

RENATO MASSARU NAKAI

**TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE FILMES DE POLIURETANO
UTILIZANDO PROCESSO DE HEPARINIZAÇÃO**

**Trabalho de Formatura
apresentado à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo.**

**São Paulo
2004**

RENATO MASSARU NAKAI

**TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE FILMES DE POLIURETANO
UTILIZANDO PROCESSO DE HEPARINIZAÇÃO**

**Trabalho de formatura
apresentado à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo.**

**Área de Concentração:
Engenharia de Materiais**

**Orientadora:
Professora Doutora
Wang Shu Hui**

**São Paulo
2004**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Wang Shu Hui, por todo o seu empenho na orientação deste projeto de iniciação científica. E agradeço também ao CNPq pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

O trabalho consiste na modificação superficial de filmes poliméricos, através do seu tratamento com uma solução de heparinato de benzalcônio. Esse procedimento tem como finalidade aumentar a hemocompatibilidade do polímero, utilizando o método de imobilização da heparina na superfície dos mesmos. Realizadas as modificações, as amostras serão monitoradas de acordo com as condições de tratamento, lavagem e tipo de material utilizado. Para isto, podem ser utilizados métodos como a espectroscopia de infravermelho (FT-IR/ATR), espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis) e espectrometria de fluorescência a fim de se obter dados quantitativos. Neste projeto específico foi feito o estudo para a caracterização quantitativa de heparina incorporada à superfície de filmes de poliuretano, utilizando espectroscopia UV-Vis. Este trabalho de pesquisa está sendo feito em colaboração com o Laboratório de Bioengenharia (INCOR) sob a supervisão da Engenheira Helena Oyama.

ABSTRACT

In this work polymer films' surfaces are modified by a benzalkonium heparinate solution in order to improve polymer hemocompatibility by heparin surface immobilization. Different conditions of treatment can be monitored by infrared spectroscopy (FTIR/ATR), ultraviolet-visible absorption and fluorescence spectroscopy's. In this project specifically modification of polyurethane films were characterized by ultraviolet-visible spectroscopy. This research has been done in collaboration with the Bioengineering Laboratory (INCOR) supervised by Eng. Helena Oyama.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Heparina e processo de coagulação.....	3
2.2 Poliuretanos.....	5
2.3 Caracterização dos polímeros.....	7
2.3.1 Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)	7
2.3.2 Caracterização de heparina por colorimetria.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Materiais.....	11
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Caracterização das propriedades térmicas e mecânicas do filme de pellethane.....	12
3.2.2 Preparação da curva de calibração para o espectrofotômetro de UV.....	12
3.2.3 Aplicação do heparinato de benzalcônio no filme de poliuretano.....	16
3.2.4 Lavagem dos corpos de prova após tratamento.....	17
3.2.5 Análise de heparina existente na superfície dos filmes de poliuretano.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Caracterização das propriedades térmicas e mecânicas do filme de pellethane	20
4.2 Preparação da curva de calibração para o espectrofotômetro no UV.....	22
4.3 Caracterização da superfície de Pelletane recoberta com heparina.....	30
4.4 Lavagem dos corpos de prova após tratamento.....	33
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de Heparina	3
Figura 2 - Diagrama do mecanismo de coagulação.....	4
Figura 3 - Moléculas de Heparinato de Benzalcônio.....	5
Figura 4 - Reação de síntese do poliuretano.....	6
Figura 5 - Gráfico do corpo de prova A (-100°C a 70°C).....	20
Figura 6 - Gráfico do corpo de prova B (-100°C a 100°C).....	21
Figura 7 - Gráficos de absorbância das soluções da série A em função da concentração de azul de toluidina.....	23
Figura 8 - Correlação entre a absorbância a 631 nm e a concentração de azul de toluidina.....	24
Figura 9 - Gráfico de uma análise feita através de espectrofotometria por UV de soluções da série B, contendo diferentes concentrações de heparina misturadas a Sol I.....	24
Figura 10 - Curvas de absorbância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série EA.....	25
Figura 11 - Curvas de absorbância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série EB.....	26
Figura 12 - Curvas de absorbância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série EA tratadas matematicamente.....	27
Figura 13 - Curvas de absorbância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série EB tratadas matematicamente.....	27
Figura 14 - Curva de Calibração da absorbância em função da concentração de heparina.....	29
Figura 15 - Curva de Calibração da concentração de azul de toluidina em função da concentração de heparina. ($\Delta y = -0,2203\Delta x + 0,0036$).....	30
Figura 16 - Curvas de absorbância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série Pe.....	31

Figura 17 - Gráfico da absorvância em função do tempo de tratamento do filmes. ($y = 4E-06x^3 - 0,0004x^2 + 0,0141x + 2,153$; $R^2 = 0,9994$).....	32
Figura 18 - Gráfico de $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de heparina remanescente em função do tempo de tratamento do filmes. ($y = 0,0057x^3 - 0,573x^2 + 19,554x + 1,4376$).....	33
Figura 19 - Curvas de absorvância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série L (Lavagem).....	34
Figura 20 - Gráfico de $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de perda total de heparina na superfície dos filmes durante o seu tempo de lavagem. ($y = 0,0255x+22,949$).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dimensões dos corpos de prova utilizados na análise por DMTA.....	12
Tabela 2 - Soluções contendo diferentes concentrações de azul de toluidina (TB) em Sol. I (solução aquosa contendo 0,2% de NaCl e 0,01M de HCl).....	13
Tabela 3 - Soluções da série B e suas respectivas concentrações de heparina.....	13
Tabela 4 - Soluções da série C e suas respectivas concentrações de heparina.....	14
Tabela 5 - Soluções da série E e suas respectivas concentrações de heparina.....	15
Tabela 6 - Tempos em que cada amostra da série L foi coletada durante o processo de lavagem.....	18
Tabela 7 - Dados para a construção da curva de calibração de absorbância em função da concentração de heparina.....	28
Tabela 8 - Valores de absorbância em função do tempo de tratamento a que o filme foi submetido.....	31
Tabela 9 - Valores de absorbância em função do tempo de lavagem a que o filme foi submetido.....	34

1. INTRODUÇÃO

A interação entre o sangue e materiais sintéticos apresenta grande interesse acadêmico e prático. Há uma grande necessidade em obter materiais compatíveis com o sangue, tanto para próteses internas quanto para sistemas de circulação externa.

Durante a circulação extracorpórea, o sangue circula por um conjunto de elementos, como oxigenadores, tubos, reservatórios, filtros e conectores, com os quais tem contato íntimo e prolongado. Como as superfícies de contato dos diversos componentes do circuito extracorpóreo não têm a menor semelhança com o ambiente natural da circulação sanguínea, isto é, o revestimento endotelial do sistema circulatório, é essencial que a coagulação do sangue seja inibida para impedir a formação de trombos nessa superfície sintética. O sangue permanece na forma líquida enquanto estiver em contato com as superfícies internas do coração (endocárdio) e dos vasos sanguíneos (endotélio), graças a um equilíbrio físico-químico complexo, onde existem forças que favorecem a coagulação e forças contrárias, que favorecem a anticoagulação. Em contato com outro tipo de superfície, biológica ou de outra natureza, o equilíbrio se altera fazendo com que o sangue tenha a tendência de coagular. [1] [2] [3] [4]

Além do problema de coagulação também há uma complicação extra que é a danificação das hemácias ao entrarem em choque com superfícies estranhas. O bombeamento artificial do sangue e a sua circulação por superfícies plásticas rígidas e pouco flexíveis e não biológicas produzem traumatismo e injúria aos elementos celulares e protéicos, diretamente proporcional ao tempo de duração do procedimento. [5] [6]

Muitas pesquisas já foram feitas com o objetivo de aumentar a tromborresistência dos materiais. Analisando todo o histórico de estudos realizados nesta área, pode-se dizer que existem três teorias diferentes para se atingir este objetivo: primeiro, o controle das propriedades superficiais dos polímeros; segundo, a utilização de uma substância antitrombogênica juntamente com o polímero;

terceiro, realizar modificações no polímero de forma a obter uma espécie de pseudoendotelização.

O primeiro princípio pode ser implementado através de diferentes formas como: a minimização da energia livre interfacial do material, otimização do balanço hidrofílico/hidrofóbico, otimização da tensão superficial crítica, carregamento superficial negativo, recobrimento com hydrogel, entre outras. O segundo princípio consiste no tratamento superficial do polímero com a utilização de heparina, a fim de impedir o início do processo de coagulação do sangue. No entanto, ainda para este segundo princípio, são apresentadas diversas formas de realizar a imobilização da heparina na superfície do material, como: adsorção, tratamento da superfície com plasma, e grafitação de monômeros funcionais em polímeros como o poliuretano. Uma das formas de implementar o terceiro princípio é através da realização de modificações na estrutura do material, incorporando grupos sulfônicos similares àqueles existentes na heparina e que fazem dela uma substância com atividade anticoagulante.

Tendo conhecimento destas diversas possibilidades para a obtenção de um material tromborresistente, e avaliando os recursos disponíveis para isto, decidiu-se realizar o projeto utilizando-se o método de adsorção de heparina na superfície de filmes de poliuretano, para então realizar as etapas de quantificação da heparina imobilizada no material após os processos de tratamento e lavagem.

2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Um levantamento bibliográfico foi feito sobre o estado da arte na modificação química de polímeros, com ênfase em poliuretanos, heparina e a sua caracterização.

2.1 *Heparina e processo de coagulação*

Para inibir a coagulação do sangue em procedimentos envolvendo circulação extracorpórea, utiliza-se uma substância chamada heparina. A heparina (Figura 1) é um mucopolissacarídeo sulfatado largamente utilizado como anticoagulante por retardar a coagulação do plasma. Algumas propriedades, bem como o grau de pureza da heparina, variam com o tecido do qual ela é extraída, podendo ele ser a mucosa intestinal de porcos ou pulmões de bovinos. Em virtude das variações das seqüências e do comprimento das cadeias de hidratos de carbono nos mucopolissacarídeos, a heparina não é uma substância pura, única, e sim uma mistura de diversas substâncias com pesos moleculares que variam de 3000 a 40000 Dalton. Como resultado dessa variabilidade, cada preparação comercial da heparina apresenta potências diferentes de acordo com o fabricante, e, até mesmo dentro do mesmo fabricante, de acordo com o lote produzido. A atividade anticoagulante da heparina se deve às moléculas de maior peso molecular; as moléculas menores não têm efeito anticoagulante. [1] [4] [7]

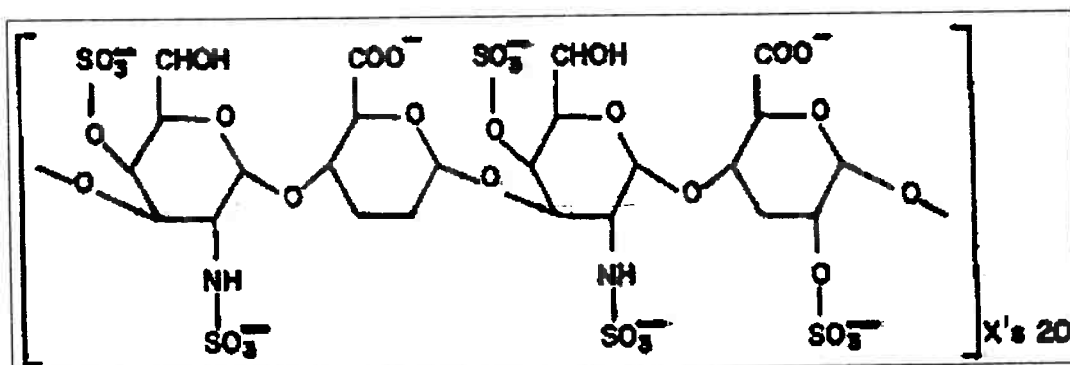


Figura 1: Molécula de Heparina

A formação do coágulo de fibrina é iniciada por estímulos de diversas naturezas, que culminam na ativação sequencial de um conjunto de treze fatores protéicos do plasma, os fatores de coagulação, que podem ainda ser acelerados ou inibidos em suas ações, por outras substâncias ou co-fatores. A heparina interfere nas etapas iniciais da cascata de coagulação, que consiste na conversão da prototrombina (fator II) em trombina que, por sua vez, promove a conversão do fibrinogênio (fator I) em fibrina, originando o coágulo. A heparina impede a transformação da protrombina em trombina, dessa forma, a conversão do fibrinogênio em fibrina não ocorre (Figura 2). Apesar da grande eficiência da heparina em impedir a coagulação sangüínea, cerca de 70% das moléculas de heparina presentes em qualquer preparação comercial não tem efeito anticoagulante. [1] [4] [8] [9] [10]

A heparina não tem apenas ação anticoagulante. Também possui ação hemorrágica e antitrombótica. O principal efeito da heparina, na circulação extracorpórea, é a inibição da formação da fibrina a partir do fibrinogênio. Além desse efeito, a heparina pode induzir a dissolução de coágulos formados, por excitação da fibrinólise. A heparina também exerce algumas ações sobre as plaquetas, das quais as principais são: a liberação da serotonina, aumento da agregação plaquetária, aumento do tempo de sangramento e da liberação do fator plaquetário III, e pequena redução do número de plaquetas circulantes no sangue. [1] [4] [7] [11] [12] [13]

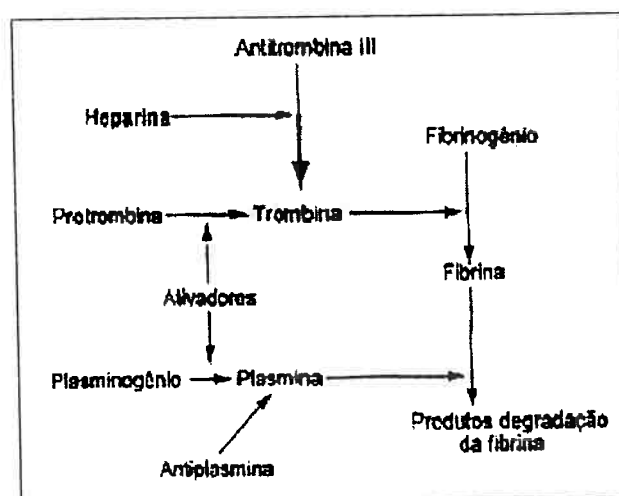


Figura 2 - Diagrama do mecanismo de coagulação. [15]

Vários métodos têm sido desenvolvidos para ligar a heparina em polímeros na esperança de se obter uma diminuição na tendência de coagulação do sangue sobre o substrato de biomateriais. Como para a maioria dos polímeros de uso médico a heparina não pode ser ligada diretamente, normalmente é feita a ligação da heparina a um componente intermediário, o qual é ligado ao polímero. Mais recentemente, começou-se a utilizar espaçadores para aumentar a mobilidade e a atividade da heparina. Neste projeto utilizou-se o cloreto de benzalcônio como componente intermediário (Figura 3). [2]

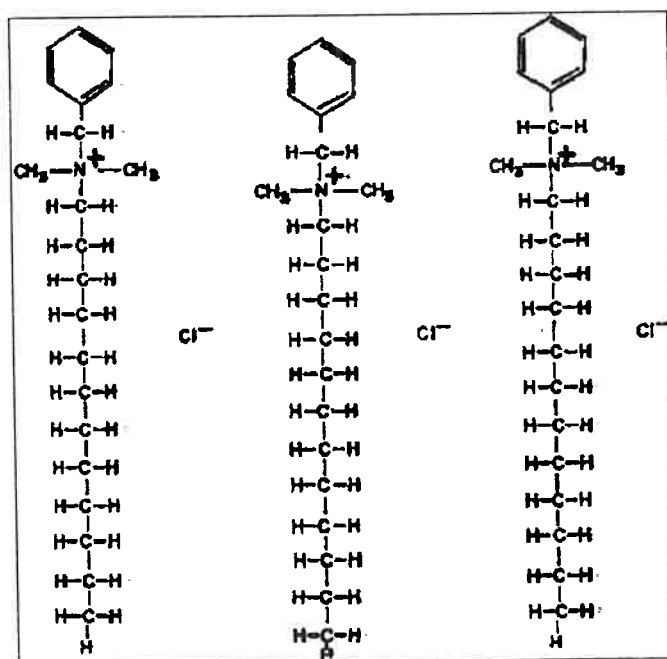


Figura 3 – Moléculas de Cloreto de Benzalcônio. [15]

2.2 Poliuretanos

O surgimento do poliuretano ocorreu durante a segunda guerra mundial, com o objetivo de evitar uma eventual escassez de borracha natural, largamente utilizada em equipamentos bélicos. Com isto, EUA e Alemanha investiram pesado na pesquisa e desenvolvimento de uma borracha sintética.

As reações de síntese do poliuretano foram propostas por Wurtz em 1894, mas apenas em 1934, Otto Bayer conseguiu desenvolver um material com características muito parecidas com a borracha, o poliuretano. O

poliuretano encontrou suas primeiras aplicações ainda durante a guerra, pois a maioria dos materiais conhecidos na época tinha pouca resistência a baixas temperaturas, o que não ocorre com o poliuretano. Devido a isto, ele foi utilizado na fabricação de foguetes e em outras aplicações mais simples como: espumas, recobrimentos superficiais e adesivos.

Diferente de outros polímeros que contém unidades monoméricas, os poliuretanos não contém unidades uretanas repetidas de forma regular, por isto não tem uma fórmula empírica que o represente totalmente. Um poliuretano típico, além do grupo uretano, pode conter hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, grupos éster, éter, uréia, amida, entre outros.

O grupo uretano é produto de uma reação química entre um grupo isocianato e um grupo hidroxila. Para que a polimerização seja obtida, reage-se um composto com dois ou mais isocianatos em uma estrutura com um polioliol, ou seja, um álcool polifuncional. Portanto, quando se usam reagentes difuncionais, são produzidos poliuretanos lineares. Se a funcionalidade do composto hidroxilado ou do isocianato for aumentada para três ou mais, obtém-se polímeros ramificados.

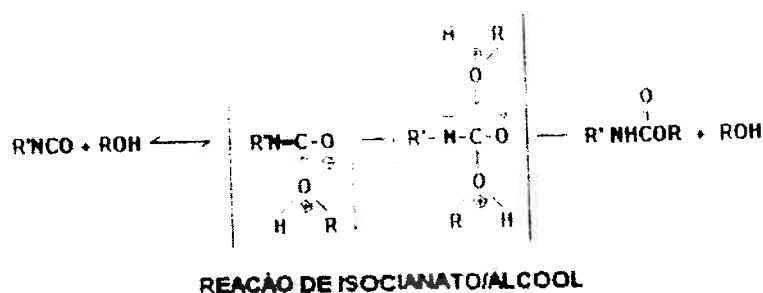


Figura 4 – Reação de síntese do poliuretano. [19]

O diisocianato é responsável por originar o domínio rígido do polímero, enquanto o polioliol é geralmente responsável pelo domínio flexível. Devido a isto, variando-se a combinação destes reagentes pode-se produzir materiais com diferentes características mecânicas, o que torna o poliuretano bastante versátil e atraente no ramo dos biomateriais.

A família do poliuretano usado nesse projeto possui uma estrutura caracterizada por $(AB)_n$, onde A e B representam os segmentos incompatíveis, rígidos e elastoméricos, respectivamente. Devido a isto, estes polímeros apresentam uma separação de fases caracterizada pela dispersão de domínios rígidos (possivelmente cristalinos) em uma fase elastomérica amorfa. As propriedades físicas e químicas do poliuretano estão muito relacionadas com a extensão dessa separação de fase e da dispersão e morfologia dos domínios rígidos e elastoméricos.

Os domínios rígidos são responsáveis pelas características mecânicas do poliuretano, atribuindo grande resistência a tensões aplicadas durante sua utilização. Os segmentos elastoméricos são responsáveis pela alta capacidade de deformação do material antes da ruptura. A interação entre essas duas fases tem influência crucial nas propriedades do material. [14]

Os filmes de poliuretano de grau médico são bastante usados na fabricação de membranas para ventrículos e outros componentes cardiovasculares artificiais. Isso devido à sua grande resistência mecânica a carregamentos periódicos, do seu alto grau de estabilidade química in vivo e de sua maior trombo-resistência em comparação com outros materiais também utilizados em aplicações cardiovasculares. Embora a formação de trombos ainda exista em tubos com diâmetros pequenos.

2.3 Caracterização dos polímeros

2.3.1 Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

O termo dinâmico se refere ao fato da técnica de ensaio envolver variações das condições de análise, isto é, ocorre uma aplicação de uma deformação ou de uma tensão oscilatória à amostra que provoca uma movimentação molecular enquanto o sistema é submetido a variações de temperatura durante o experimento. A temperatura também pode ser mantida constante enquanto a frequência de oscilação é modificada.

Independentemente, a energia de deformação mecânica gerada pode ser armazenada elasticamente ou dissipada como energia térmica (através de movimento molecular) durante o ciclo de deformação mecânica.

Os materiais poliméricos submetidos a deformações oscilatórias mecânicas forçadas manifestam um comportamento viscoelástico. O comportamento viscoelástico varia com a frequência de deformação.

Os parâmetros característicos utilizados para quantificar as propriedades viscoelásticas dinâmicas são primariamente o E' (tensão) ou G' (cisalhamento), módulo de armazenamento (módulo de elasticidade dinâmico), E'' (tensão) ou G'' (cisalhamento), módulo de perda, e $\tan \delta$, que é a tangente do ângulo da diferença de fase, isto é, E''/E' (ou G''/G'). [15]

Para sólidos puramente elásticos a $\tan \delta$ é igual a zero. Metais, por exemplo, estão muito próximo de atingir este comportamento. Os materiais com baixa capacidade de amortecimento, por exemplo cristais, têm esse comportamento, enquanto nos polímeros pode-se observar o fenômeno de amortecimento em diferentes condições.

Em um ensaio DMTA pode-se observar as seguintes características:

- A habilidade de o material armazenar e dissipar energia mecânica são funções da temperatura e do tempo.
- Durante uma relaxação mecânica, a frequência da movimentação molecular entra em ressonância com a frequência do ciclo da deformação mecânica oscilatória.
- A DMTA testa as propriedades macroscópicas do material.

- Para polímeros, muitas relaxações podem ocorrer devido ao tamanho, arquitetura, arranjo espacial, e interações entre as cadeias poliméricas.

2.3.2 Caracterização de heparina por colorimetria

A espectrofotometria no ultravioleta baseia-se no princípio de que a absorção de energia na região ultravioleta-visível do espectro é dependente da estrutura eletrônica da molécula. Essa absorção é quantificada, tendo por resultado a excitação dos elétrons dos orbitais de menor nível de energia para orbitais de maior nível energético. Para muitas estruturas eletrônicas, a absorção não ocorre na parcela prontamente acessível da região ultravioleta. Uma das vantagens desse fato é a seletividade da absorção do ultravioleta, que possibilita o reconhecimento de grupos característicos em moléculas de grande complexidade. Como partes dessas moléculas podem ser transparentes ao ultravioleta, é possível obter um espectro similar ao de uma molécula simples.

O método da colorimetria consiste na utilização do espectrofotômetro de ultravioleta para mensurar a quantidade de determinada molécula no interior de uma determinada mistura. Nesse projeto, o método da colorimetria será utilizado para quantificar a concentração de heparina adsorvida na superfície de um corpo de prova de poliuretano.

Para realizar essa análise quantitativa, primeiramente haverá a necessidade de se plotar uma curva de calibração, a qual será utilizada para relacionar a concentração de heparina à intensidade da absorbância obtida na análise da mistura. Após a obtenção dessa curva de calibração, será preparada uma solução contendo uma quantidade definida de heparina, onde os filmes de poliuretano serão mergulhados. Além da heparina, deve-se adicionar também azul de toluidina e uma

quantidade específica de ácido clorídrico e cloreto de sódio para que haja o controle do pH na solução. Caso contrário, podem ocorrer variações nos resultados da experiência, uma vez que o azul de toluidina sofre alterações de acordo com o valor de pH do meio. O azul de toluidina é usado como um evidenciador, pois a heparina pura é transparente no ultravioleta.

Mergulhando-se os filmes, ocorrerá a adsorção de heparina sobre eles. Em seguida, para determinar a concentração de heparina adsorvida, basta analisar a solução restante após a adsorção, com o espectrofotômetro de UV. Analisando a solução, obtém-se o valor da concentração de heparina residual na solução, e sabendo qual era a quantidade de heparina inicial, pode ser calculado o resultado desejado, ou seja, a quantidade de heparina adsorvida. [16] [17] [18]

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar os resultados pretendidos foram executadas as seguintes atividades:

- **Caracterização dos poliuretanos**

Os poliuretanos foram caracterizados quanto as suas propriedades térmicas e mecânicas (DMTA).

- **Levantamento de curva de calibração através do Espectrofotômetro UV-Vis**

Foram feitas soluções contendo diferentes concentrações de heparina, as quais foram analisadas no espectrofotômetro de UV, para que os pontos da curva de calibração pudessem ser obtidos. Estes pontos representam os valores de absorbância em função da concentração de heparina.

3.1 *Materiais:*

- Heparinato de benzalcônio (BAC Heparin®), 1,5% (w/v) em isopropanol com 713 USP unidades de heparina/ml, STS Biopolymers, Inc.. Cedido por: INCOR
- Azul de toluidina P.A. ($C_{15}H_{16}ClN_3S$, PM = 305,80), LABSYNTH
- Solução de HCl
- NaCl
- Hexano
- Filmes de poliuretano (Pellethane®) – Cedido por: INCOR
- DMTA (Rheometric Scientific®)
- Espectrofotômetro UV-Vis (Varian®)

3.2 Métodos:

3.2.1 Caracterização das propriedades térmicas e mecânicas do filme de Pellethane®

Para realizar a caracterização das propriedades térmicas e mecânicas do Pellethane® utilizou-se o equipamento: DMTA V da Rheometrics Scientific. Os corpos de prova utilizados consistiam em filmes preparados com as seguintes dimensões:

Tabela 1 – Dimensões dos corpos de prova utilizados na análise por DMTA

Corpo de prova	Largura (mm)	Comprimento (cm)	Espessura (mm)
A	7,21	1,51	0,09
B	7,74	1,50	0,1

As condições do ensaio foram:

- *Faixa de temperatura:*
 - Corpo A: -100°C a 70°C
 - Corpo B: -100°C a 100°C
- *Taxa de aumento da temperatura:* 2°C/min
- *Deformação máxima:* 0,05%
- *Frequência imposta:* 1 Hz

3.2.2 Preparação da curva de calibração para o espectrofotômetro de UV

6

Para obter uma curva de calibração, existe a necessidade de passar por algumas etapas. Primeiramente, preparou-se uma solução com a seguinte composição: 0,2% de NaCl, 0,01M de HCl, diluídos em água destilada [18]. Chamou-se esta solução de Sol. I. Em seguida, a partir desta Sol. I, foram feitas sete soluções contendo azul de toluidina em diferentes concentrações.

Chamou-se esta série de soluções da Série A. As respectivas concentrações de cada solução, se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 - Soluções contendo diferentes concentrações de azul de toluidina (TB) em Sol. I (solução aquosa contendo 0,2% de NaCl e 0,01M de HCl)

Série A (Sol1 + TB)	
Soluções	TB (%)
A1	0,010
A2	0,008
A3	0,006
A4	0,004
A5	0,003
A6	0,002
A7	0,001

Com o objetivo de conhecer o comportamento destas soluções em relação à espectroscopia no ultravioleta, foram feitas medições de cada uma das soluções, obtendo-se o gráfico da Figura 7.

O passo seguinte consistiu em preparar algumas soluções: contendo concentrações diferentes de heparina misturadas a Sol I. Chamou-se esta série de soluções de Série B. Desta forma, foram elaboradas cinco soluções com concentrações de heparina variando de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 – Soluções da série B e suas respectivas concentrações de heparina.

Série B (Sol1 + Heparina)	
Solução	Heparin (%)
B1	0,006
B2	0,004
B3	0,003
B4	0,002
B5	0,001

Da mesma forma como foi feito com a Série A, a Série B foi submetida à análise por espectroscopia de UV, com o objetivo de conhecer os picos referentes a heparina contida nas amostras. Com isto, obteve-se o gráfico da Figura 9.

Sabendo-se quais são as curvas referentes às soluções de azul de toluidina e de heparina, a próxima etapa consiste em fazer uma nova série de soluções contendo tanto heparina quanto azul de toluidina.

Esta série foi elaborada com a mistura na proporção 4:1 de uma solução contendo 0,003% de azul de toluidina, com soluções contendo concentrações diferentes de heparina, assim como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Soluções da série C e suas respectivas concentrações de heparina.

Série C (Sol1 + Heparina)	
Solução	Heparin (%)
C1	0,0040%
C2	0,0042%
C3	0,0044%
C4	0,0046%
C5	0,0048%
C6	0,0050%
C7	0,0052%
C8	0,0054%
C9	0,0056%
C10	0,0058%
C11	0,0060%

Dessa forma, foram misturados 4ml da solução contendo 0,003% de azul de toluidina, com 1ml de cada uma das soluções da série C apresentadas na Tabela 4. As concentrações de heparina escolhidas para elaborar a série C foram estimadas, neste projeto, em relação à quantidade de heparina existente na solução de heparinato de benzalcônio utilizada no tratamento dos filmes de poliuretano, visando-se obter uma faixa de valores aproximada.

Com a mistura entre a solução de azul de toluidina e as soluções de heparina, foram obtidas as seguintes soluções:

Tabela 5 – Soluções da série E e suas respectivas concentrações de heparina.

Série E (1ml Série C + 4ml A5)	
Série	Heparin (%)
E1	0,00080%
E2	0,00084%
E3	0,00088%
E4	0,00092%
E5	0,00096%
E6	0,00100%
E7	0,00104%
E8	0,00108%
E9	0,00112%
E10	0,00116%
E11	0,00120%

Ao fazer a mistura entre o azul de toluidina e a heparina, há a formação de um complexo. Este complexo será composto por toda a heparina que existia na solução, juntamente com parte do azul de toluidina presente inicialmente. Pode-se afirmar que toda a heparina será consumida pois o azul de toluidina estará em excesso na reação. No entanto, da mesma forma como acontece com a heparina pura, a quantidade deste complexo não pode ser medida diretamente através da espectroscopia de UV, pois a sua presença não altera a cor da solução de forma significativa.

Portanto, para que a quantificação de heparina contida nas soluções seja possível, tem-se que adicionar hexano às soluções [18]. Fazendo isto, todo o complexo formado passa a ficar diluído no hexano. Este, sendo imiscível em relação ao resto da solução formada por azul de toluidina e Sol. I, permite que o complexo possa ser separado. Fazendo-se isto, a concentração do azul de toluidina na solução é alterada, uma vez que a quantidade referente à formação do complexo foi retirada. Os resultados desta análise podem ser observados nas Figuras 10 e 11, onde tem-se os gráficos da

absorbância em função do comprimento de onda para cada uma das soluções da série E. Sendo que o pico correspondente ao azul de toluidina encontra-se em 631nm. [18]

A partir destes gráficos foi possível a elaboração da curva de calibração de absorbância em função da concentração de heparina, com base nos valores apresentados na Tabela 7.

Possuindo a curva de calibração da absorbância em relação à concentração de heparina (Figura 14), e a curva da absorbância em relação à concentração de azul de toluidina (Figura 8), pode-se construir o gráfico da concentração de azul de toluidina residual apresentada em função da concentração de heparina (Figura 15).

3.2.3 Aplicação do heparinato de benzalcônio no filme de poliuretano

O objetivo desta etapa do projeto consiste em avaliar qual é a quantidade de heparina adsorvida na superfície de filmes de poliuretano em função do período de tratamento.

Para isto, foram utilizados filmes de poliuretano (Pellethane®), cortados com dimensões de 5cm x 5cm. E uma solução contendo heparina, chamada de heparinato de benzalcônio.

O procedimento para que a quantidade de heparina adsorvida possa ser avaliada, consiste em mergulhar o filme de Pellethane® em 15ml de solução de heparinato de benzalcônio (BAC Heparin®), na forma em que foi adquirida, em um tubo de ensaio com tampa durante uma hora. No decorrer deste período foram retiradas alíquotas (50µl) da solução a cada 6 minutos (Tabela 8), obtendo-se o gráfico da figura 16.

O valor da alíquota correspondente a 50µl foi estimado com base nos equipamentos disponíveis para realizar a coleta das amostras e principalmente em relação à concentração de heparina existente na solução de heparinato de

benzalcônio, determinada em posse dos seguintes dados: a solução é composta por heparinato de benzalcônio (BAC Heparin®) a 1,5% (w/v) em isopropanol com 713 USP unidades de heparina/ml (fornecida por STS Biopolymers Inc). Através destes dados chegou-se à conclusão de que esta quantidade extremamente reduzida precisou ser coletada pois na solução de BAC Heparin® a heparina encontra-se muito concentrada.

3.2.4 Lavagem dos corpos de prova após tratamento

O objetivo desta etapa do projeto é estimar qual é a quantidade de heparina que permanece ligada à superfície do poliuretano em relação ao seu tempo de utilização em aplicações como a circulação extracorpórea de sangue.

Para isto, a simulação realizada consiste em manter o filme de Pellethane®, tratado, imerso em um tubo de ensaio com tampa, contendo 25ml de Sol. I, inicialmente elaborada, e retirar amostras de 1ml em determinados intervalos de tempo, para que a quantidade de heparina nelas contidas possa ser quantificada de acordo com a curva de calibração obtida anteriormente. O volume de 1ml por amostra foi definido, estimando-se que a quantidade de heparina a ser liberada durante a lavagem seria muito menor do que a quantidade existente na solução BAC Heparin®.

A lavagem, com a utilização da Sol. I, teve duração de 4 horas e a amostragem foi feita nos tempos apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Tempos em que cada amostra da série L foi coletada durante o processo de lavagem.

LAVAGEM PELLETHANE®	
	Tempo
L1	5
L2	10
L3	15
L4	20
L6	30
L7	40
L8	50
L9	60
L10	80
L11	100
L12	130
L13	160
L14	190
L15	240

Com o intuito de obter dados mais significativos, os intervalos para a coleta das amostras iniciais foram menores em relação aos intervalos finais, pois se estimou que a velocidade de desorção da heparina anteriormente adsorvida seria maior no início do procedimento e tenderia a se estabilizar com o passar do tempo.

3.2.5 Análise de heparina existente na superfície dos filmes de poliuretano

Nesta etapa as amostras coletadas durante o processo de aplicação de heparina na superfície do filme, e durante o processo de lavagem, são submetidas a uma análise quantitativa de heparina.

Ou seja, durante o processo de aplicação de heparina na superfície do filme de Pellethane® foram retiradas amostras de 50µl a cada seis minutos.

Para que a quantidade de heparina contida neste volume possa ser mensurada, algumas etapas são necessárias. Primeiramente estes 50 μ l são diluído na Sol I de forma a obter 5ml de uma nova solução. Os próximos passos são os mesmo realizados durante o processo de construção da curva de calibração, ou seja, uma quantidade de 1ml desta nova solução é retirada e misturada com 4ml da solução de azul de toluidina a 0,003%, de forma que o complexo seja formado. Em seguida adiciona-se hexano para a separação do complexo e submete-se a solução (fase aquosa) contendo apenas azul de toluidina à análise por espectrofotometria por UV-Vis.

Finalmente, com o auxílio da curva de calibração construída com dados da absorbância em função da concentração de heparina, consegue-se determinar qual a quantidade de heparina contida em cada amostra coletada inicialmente.

O processo de análise quantitativa de heparina das amostras obtidas durante o processo de lavagem é praticamente o mesmo realizado para as amostras obtidas durante o processo de adsorção de heparina, sendo até um pouco mais simples, pois não existe a primeira etapa de diluição dos 50 μ l de amostra coletada em Sol I, uma vez que o volume coletado durante a lavagem foi de 1ml e é suficiente para realizar uma quantificação coerente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das propriedades térmicas e mecânicas do filme de Pellethane®

Os resultados gráficos desta etapa do trabalho podem ser vistos a seguir.

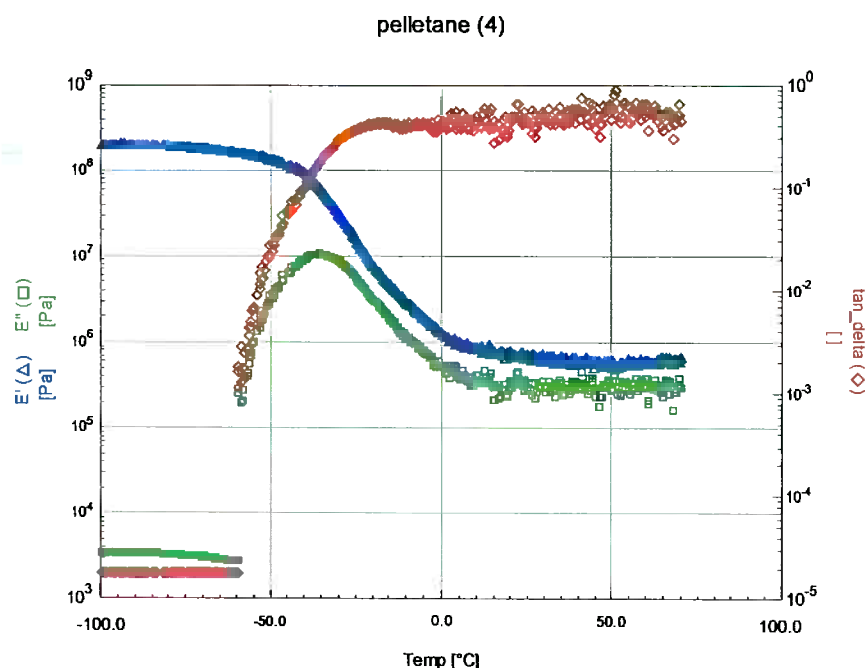


Figura 5 - Gráfico do corpo de prova A (-100°C a 70°C)

A caracterização do poliuretano utilizado, teve início traçando-se o gráfico da Figura 5, no entanto, em comparação com o gráfico da Figura 6, obtido com a utilização de outro corpo de prova, percebeu-se que os resultados do primeiro (Figura 5) mostraram-se incoerentes, a começar pelos pontos na região inicial que se encontram em posições atípicas, mantendo-se constantes em um valor reduzido na faixa de temperatura entre -100°C até cerca de -57°C para em seguida aumentarem de forma repentina. Passada essa faixa de temperatura, os valores apresentados pelo gráfico da Figura 5 se aproximam dos obtidos no gráfico da Figura 6, no entanto, como a anomalia

ocorrida no início do ensaio pode ter comprometido o resto dos valores, estes foram desconsiderados. Supõe-se que o motivo dos problemas encontrados nesse primeiro ensaio tenha sido causado devido à má colocação do corpo de prova no suporte do equipamento de DMTA, o que deve ter ocasionado o deslocamento do filme de poliuretano nos primeiros momentos do processo de caracterização.

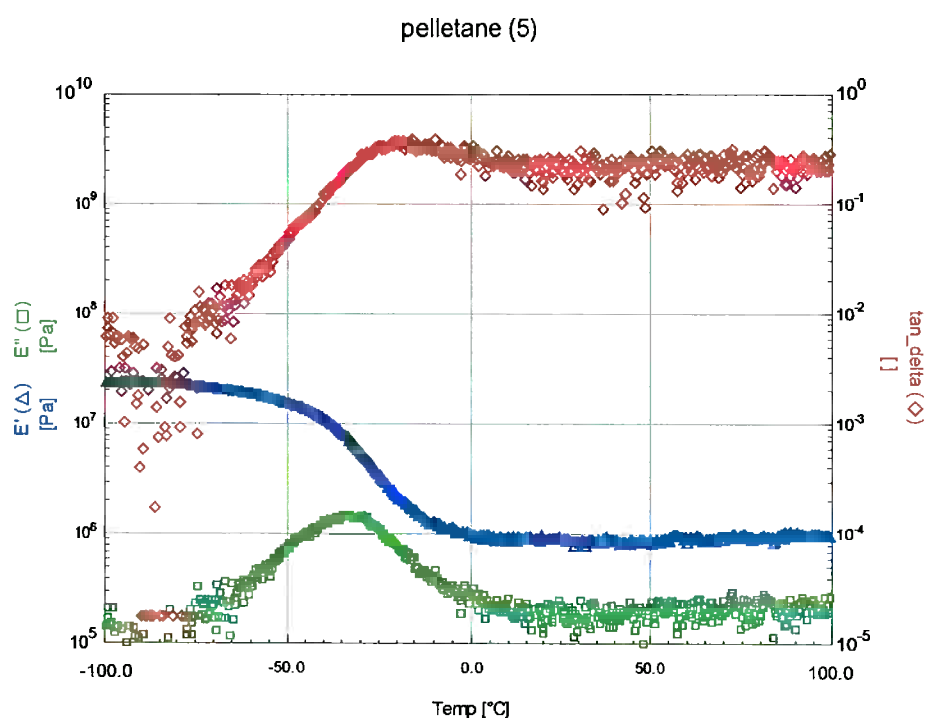


Figura 6 - Gráfico do corpo de prova B (-100°C a 100°C)

Analisando o gráfico da Figura 6, pode-se constatar que durante a faixa de temperatura de -100°C até cerca de -60°C o material mantém-se com características rígidas. Essa conclusão pode ser tomada pois nessa faixa de temperatura tem-se um valor alto com relação ao módulo de armazenamento E' e um valor baixo em relação ao módulo de perda, uma vez que a deformação mecânica é muito pequena.

Passado esse intervalo, o módulo de perda tende a aumentar pois o material vai tomando características elastoméricas de acordo com o aumento da temperatura, até que se atinge a temperatura de transição vítrea (T_g), por

volta de -30°C . Devido a esse fato, pode-se observar que em temperatura ambiente o material apresentará características de um elastômero. O módulo de perda atinge seu valor máximo na temperatura de transição vítrea, pois nesse ponto, as moléculas do polímero têm condições de se movimentarem de forma a se situarem em posições de menor energia, ocorrendo assim a sua liberação. O valor da temperatura de transição vítrea fica mais evidente se a curva de $\text{tg}\delta$, que também apresenta um pico nesse ponto for analisada. Isso ocorre pois nesse valor de temperatura, a tangente do ângulo da diferença de fase, isto é, E''/E' , chega ao valor mais próximo de 1 de todo o ensaio.

Após a temperatura de transição vítrea, as moléculas permanecem posicionadas no estado de menor energia que foi possível adquirir. Nessa situação o módulo de perda começa a diminuir até atingir o platô borrachoso a partir da temperatura de 0°C . A partir dessa temperatura, o valor do módulo de armazenamento e o valor do módulo de perda se estabilizam, pois o polímero atinge características elastoméricas e dessa forma, o módulo de armazenamento mantém-se a um valor bem menor do que o encontrado no início do ensaio, permanecendo na escala de grandeza em torno de 10^6Pa .

4.2 Preparação da curva de calibração para o espectrofotômetro no UV:

O gráfico abaixo (Figura 7) foi obtido através da análise de soluções com diferentes concentrações de azul de toluidina de acordo com a tabela 2.

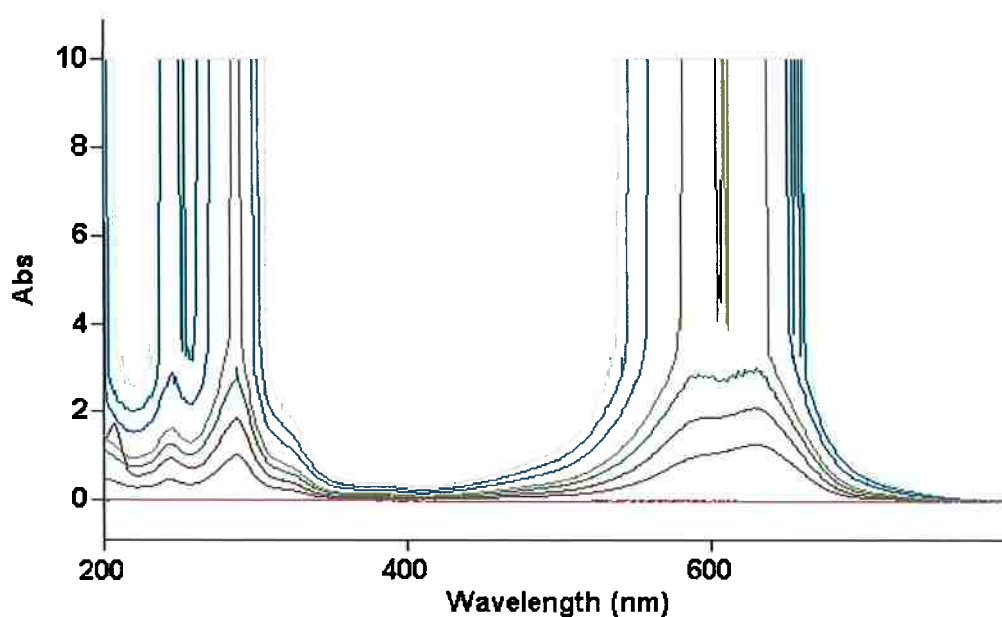


Figura 7 – Gráficos de absorvância das soluções da série A em função da concentração de azul de toluidina.

Essas medidas de absorvância (Figura 7) foram feitas com o objetivo de verificar a variação de absorvância em relação à concentração de azul de toluidina das soluções da série A.

Através delas foi possível concluir que concentrações de azul de toluidina maiores do que 0,003% ultrapassam o fundo de escala do equipamento, impossibilitando a confecção de uma curva de calibração adequada acima deste valor.

No entanto, os pontos referentes às concentrações das soluções A5, A6 e A7 ainda puderam ser utilizados para a construção da curva abaixo (Figura 8), onde a concentração de azul de toluidina e a absorvância são relacionadas.

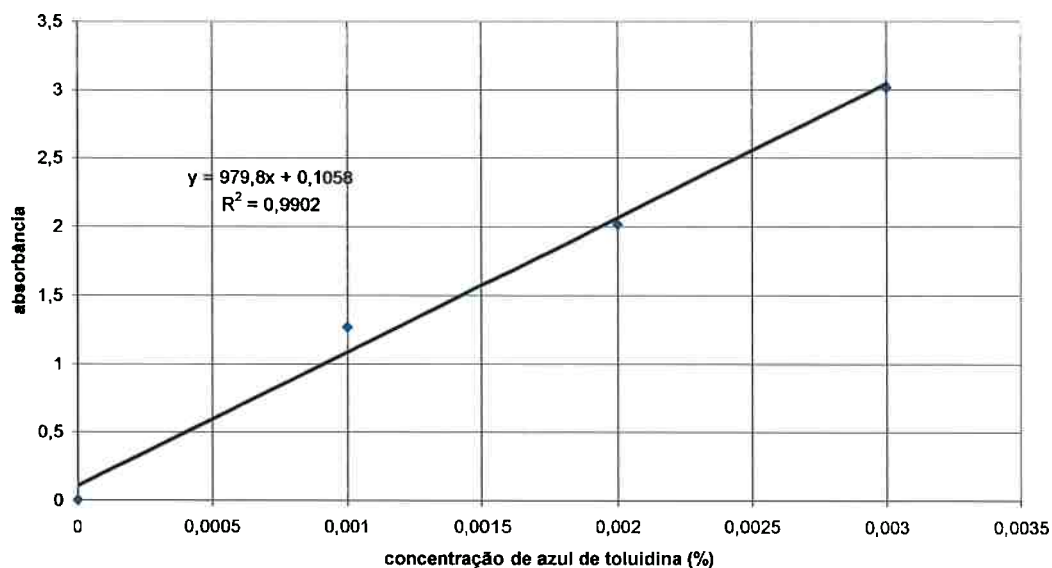


Figura 8 - Correlação entre a absorvância a 631 nm e a concentração de azul de toluidina

O gráfico abaixo foi obtido através das análises das soluções da série B que possuem diferentes concentrações de heparina misturadas a uma quantidade fixa de Sol I.

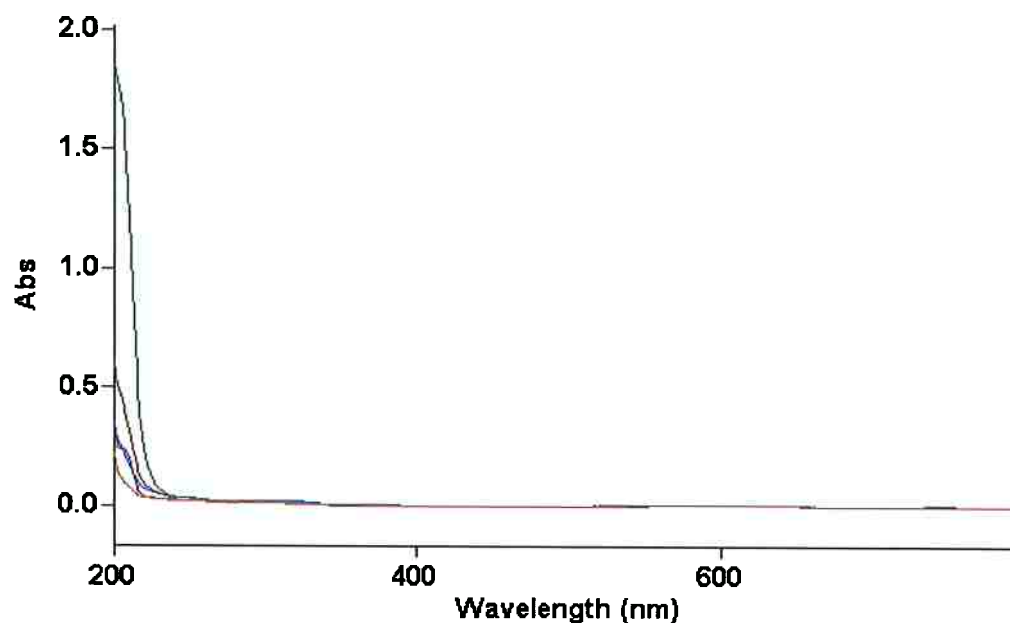


Figura 9 – Gráfico de uma análise feita através de espectrofotometria por UV de soluções da série B, contendo diferentes concentrações de heparina misturadas a Sol I.

Neste gráfico, os picos presentes abaixo de 200nm, provavelmente estão relacionados a grupos sulfônicos existentes na molécula de heparina. No entanto, estes picos não são adequados para a mensuração da quantidade de heparina contida nas soluções. Isso ocorre porque eles não estão bem resolvidos e caracterizados para considera-los exatamente proporcional à quantidade de heparina existente.

A série de curvas na Figura 10 foi gerada através da análise espectrofotométrica das soluções da série E. Ou seja, foram analisadas soluções onde quantidades variadas de heparina foram misturadas com a solução 0,003% de azul de toluidina, formando os complexos que em seguida são retirados através da adição de hexano. Isto provoca a variação do valor de absorvância para cada solução da série.

Para esta etapa, foram feitas duas medidas para cada concentração, com o objetivo de aumentar a quantidade e a qualidade dos pontos a serem utilizados na elaboração da curva de calibração. Portanto foram gerados os gráficos de absorvância referentes às séries EA e EB.

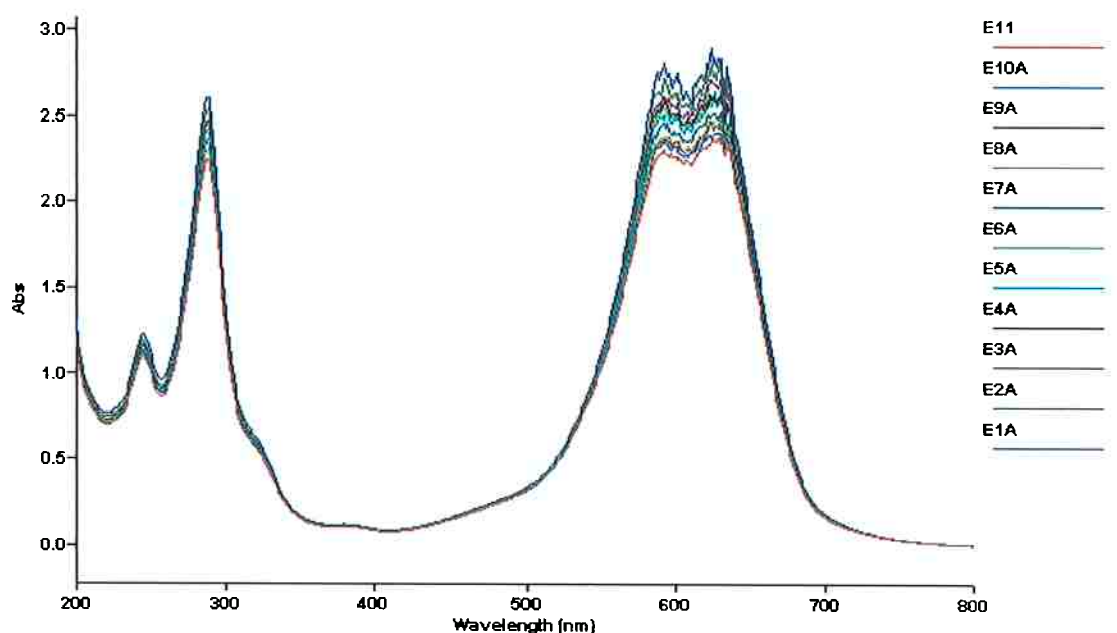


Figura 10 – Curvas de absorvância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série EA.

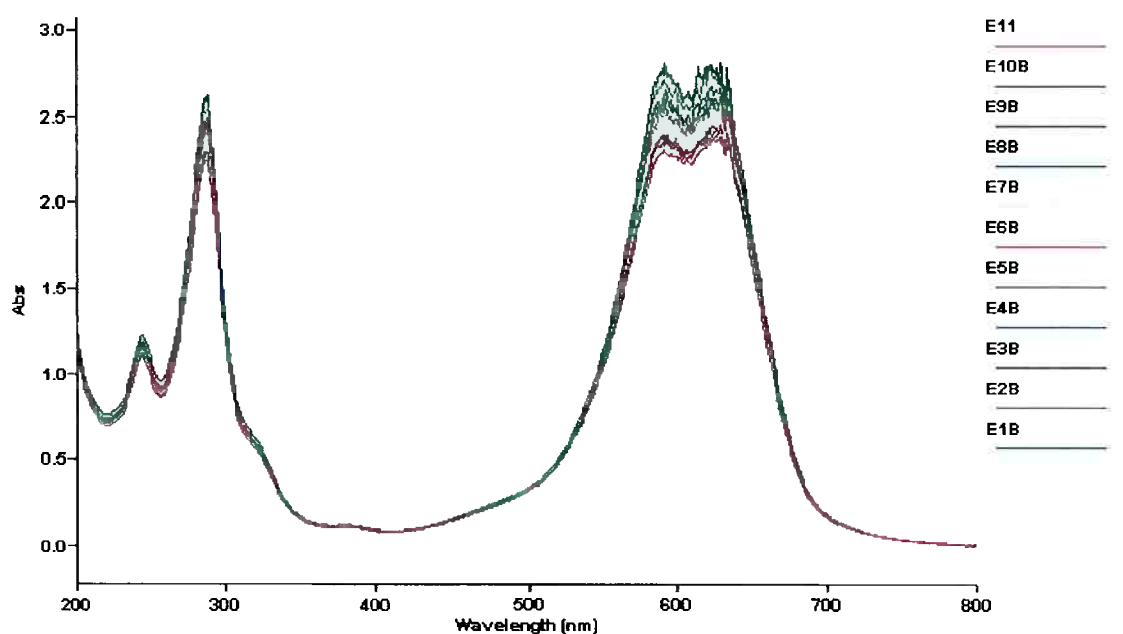


Figura 11 – Curvas de absorvância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série EB.

Desta forma, ao submeter a solução restante de azul de toluidina, após a retirada do complexo (heparina-azul de toluidina), à espectroscopia de UV, pode-se observar que há uma diminuição de absorvância proporcional ao aumento da quantidade de heparina presente na solução inicial. Isto ocorre pois quanto maior a quantidade de heparina existente inicialmente na solução, maior será a formação de complexo, e conseqüentemente maior será o consumo de azul de toluidina nesta reação, resultando em um valor de absorvância menor.

No entanto, em 631nm (pico referente ao azul de toluidina), o valor de absorvância não pôde ser aferido com precisão pois a quantidade de ruídos nas curvas é muito grande. Para resolver isto, os gráficos foram submetidos a um tratamento matemático, de modo que os valores de absorvância para este ponto pudessem ser avaliados. As curvas finais para cada série podem ser vistas nas Figuras 12 e 13.

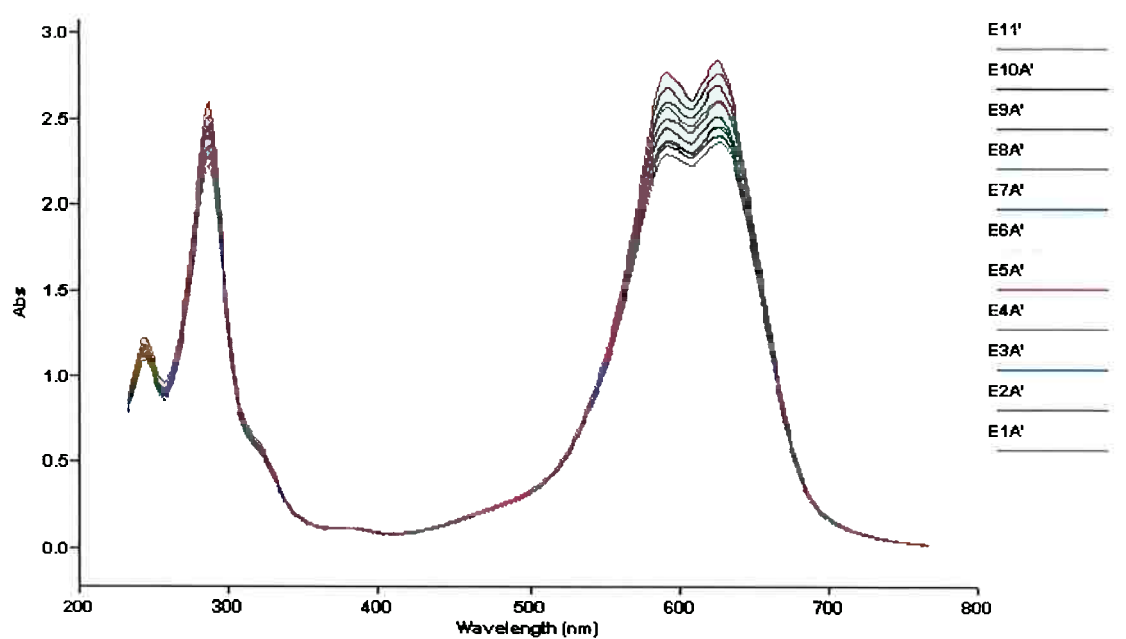


Figura 12 – Curvas de absorbância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série EA tratadas matematicamente.

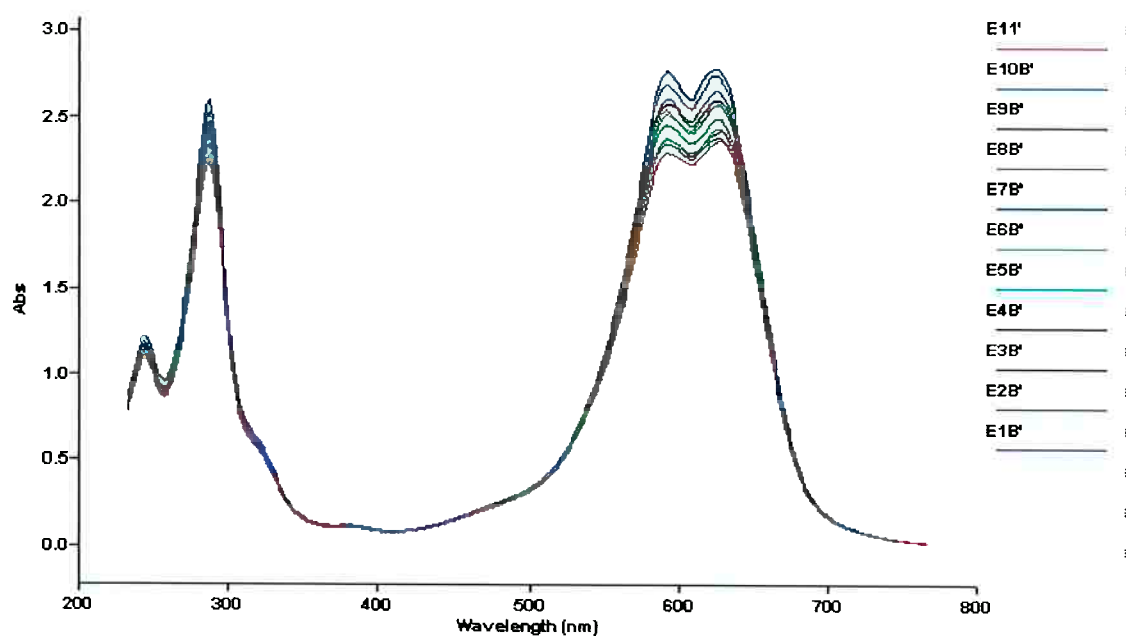


Figura 13 – Curvas de absorbância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série EB tratadas matematicamente.

A seguir se tem os dados utilizados na construção da curva de calibração referente à absorbância em função da concentração de heparina adicionada às soluções.

Tabela 7 – Dados para a construção da curva de calibração de absorbância em função da concentração de heparina.

Curvas	Absorbância (ABS)	Concentração de Heparina (%)
E1A	2,822	0,0040
E1B	2,785	0,0040
E2A	2,759	0,0042
E2B	2,738	0,0042
E3A	2,685	0,0044
E3B	2,649	0,0044
E4A	2,607	0,0046
E4B	2,600	0,0046
E5A	2,589	0,0048
E5B	2,566	0,0048
E6A	2,600	0,0050
E6B	2,566	0,0050
E7A	2,507	0,0052
E7B	2,482	0,0052
E8A	2,457	0,0054
E8B	2,429	0,0054
E9A	2,447	0,0056
E9B	2,419	0,0056
E10A	2,400	0,0058
E10B	2,382	0,0058
E11A	2,361	0,0060
E11B	2,361	0,0060

A curva de Calibração construída a partir dos dados acima (Tabela 7) pode ser vista na Figura 14:

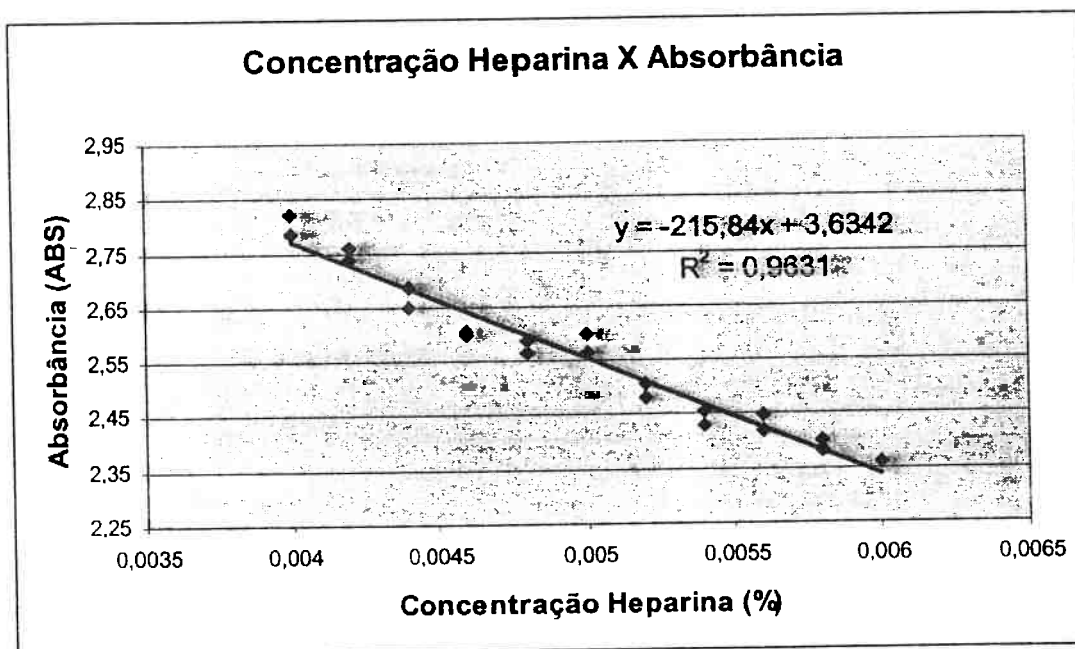


Figura 14 - Curva de Calibração da absorbância em função da concentração de heparina em 1ml de solução adicionada ao azul de toluidina.

Desta forma, esta curva de calibração nos fornece a absorbância em função da concentração de heparina contida em 1ml de solução da série C.

O gráfico da Figura 15 pode ser utilizado para correlacionar a concentração residual de azul de toluidina com a concentração da solução de heparina adicionada.

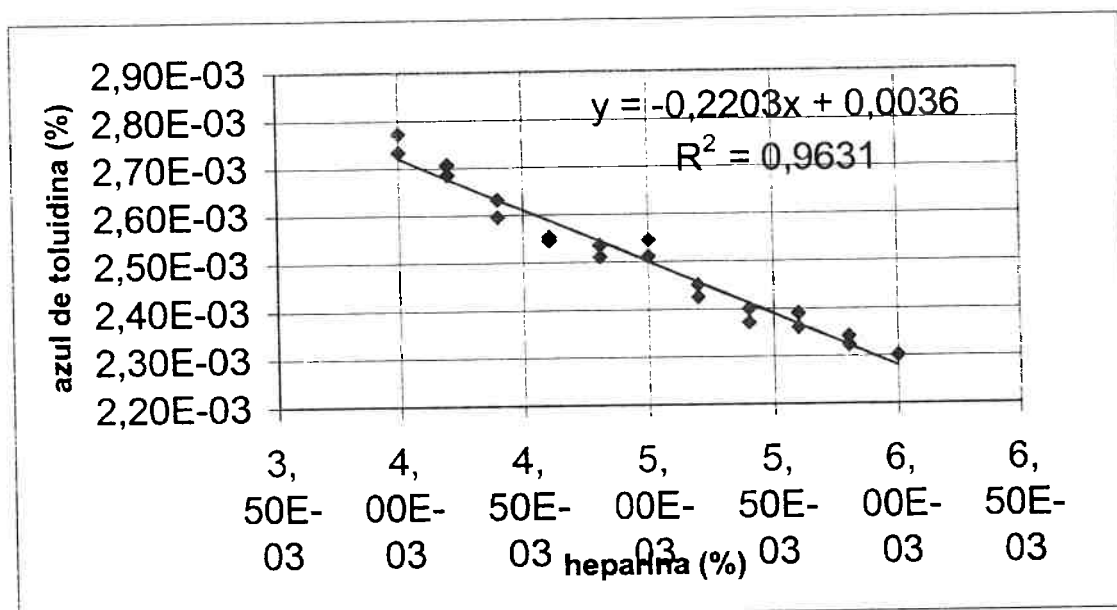


Figura 15 - Curva de Calibração da concentração de azul de toluidina em função da concentração de heparina. ($\Delta y = -0.2203\Delta x + 0,0036$)

Para uma mistura de 4ml de solução de toluidina com 1 ml de solução de heparina, a curva de calibração na Figura 15 correlaciona a redução de concentração de azul de toluidina com o aumento da concentração de heparina, de modo que conhecendo a concentração de azul de toluidina pode-se determinar a concentração de heparina.

4.3 Caracterização da superfície de Pellethane® recoberta com heparina

Com a análise das soluções obtidas através da amostragem durante o processo de adsorção de heparina na superfície do poliuretano, obteve-se o gráfico abaixo, onde se pode notar a variação da absorbância para cada uma das soluções. A tendência é que o valor de absorbância aumente com o passar do tempo, pois a concentração de heparina na solução de tratamento diminuirá à medida que esta seja adsorvida na superfície do poliuretano.

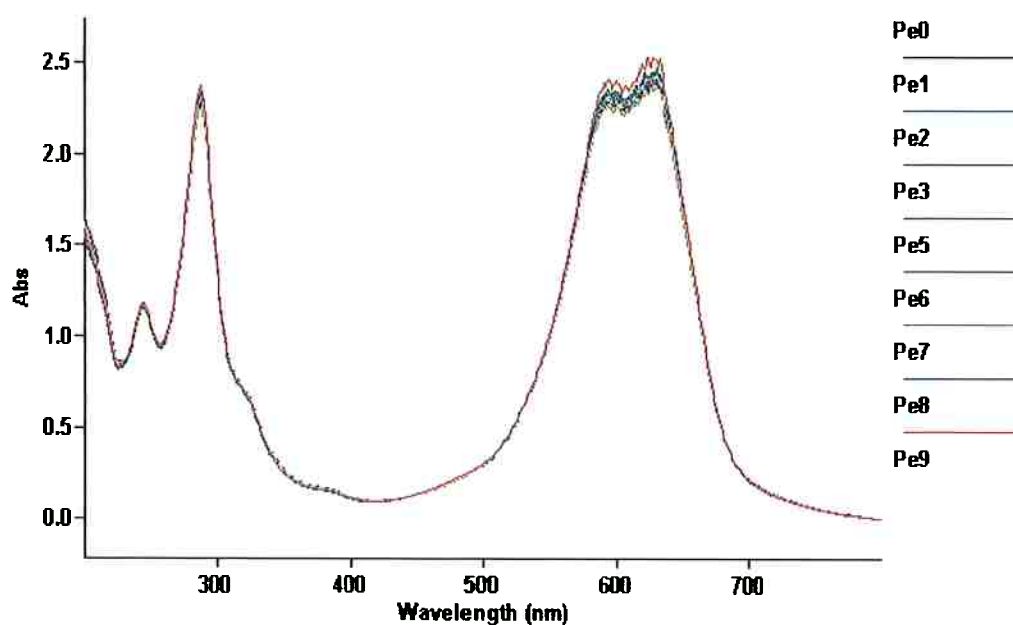


Figura 16 – Curvas de absorvância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série Pe.

Através deste gráfico, obtive-se os seguintes dados de absorvância em relação ao tempo em que a amostra foi submetida ao tratamento (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores de absorvância em função do tempo de tratamento a que o filme foi submetido.

TRATAMENTO PELLETHANE®		
	ABS	tempo
Pe0	2,152	0
Pe1	2,226	6
Pe2	2,268	12
Pe3	2,23	18
Pe5	2,31	24
Pe6	2,273	36
Pe7	2,319	42
Pe8	2,334	48
Pe9	2,355	54

Desprezando-se os pontos Pe3 e Pe6, que não se apresentam coerentes em relação aos outros pontos, obteve-se a curva abaixo (Figura 17).

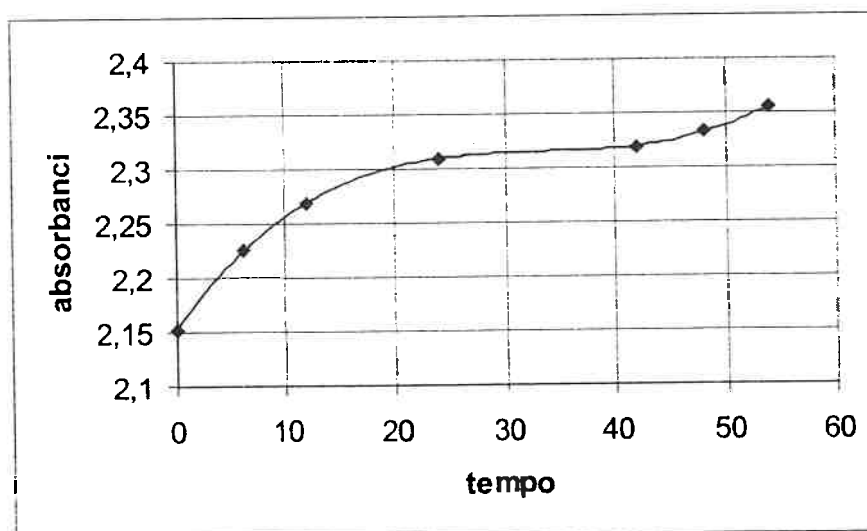


Figura 17 – Gráfico da absorvância em função do tempo de tratamento dos filmes. ($y = 4E-06x^3 - 0,0004x^2 + 0,0141x + 2,153$; $R^2 = 0,9994$)

A partir deste gráfico pode-se notar que a absorvância aumenta com o aumento do tempo de tratamento. Isto ocorre pois quanto maior o tempo de tratamento, maior a quantidade de heparina adsorvida na superfície do filme, e menor a sua concentração na solução de BAC Heparin®. Possuindo menor quantidade de heparina na solução, a quantidade de complexo formado também é menor, o que faz com que a absorvância aumente, pois uma quantidade menor de azul de toluidina será retirada da solução pelo hexano.

Convertendo cada valor de absorvância em função do tempo, em porcentagem de heparina remanescente (curva de calibração e equação da Figura 17) e considerando 15ml de solução de tratamento, pode-se determinar a concentração de heparina adsorvida sobre a superfície de Pellethane® (50 cm²) durante o intervalo de uma hora.

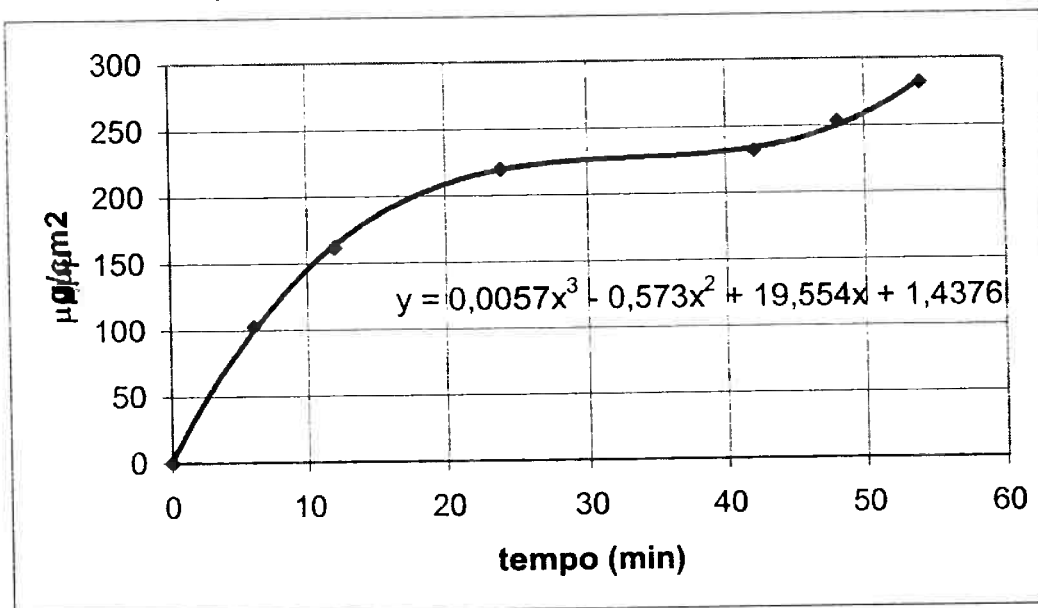


Figura 18 – Gráfico em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de heparina total adsorvida sobre o filme de poliuretano em função do tempo de tratamento. ($y = 0,0057x^3 - 0,573x^2 + 19,554x + 1,4376$)

4.4 Lavagem dos corpos de prova após tratamento

Com a análise das soluções obtidas através da lavagem do filme de poliuretano com Sol 1, obteve-se o gráfico abaixo, onde se pode notar a variação da absorbância para cada uma das soluções. A tendência é que o valor de absorbância diminua com o passar do tempo, pois a concentração de heparina na solução de lavagem aumentará à medida que esta seja desorvida da superfície do poliuretano.

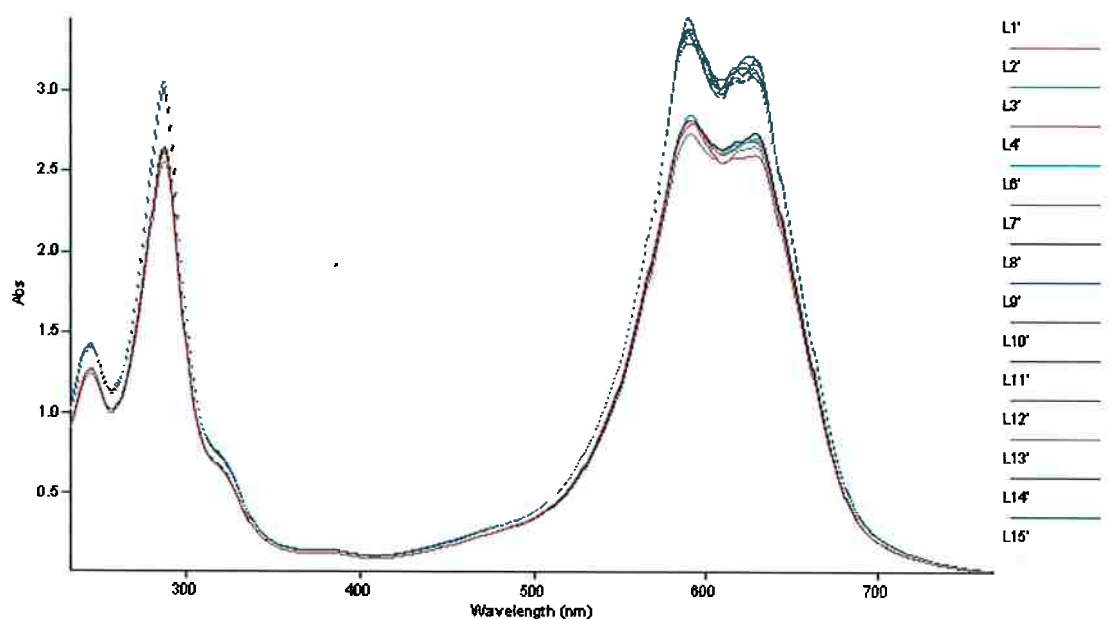


Figura 19 – Curvas de absorvância em função do comprimento de onda para todas as soluções da Série L (Lavagem)

Através deste gráfico, obteve-se os seguintes dados de absorvância em relação ao tempo em que a amostra foi submetida ao processo de lavagem (Tabela 8).

Tabela 9 – Valores de absorvância em função do tempo de lavagem a que o filme foi submetido.

LAVAGEM			
	Volume Coletado	ABS	tempo
L1	1ml	2,597	5
L2	1ml	2,688	10
L3	1ml	2,685	15
L4	1ml	2,7	20
L6	1ml	2,65	30
L7	1ml	2,734	40
L8	0.5ml	3,191	50
L9	0.5ml	3,142	60
L10	0.5ml	3,079	80
L11	0.5ml	3,133	100
L12	0.5ml	3,166	130
L13	0.5ml	3,107	160
L14	0.5ml	3,209	190
L15	0.5ml	3,073	240

De acordo com estes valores, foi obtida a curva a seguir (Figura 20).

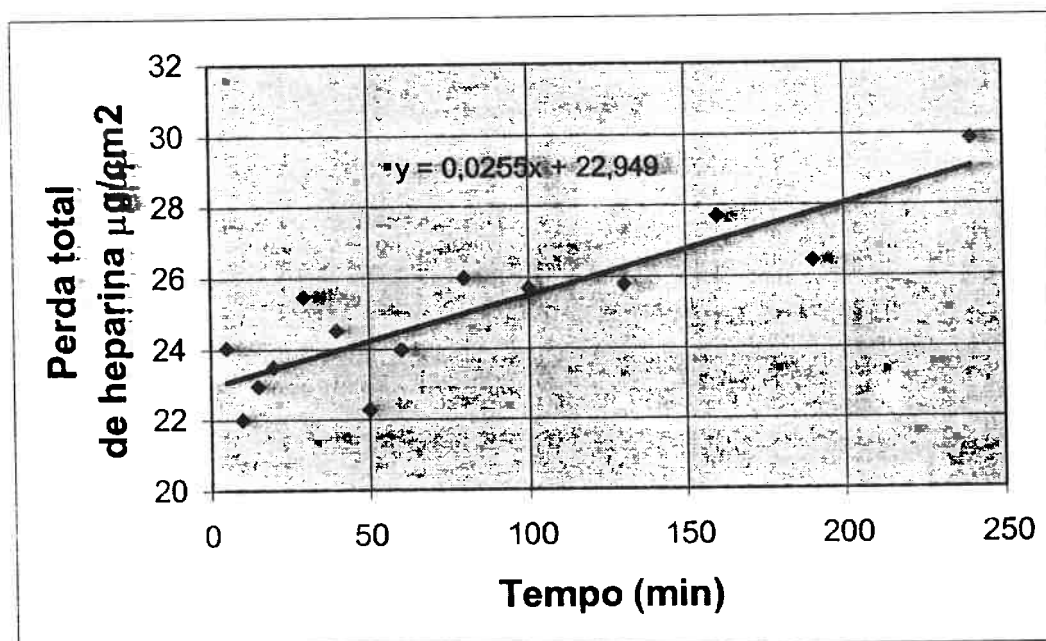


Figura 20 – Gráfico em µg/cm² de perda total de heparina da superfície dos filmes de poliuretano durante o tempo de lavagem. ($y = 0,0255x + 22,949$)

O gráfico acima representa a quantidade total de heparina desprendida do filme de poliuretano de acordo com o tempo de lavagem a que ele foi submetido. Observa-se que a quantidade total de heparina desprendida (25µg) em 4 horas de lavagem é muito pequena em relação à quantidade total de heparina adsorvida na superfície dos filmes poliuretano (225µg) em uma hora de tratamento.

Os resultados da lavagem mostram que a perda de heparina aumenta de forma praticamente linear de acordo com o aumento do tempo a que o filme é submetido a este procedimento. Com base na característica de dispersão dos pontos apresentada no gráfico da figura 20, considera-se que exista um pequeno desvio correspondente ao valor de absorbância de cada um dos pontos.

5. CONCLUSÕES

O método de colorimetria para a determinação da quantidade de heparina existente na superfície de filmes de poliuretano, mostrou-se relativamente consistente, apesar de ser razoavelmente trabalhoso, pois envolve a elaboração e a análise de inúmeras soluções. Um dos problemas deste método é a sua pequena sensibilidade a soluções de heparina muito diluídas, pois em baixas concentrações, os valores de absorbância são obtidos com variações consideráveis.

Através da análise colorimétrica foi possível concluir que a quantidade de heparina adsorvida na superfície de filmes de poliuretano aumenta com o aumento do tempo em que o filme fica imerso na solução de heparinato de benzalcônio. O processo de adsorção não possui comportamento linear, e tende a se estabilizar com o aumento do período de tratamento a que o filme é submetido.

Com a lavagem do filme de poliuretano, e analisando-o também pelo método de colorimetria, foi possível concluir que para o período de tempo observado (4 horas) a quantidade de heparina que se desprende da superfície do filme é bastante pequena. No entanto, é possível constatar que esta quantidade tende a aumentar com o aumento do intervalo de tempo a que o filme é submetido ao processo de lavagem.

Trabalhos anteriores[30] desenvolvidos no grupo, utilizando filmes de PVC forneceram valores inferiores de adsorção ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e porcentagens maiores de remoção na lavagem (25%). Estas diferenças podem ser atribuídas a maior polaridade do poliuretano comparada ao PVC, favorecendo a ligação da heparina sobre a sua superfície.

6. REFERÊNCIAS

1. EDMUNDS, H. L. Thorac. Cardiovasc. Surg. 90 (1951)1.
2. GOTT, V.L.; WHIFFEN, J.D.; DUTTON, R.C. (1963) Science 142:1297-1298.
3. LARM, O.; LARSSON, R.; OLSSON, P. Biomat. Med. Dev. Art. Org. 11 (1983) 161.
4. SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. Fundamentos da Circulação Extracorpórea, Centro Editorial Alfa Rio, Rio de Janeiro - RJ (1995).
5. BASMADJIAN, D.; SEFTON, M.V.; BALDWIN, S.A. (1997) Biomaterials 18:1511-1522.
6. ANSELME, K. (2000) Biomaterials 21:667-681.
7. KIM, H.; URBAN, M.W. (1998) Lagmuir 14:7235 - 7244.
8. REED, C. C.; STAFFORD, T.B. Cardiopulmonary Bypass, 2nd Edition, Texas Medical Press, Inc., Houston (1985).
9. ANDERSON, J. M.; KOTTKE-MARCHANT, K. Platelet Interactions with Biomaterials and Artificial Devices, CRC Critical Reviews in Biocompatibility, Vol. 1, Issue 2, CRC Press, Boca Raton (1985) 111-204.
10. WILLIAMS, D. Biocompatibility of Implant Materials, Sector Publishing Limited (1976).
11. LAMBA, N.M.K.; COURTNEY, J.M.; GAYLOR, J.D.S. (2000) ... Biomaterials 21:89-9
12. HARMAND, M.F.; BRIQUET, F. (1999) Biomaterials 20:1561-1571.
13. CHRISTENSEN, K.; LARSSON, R.; EMANUELSSON, H. (2001) Biomaterials 22:349-355.

14. ORANG, F. ; PLUMMER, C.J.G.; KAUSCH. H.H. Effects of processing conditions and in vitro ageing on the physical properties of Biomer, *Biomaterials* 17 (1996) 485-490
15. HARADA, N. S. et al. *Polymer International*, 2004, no prelo
16. BROOKS, H.A. et al. (1996) *Anal Chem* 68:1439-1443.
17. NOVELLO, W.P. et al.(1998) *J Mat Sci: Mat Med* 9:793-796.
18. KANG, I.-K. Preparation and surface characterization of functional group-grafted and heparin-immobilized polyurethanes by plasma glow discharg. *Biomaterials* v.17, n.8, p.485-490, 1996.
19. SILAEX QUÍMICA LTDA, São Paulo, Poliuretano , Disponível em:
<<http://www.silaex.com.br/pu.htm>>, Acesso em: 10 de out. 2004.