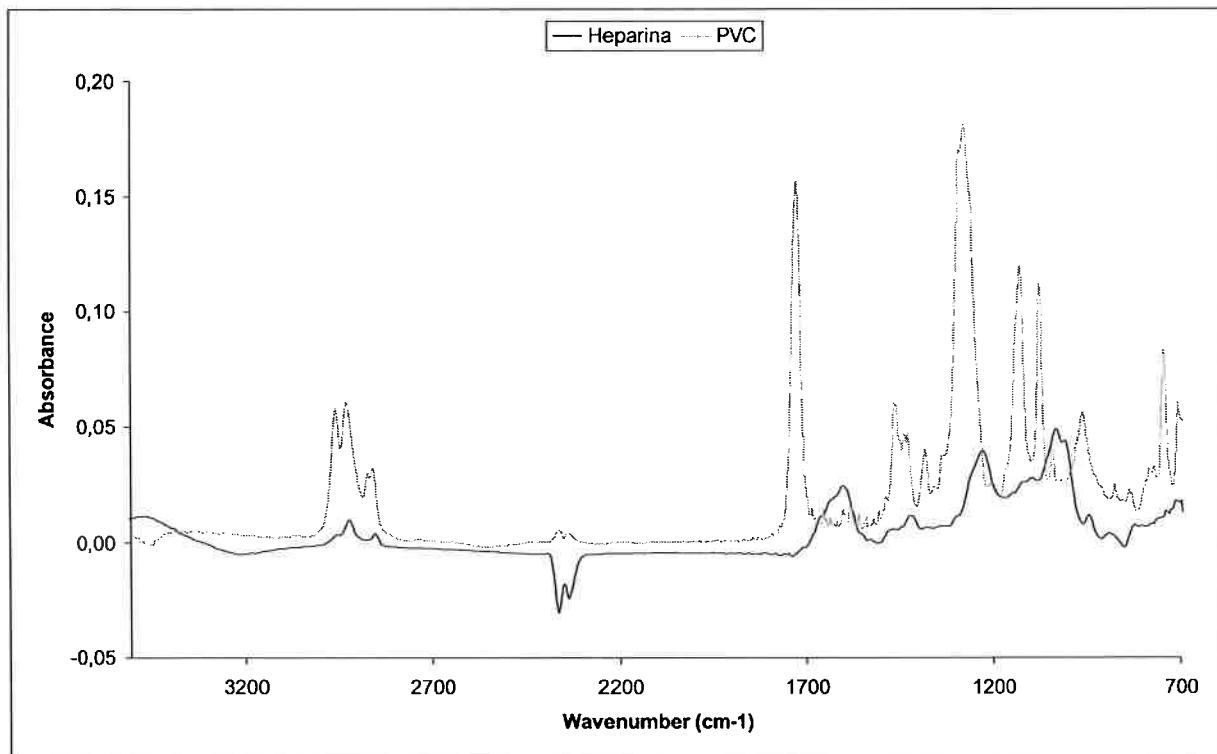


Figura 12: Espectros FTIR: (1) do PVC (em cinza) e (2) do BAC heparin (em preto)

Comparando-se os dados obtidos na figura acima com algumas referências bibliográficas, pode-se afirmar que há presença de heparina na amostra de PVC tratada com BAC heparin.

Os picos de BAC heparin localizados em 1234 cm^{-1} e 1034 cm^{-1} que aparecem assinalados na Figura 11 são os picos com alta intensidade, sem interferência do espectro de absorção do PVC, que podem ser utilizados para quantificação da heparina.

A observação destes picos nas amostras tratadas de PVC foi possível após subtração do espectro de PVC sem tratamento.

Terminada esta etapa do trabalho, uma outra meta, com um caráter mais quantitativo que qualitativo, iniciou-se. Após verificar a presença de heparina nos tubos de PVC foi necessário quantificar o quanto ficou ligado, através da obtenção de uma curva de calibração, que nos permitiria saber não apenas quanto ficou ligado nos tubos, mas também quanto é liberado na passagem de sangue pelo tubo. Para tal, utilizou-se heparina sódica que é aplicada diretamente na corrente sanguínea e comercializada com o nome de LIQUEMINE, com concentração inicial de 5000 USP/ml. Foram levantados os espectros da heparina sódica em diferentes concentrações, o que permitiu a obtenção de uma curva de calibração, que nos forneceu a quantidade de heparina de acordo com a absorbância em determinados comprimentos de onda representantes da heparina.

O espectro FTIR da heparina sódica com a concentração utilizada comercialmente (Figura 13), Liquemine®, não se apresenta adequado para calibração quantitativa. O espectro apresenta alta interferência da água, uma vez que a presença de heparina é mínima comparando-se com a presença de água. O espectro apresenta os picos característicos do espectro da água, sendo que estes camuflam o espectro da heparina. Basta observar que, no intervalo de 1500 a 1000 cm^{-1} de comprimento de onda quase não há presença dos dois picos característicos da heparina. Como esta solução seria a nossa base, que representaria 100 % na quantificação da heparina, sua diluição tornaria os picos citados imperceptíveis, o que não possibilitaria a confecção da curva de calibração.

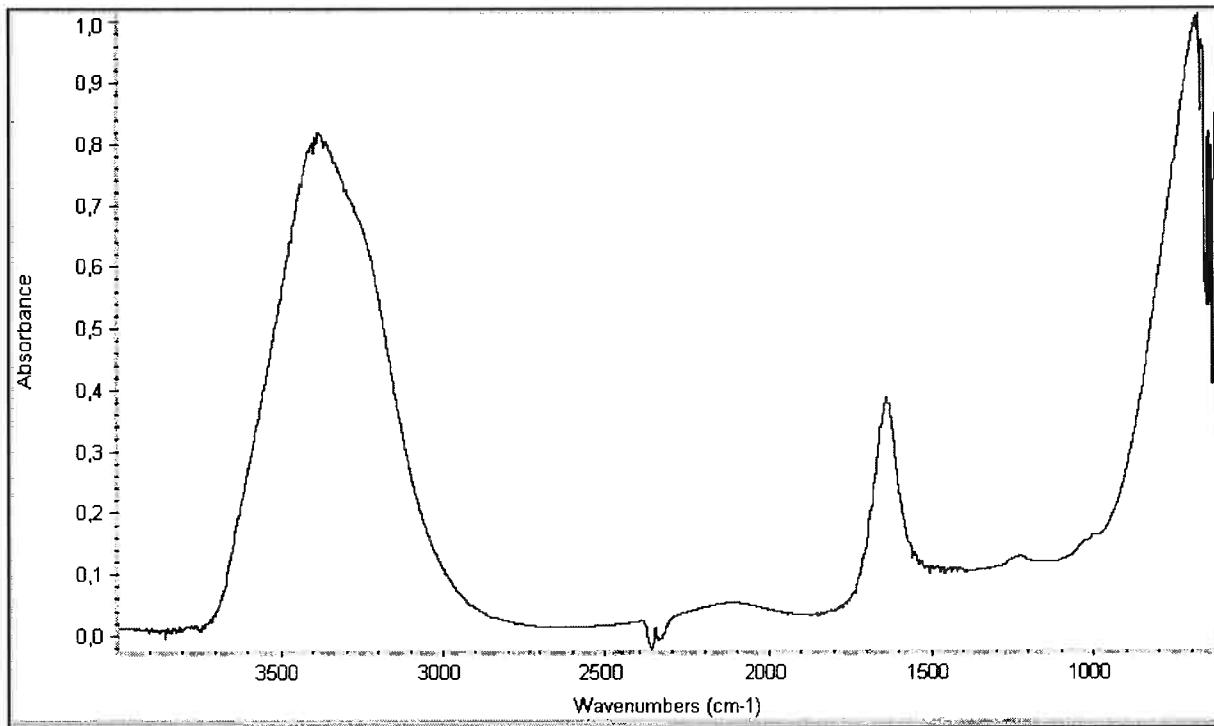


Figura 13: Espectro da heparina sódica.

Assim, foi necessário obter uma solução de heparina com maior concentração que a disponível. Para tal foi decidido que seria necessário concentrar a solução aquosa de heparina sódica comercial disponível. Optou-se por fazer isso utilizando uma bomba de vácuo, uma vez que a eliminação de água por aquecimento da solução poderia ocasionar degradação da heparina. Dessa forma, conseguiu-se obter uma solução com 75 000 USP em 3,2 ml de volume, sendo que comercialmente, a solução de heparina apresenta 5 000 USP por ml. Utilizando esta solução concentrada como o valor de referência de 100%, pudemos obter os demais valores para confecção da curva de calibração a partir da diluição da referência.

Como foi dito anteriormente, há dois picos característicos da heparina no espectro das amostras tratadas e lavadas. Dessa forma, é possível obter duas curvas de calibração, uma para cada comprimento de onda do pico característico. A figura 14 apresenta a curva de calibração para o pico de comprimento de onda de 1230 cm⁻¹.

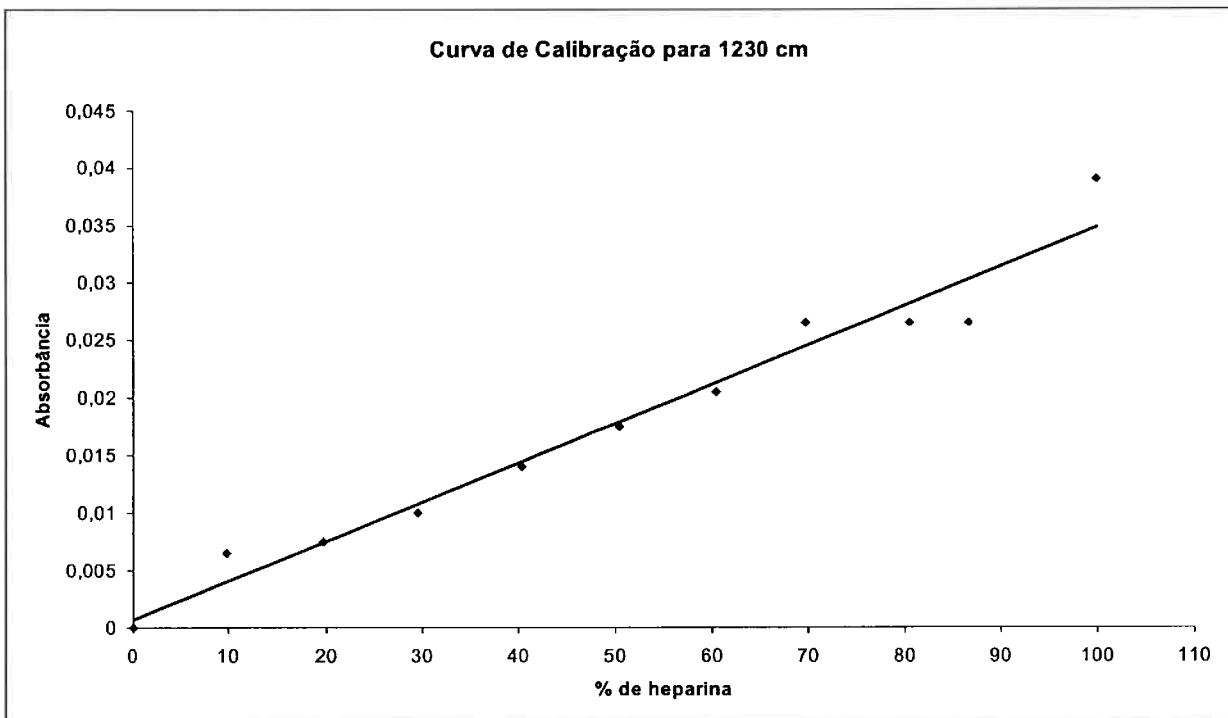


Figura 14: Curva de calibração da heparina, para o pico de 1230 cm⁻¹.

Porém, para o pico de comprimento de onda de 1010 cm⁻¹, a quantidade de dados não foi suficiente para se obter uma curva precisa, uma vez que sua intensidade, para as amostras de heparina de menor concentração, se confundia no espectro da água contida na solução. Com os poucos dados encontrados, levantou-se uma curva grosseira e comparou-se com a de comprimento de onda de 1230 cm⁻¹ apenas para confirmação de sua validade (figura 15).

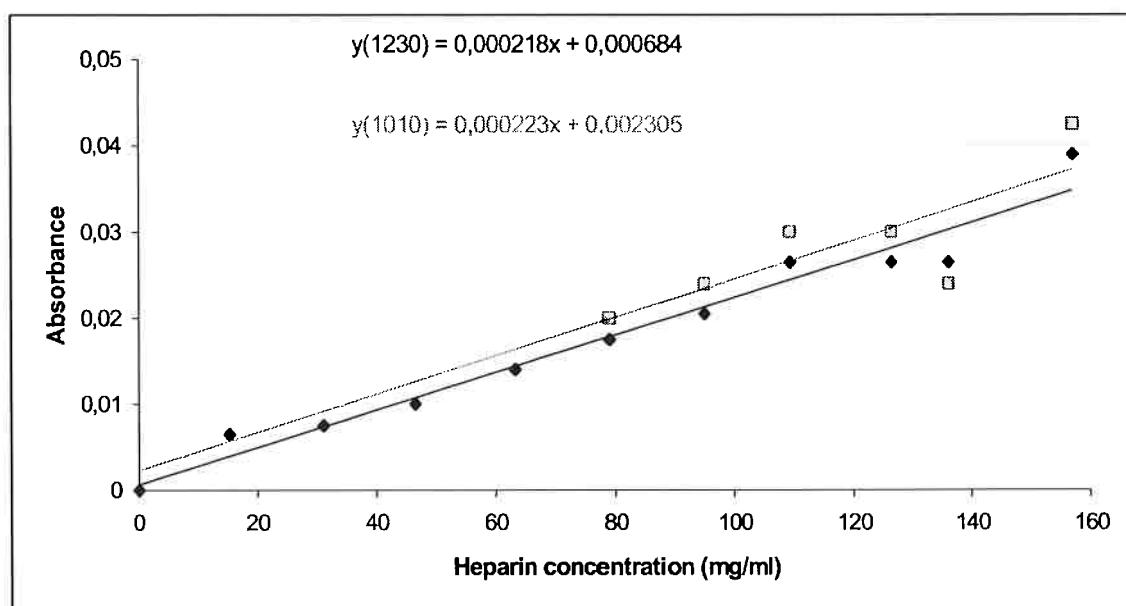


Figura 15: Comparação entre as curvas de calibração da heparina sódica.

Com a curva de calibração em mãos, foi possível verificar a quantidade de heparina que ficou retida nas amostras tratadas e nas amostras lavadas, medindo-se a absorbância do pico de comprimento de onda de 1010 cm^{-1} nos espectros obtidos para tais amostras e comparando-se com o valor na curva de calibração. Escolheu-se o pico de 1010 cm^{-1} pois o pico de 1230 cm^{-1} apresentava muita imprecisão devido à sua baixa intensidade de absorbância, já que seu espectro confunde-se com o de PVC. Dessa forma, quantificou-se a presença de heparina no PVC, de acordo com o seu tempo de tratamento e de lavagem. Também separou-se os resultados de acordo com o tipo de PVC. Tínhamos amostras de dois tipos diferentes de PVC, sendo o tipo 1 o que tem menos plastificante em sua composição e o tipo 2, o que apresenta mais plastificante (amostra mais maleável). Os valores obtidos encontram-se nas tabelas I (PVC tipo 1) e II (PVC tipo 2).

Também foi feita a análise dos tipos diferentes de material utilizando-se o DMTA, para verificar as diferenças nas propriedades mecânicas dos mesmos. O resultado da análise está apresentado na figura 16.

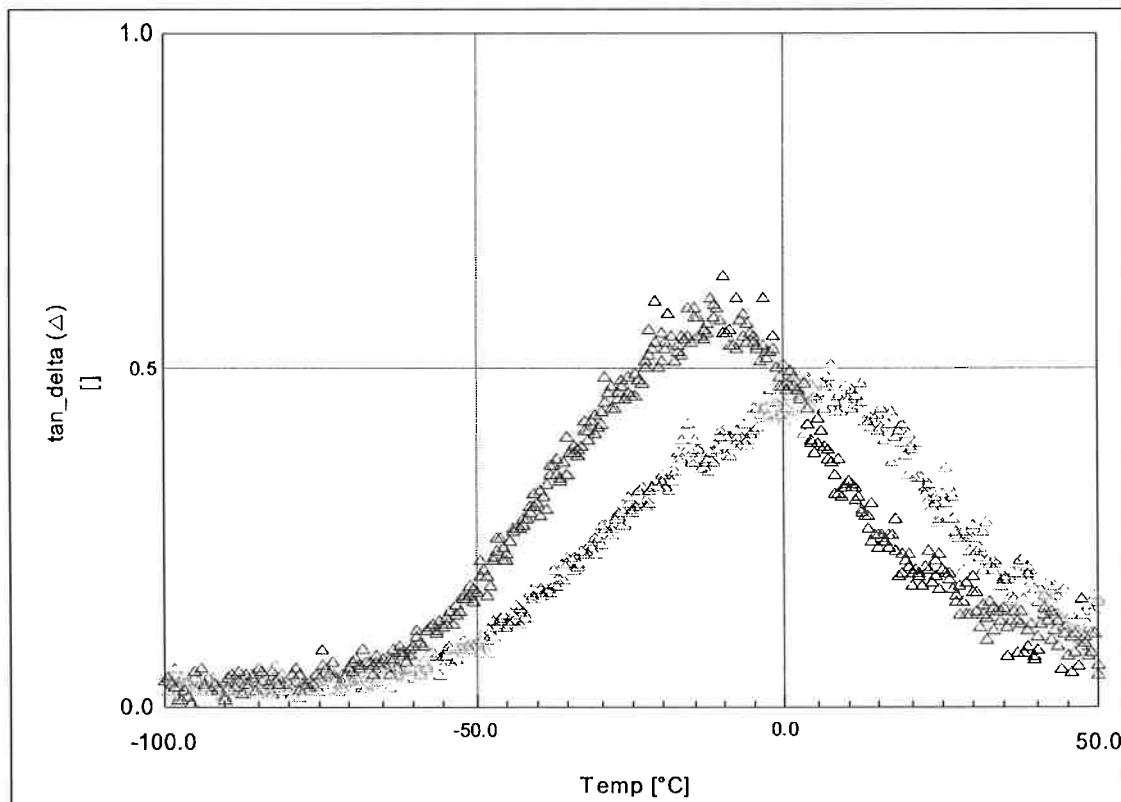


Figura 16: Análise de DMTA do PVC tipo 1 (cinza) e do PVC tipo 2 (preto).

Tabela I - Absorbância do PVC tipo 1 tratado e lavado

Tempo de Tratamento (min)	Tempo de Lavagem (min)	Absorbância
5	-	0,00742
10	-	0,01581
15	-	0,01129
60	-	0,02226
5	60	0,00484
10	30	0,01129
10	60	0,01194
30	30	0,02000

Tabela II - Absorbância do PVC tipo 2 tratado e lavado

Tempo de Tratamento (min)	Tempo de Lavagem (min)	Absorbância
5	-	0,02161
15	-	0,06353
60	-	0,07235
5	30	0,01451
15	30	0,06000
15	60	0,05824
60	60	0,03161

A partir dos resultados obtidos acima, pudemos construir uma curva para verificar a eficiência do processo de heparinização, através da quantificação de quanto de heparina permanece no PVC, de acordo com o tempo de tratamento (figura 17).

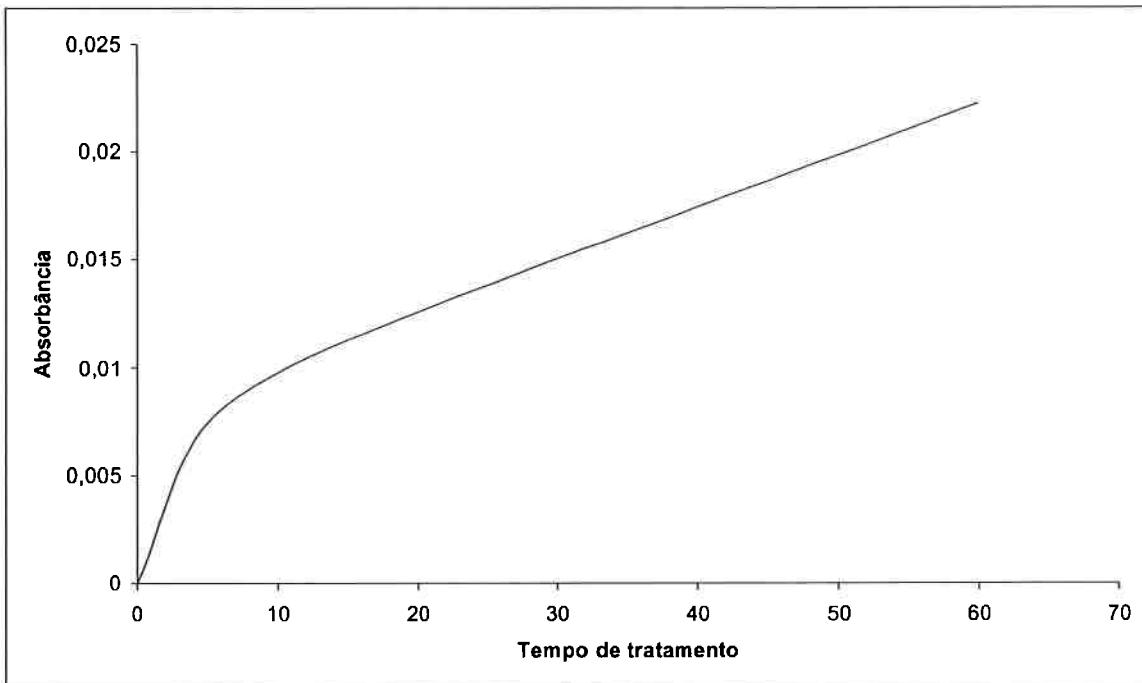


Figura 17: Relação entre tempo de tratamento e quantidade de heparina no PVC tipo 1.

Também foi possível a construção de uma curva de referência, relacionando o tempo de lavagem com a quantidade de heparina permanecente na superfície do PVC, o que nos permitiu verificar qual a taxa de perda de heparina da superfície dos tubos (figura 18).

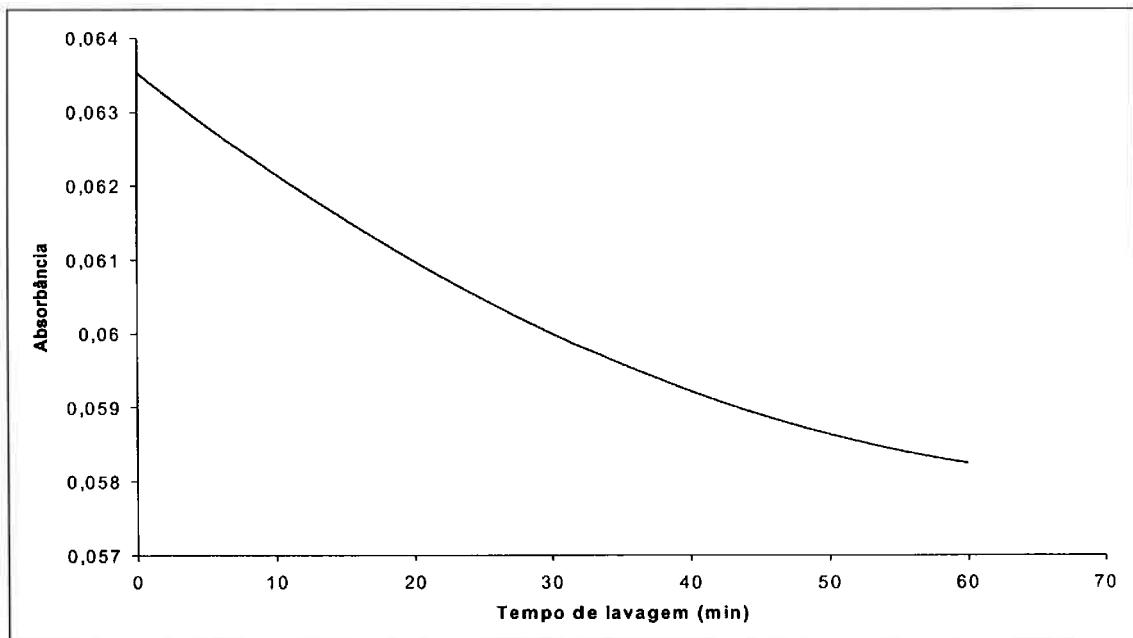


Figura 18: Relação entre tempo de lavagem e quantidade de heparina permanecente no PVC tipo 2 (para tempo de tratamento = 15 minutos).

Pode-se também determinar a influência do tempo de tratamento do PVC para um determinado tempo de lavagem, fixo. Para tal, construiu-se outra curva (figura 19) a partir dos dados presentes na Tabela I.

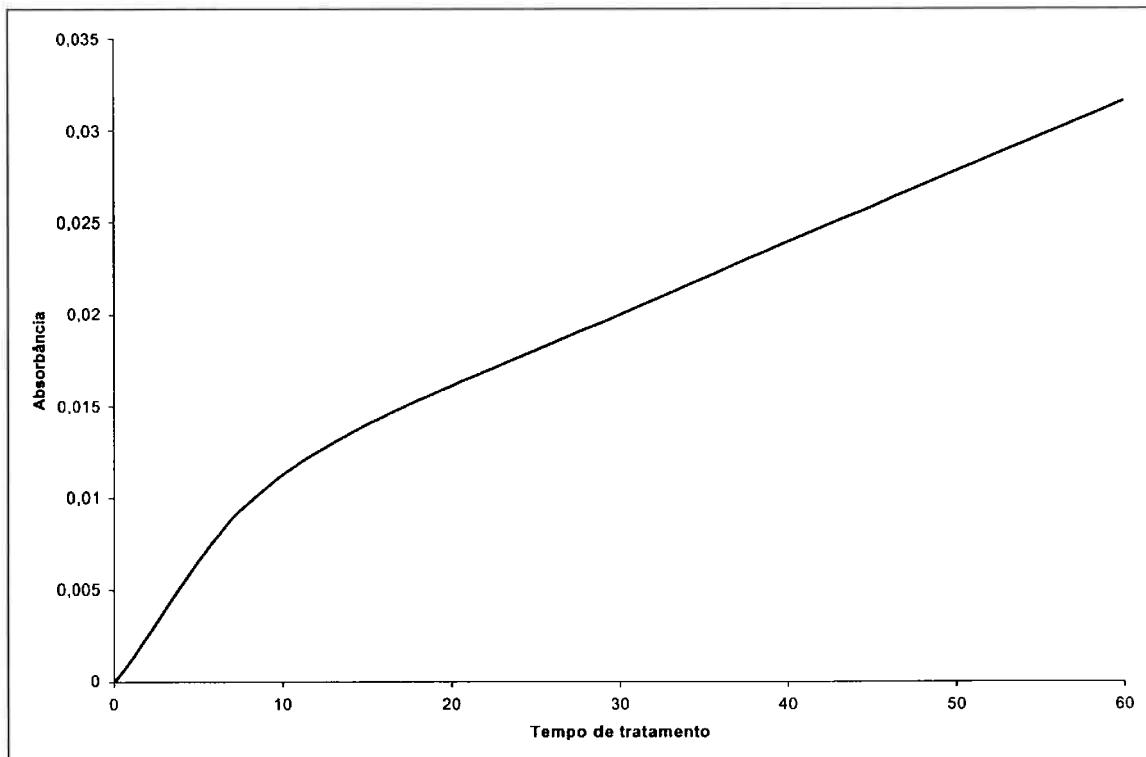


Figura 19: Influência do tempo de tratamento na quantidade de heparina presente na superfície do PVC tipo 1, após lavagem de 30 minutos.

Após a análise utilizando-se o FT-IR, foi feita a caracterização da superfície utilizando-se o MEV (figura 20). A região escura (superfície do PVC) apresenta sólidos cinzas espalhados em sua superfície, o que corresponde à heparina, com menor densidade de elétrons. Os sólidos possuem dispersão de tamanho, desde alguns microns até dezenas de microns. A superfície do PVC não tratada, ao ser observada no MEV, apresenta apenas linhas referentes à laminação do tubo, não havendo existência alguma dos sólidos vistos na figura 20. Apesar da solução de BAC-heparin ser homogênea, a formação dos depósitos sólidos parece ter ocorrido devido à precipitação, e está de acordo com o que foi anteriormente visto na literatura. [9]

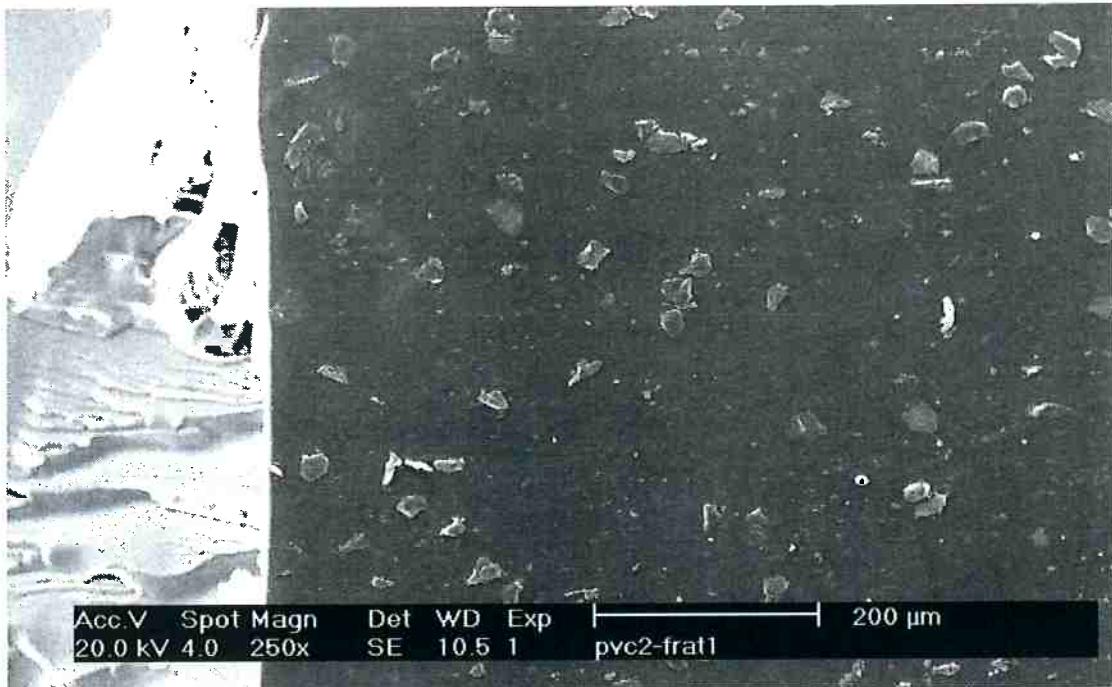


Figura 20: MEV da superfície do material após tratamento.

Utilizando os dados conseguidos durante os ensaios referentes às absorbâncias dos picos específicos de cada amostra de PVC e também a curva de calibração confeccionada foi possível calcular a concentração de heparina na superfície do material, em termos de concentração por volume e concentração por área. Os dados finais estão apresentados na tabela III abaixo.

Tabela III - Resultados finais após diferentes condições de tratamento e lavagem.

Amostra	Tipo PVC	T _{Tratamento} (min)	T _{Lavagem} (min)	Absorbância	Concentração µg/cm ³	Concentração ^a µg/cm ²
1	1	5	-	0,00742	22,94	1,15
2	1	10	-	0,01581	60,56	3,03
3	1	15	-	0,01129	40,29	2,01
4	1	60	-	0,02226	89,48	4,47
5	1	5	60	0,00484	11,37	0,57
6	1	10	30	0,01129	40,29	2,01
7	1	10	60	0,01194	43,21	2,16
8	1	30	30	0,02000	79,35	3,97
9	2	5	-	0,02161	86,57	4,33
10	2	15	-	0,06353	274,55	13,73
11	2	60	-	0,07235	314,10	15,71
12	2	5	30	0,01451	54,73	2,74
13	2	15	30	0,06000	258,72	12,94
14	2	15	60	0,05824	250,83	12,54
15	2	60	60	0,03161	131,41	6,57

^a A concentração foi calculada levando-se em consideração que a profundidade de penetração foi igual a 0,5 µm, o que é esperado para o cristal KRS ATR sob as condições do experimento.

5) DISCUSSÃO:

Podemos concluir pelos resultados obtidos que há a presença de heparina sobre as amostras tratadas com a solução de BAC heparin e que, mesmo após determinado tempo de lavagem, há a permanência de parte dessa heparina ligada permanentemente na superfície do corpo de prova.

Para um melhor resultado no FT-IR, é necessário realizar um número de espectros por volta de 256, devido à grande interferência que existe para testes com menor número de espectros. Para valores superiores a este, o ganho na qualidade dos resultados não é compensador frente ao tempo gasto para tal, que é muito maior do que para menores valores.

Pela interpretação dos espectros do PVC tratado com BAC heparin e os espectros das amostras lavadas no soro fisiológico, podemos concluir que o tempo de tratamento e o de lavagem são variáveis que influenciam de forma acentuada a quantidade de heparina que permanece na superfície do PVC. Quanto maior o tempo de tratamento, maior é a quantidade de heparina presente na superfície do material tratado. Ao mesmo tempo, quanto maior o tempo de lavagem do corpo de prova tratado, menor é a quantidade de heparina remanescente no PVC, como era esperado.

Com relação ao tempo de tratamento das amostras, a eficiência do processo de heparinização vai diminuindo à medida que se utiliza maior tempo para o tratamento. Pode-se notar pelos resultados obtidos que vai havendo uma saturação da superfície do PVC enquanto ocorre a heparinização, o que acarreta na diminuição de sua eficiência. Uma das causas para tal fato é que as moléculas de heparina com o cloreto de benzalcônio ligam-se somente no PVC, e não entre si.

Como era esperado, havendo maior tempo de lavagem, a quantidade de heparina presente na superfície do PVC vai se reduzindo, uma vez que a heparina é retirada do PVC pela ação do soro fisiológico. Cerca de 20 a 30% da heparina aplicada na superfície é removida durante a lavagem.

Além disso, foi observado que a composição do PVC também afeta a quantidade de heparina na superfície do material. Observando os resultados, podemos concluir que o

PVC do tipo 2 (como foi denominado o PVC mais maleável, com mais plastificante) consegue, em sua superfície, reter uma quantidade muito maior de heparina que o PVC de tipo 1.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- [1]. H. L. Edmunds, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **90** (1985) 1.
- [2]. C. C. Reed, T. B. Stafford, *Cardiopulmonary Bypass*, 2nd Edition, Texas Medical Press, Inc., Houston (1985).
- [3]. J. M. Anderson, K. Kottke-Marchant, *Platelet Interactions with Biomaterials and Articial Devices*, CRC Critical Reviews in Biocompatibility, Vol. 1, Issue 2, CRC Press, Boca Raton (1985) 111-204
- [4]. R. Larsson, O. Larm, P. Olsson, *Ann. New York Acad. Sci.* **516** (1987) 102.
- [5]. V. L. Gott, J. D. Whiffen, R. C. Dutton, *Science* **142** (1963) 1297.
- [6]. O. Larm, R. Larsson, P. Olsson, *Biomat. Med. Dev. Art. Org.* **11** (1983) 161.
- [7]. K. K. Chittur, *Biomaterials* **19** (1998) 357.
- [8]. Z. Chen, R. Zhang, M. Kodama, T. Nakaya, *J. Appl. Polym. Sci.* **76** (2000) 382.
- [9]. W. P. Novello, A. C. F. Arruda, M. H. Santana, A. M. Moraes, S. C. Pinho, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* **9** (1998) 793.
- [10]. B. Ander, A. Karlsson, Å. Öhrlund, *J. Chrom. A* **917** (2001) 105.
- [11]. *Medtronic / Carmeda BioActive Surface Compendium of Scientific Information, Medtronic Cardiopulmonary*, Meditronic Inc. EUA (1991) .
- [12]. V. L. Gott, R. L. Daggett, *Ann. Thorac. Surg.* **68** (1999) S19.
- [13]. H. Kim, M. W. Urban, *Lagmuir* **14** (1998) 7235.
- [14]. D. Williams, *Biocompatibilty of Implant Materials*, Sector Publishing Limited (1976).
- [15]. D. Basmadjian; M. V.Sefton; S. A. Baldwin, *Biomaterials* **18** (1997) 1511.
- [16]. K. Anselme, *Biomaterials* **21** (2000) 667.
- [17]. M. H. L. Souza, D. O. Elias, *Fundamentos da Circulação Extracorpórea*, Centro Editorial Alfa Rio, Rio de Janeiro - RJ (1995).
- [18]. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/now/now2J.html>
- [19]. <http://www.instechlabs.com/catheters.html>