

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DA**

HELENA TAEKO TANAKA OYAMA

**Modificações das superfícies de poliuretanos para aumentar a
hemocompatibilidade de dispositivos cardiovasculares**

**SÃO PAULO - SP
2023**

HELENA TAEKO TANAKA OYAMA

Modificações das superfícies de poliuretanos para aumentar a hemocompatibilidade de dispositivos cardiovasculares

Trabalho apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológicas e de Processos Assistenciais Perioperatórios

Orientadora: Profa. Dra. Idágene Aparecida Cestari

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oyama, Helena Taeko Tanaka

Modificações das superfícies de poliuretanos para
aumentar a hemocompatibilidade de dispositivos
cardiovasculares / Helena Taeko Tanaka Oyama. --
São Paulo, 2023.

Dissertação (mestrado profissional)--Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Mestrado Profissional em Inovação
Tecnológicas e Processos Assistenciais
Perioperatórios. Área de Concentração: Inovação e
Medicina Perioperatória.

Orientadora: Idágene Aparecida Cestari.

Descritores: 1.Tratamento de superfície
2.Hemocompatibilidade 3.Fotoenxertia 4.Heparina
5.Óxido de grafeno 6.Óxido de grafeno reduzido

USP/FM/DBD-301/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: OYAMA, Helena Taeko Tanaka

Título: **Modificações das superfícies de poliuretanos para aumentar a hemocompatibilidade de dispositivos cardiovasculares**

Trabalho apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de “Mestre (a) em Ciências”

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento _____

*Ao meu esposo, por seu apoio amoroso e paciência,
aos meus filhos Henry, Thais e Fábio pela presença e
apoio e aos meus pais, Hiroshi e Kimico (in memoriam),
pelo amor, confiança e ensinamentos.*

Agradecimentos

Esta tese foi desenvolvida na Divisão de Bioengenharia do Instituto do Coração - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

À Professora Idágene A. Cestari, orientadora deste trabalho desejo manifestar um especial agradecimento pelo apoio constante, orientação, rigor científico e amizade.

Ao Professor Guilhermino J. M. Fachine por disponibilizar as instalações e equipamentos do laboratório de ensaios físico-químicos do Centro de Pesquisa de Grafeno (MackGraphe).

Ao Professor Hélio Ribeiro pelo fornecimento do óxido de grafeno.

Aos pesquisadores Anna Paula Godoy, Marina J. Maizato, Eraldo Sales, Lucas Cortella e Marcelo Mazetto pela colaboração no trabalho.

Ao Dr. Ismar N. Cestari por disponibilizar as instalações e equipamentos do laboratório de Engenharia de Tecidos.

Meu reconhecimento a todos os meus colegas de trabalho do Instituto do Coração que de algum modo contribuíram para a realização desta tese, em especial à equipe de Bioengenharia pelo apoio e amizade em todos os momentos.

“Sucesso é a combinação de fracassos, erros, começos errados, confusão e da determinação de continuar tentando mesmo assim.”

(Nick Gleason)

Resumo

Oyama HTT. Modificações das superfícies de poliuretanos para aumentar a hemocompatibilidade de dispositivos cardiovasculares [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A hemocompatibilidade representa um dos principais requisitos dos materiais utilizados em dispositivos médicos que entram em contato direto com o sangue. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar estratégias de tratamentos de superfície para aumentar a hemocompatibilidade do Poliéter Poliuretano Segmentado (PU) utilizado na confecção de dispositivos cardiovasculares. Duas estratégias foram propostas e avaliadas: a) a funcionalização da heparina na superfície do polímero pelo processo de fotoenxertia e b) a incorporação de nanocargas, de óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) com a heparina, na massa polimérica. Os tratamentos foram avaliados de acordo com ensaios definidos nas normas internacionais que incluem as caracterizações físico-químicas dos materiais e avaliações biológicas. As caracterizações termogravimétricas e por espectroscopias Raman mostraram a redução do GO com a heparina. As análises por FTIR também confirmaram a redução do GO e a funcionalização do heparinato de benzalcônio na superfície do PU. Os ensaios mecânicos de tração mostraram uma variação da resistência à tração entre as membranas de PU e as membranas dos nanocompósitos. As membranas de PUrGO tiveram maior tensão para uma mesma deformação de 500%. Esta membrana, na concentração de 0,2% de rGO, em 100% de deformação, apresentou um valor de módulo de Young de 16,41% maior que o PU puro. Houve redução do ângulo de contato das membranas as membranas de PU tratadas por fotoenxertia de 88,5° para 65,1°, tornando-as mais hidrofílicas. Os nanocompósitos de PU com rGO apresentaram aumento no ângulo de contato de 88,5° para 97,1° sugerindo aumento de hidrofobicidade. Os ensaios biológicos *in vitro* sugerem menor adesão de plaquetas em superfícies mais hidrofílicas de PUHepB do que em superfícies hidrofóbicas. A atividade hemolítica na superfície de PUrGO se mostrou menor nas superfícies mais hidrofóbicas do que nas membranas hidrofílicas. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade sugerem que as membranas de PU e as membranas tratadas apresentaram adesão e proliferação celular o que indica boa biocompatibilidade.

Palavras chaves: Tratamento de superfície. Hemocompatibilidade. Fotoexertia. Heparina. Óxido de grafeno. Óxido de grafeno reduzido.

Abstract

Oyama HTT. Modifications of polyurethane surfaces to increase hemocompatibility of cardiovascular devices [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Hemocompatibility represents one of the main requirements of materials used in medical devices that come into direct contact with blood. The purpose of this work was to develop and evaluate surface treatment strategies to increase the hemocompatibility of Segmented Polyether Polyurethane (PU) used in the manufacture of cardiovascular devices. Two strategies were proposed and evaluated: a) the functionalization of heparin on the polymer surface by the photografting process and b) the incorporation of nanofillers, graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) with heparin, in the polymer mass. The treatments were evaluated according to tests defined by international norms, which include the physical-chemical characterization of the materials and biological evaluations. Thermogravimetric and Raman characterizations spectroscopy showed the reduction of GO with heparin. FTIR analyses showed the reduction of GO and the functionalization of benzalkonium heparinate on the PU surface. The mechanical tensile tests showed a variation in tensile strength between the PU membranes and the nanocomposite membranes. The PUrGO membranes had a higher tension for the same 500% deformation. This membrane, at a concentration of 0.2% rGO, at 100% deformation, presented a Young's modulus value of 16.41% higher than pure PU. There was a reduction in the contact angle of the PU membranes treated by photografting from 88.5° to 65.1°, making them more hydrophilic. The PU nanocomposites with rGO showed an increase in the contact angle from 88.5° to 97.1°, suggesting increased hydrophobicity. Biological assays, in vitro, suggest less platelet adhesion to more hydrophilic PUHepB surfaces than to hydrophobic surfaces. The hemolytic activity on the PUrGO surface was lower on the more hydrophobic surfaces than the hydrophilic membranes. The results of the cytotoxicity assays suggest that the PU membranes and the treated membranes showed cell adhesion and proliferation, which indicates good biocompatibility.

Keywords: Surface treatment. Hemocompatibility. Photografting. Heparin. Graphene oxide. Reduced graphene oxide.

Lista de Figuras

FIGURA 2.1 – DAV INCOR DE 65 ML.....	23
FIGURA 2.2 - EXEMPLOS DE DISPOSITIVOS MÉDICOS. A) CATETER VENOSO CENTRAL DE DUPLO LÚMEN, B) DAV, C) BOMBA CENTRÍFUGA, D) VÁLVULA CARDÍACA MECÂNICA DE DUPLO FOLHETO E VÁLVULA BIOLÓGICA, E) <i>STENT</i> CORONÁRIO, F) DAV, IMPLANTÁVEL, THORATEC.....	25
FIGURA 2.3 - REAÇÕES ENZIMÁTICAS DA CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.	29
FIGURA 2.4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO DO PLASMA.	35
FIGURA 2.5 - (A) GRÁFICO DE INTENSIDADE RELATIVA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DE LÂMPADAS DE MERCÚRIO E LED, (B) INTENSIDADE LUMINOSA EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO.	35
FIGURA 2.6 - ESTRUTURA DOS FOTOINICIADORES, FENILAMIDAS E DIFENILCETONAS, ONDE R: SÃO OS GRUPOS TERMOATIVOS TAIS COMO CARBOXIL, GRUPOS ALDEÍDOS, OU CADEIAS POLIMÉRICAS ETC.....	37
FIGURA 2.7 - EXEMPLO DE DECOMPOSIÇÃO EM RADICAIS LIVRES ATRAVÉS DA ABSORÇÃO DE LUZ.....	37
FIGURA 4.1 - OBTENÇÃO DE TPU (R' PODE SER AROMÁTICO OU ALIFÁTICO) E ESTRUTURAS QUÍMICAS DE POLIURETANOS COMUNS, UTILIZADOS EM DISPOSITIVOS CARDIOVASCULARES.....	39
FIGURA 4.2 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA MORFOLOGIA DO TPU.	41
FIGURA 4.3 - ESTRUTURA DA HEPARINA.....	43
FIGURA 4.4 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OBTENÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFITE A PARTIR DA SUA OXIDAÇÃO PELO MÉTODO DE HUMMERS MODIFICADO, SEGUIDO DA ESFOLIAÇÃO PARA FORMAÇÃO DE FOLHAS DE GO, E REDUÇÃO PARA FORMAÇÃO DE RGO.	46
FIGURA 4.5 - REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE HEPARINATO DE BENZALCÔNIO.....	47
FIGURA 4.6 - FÓRMULA ESTRUTURAL E MASSA MOLAR DO N, N- DIMETILACETAMIDA.	48
FIGURA 4.7 - ESQUEMA PARA A OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE PU.....	49
FIGURA 4.8 - CÂMARA CONSTRUÍDA PARA FOTOPOLIMERIZAÇÃO.....	49
FIGURA 4.9 - ESQUEMA PARA A OBTENÇÃO DE SUPERFÍCIE TRATADA COM O COMPLEXO DE CLORETO DE BENZALCÔNIO POR UV.	50
FIGURA 4.10 - ESQUEMA PARA A OBTENÇÃO DE RGO.	52
FIGURA 4.11 - VISTA DAS GARRAS PNEUMÁTICAS E CORPO DE PROVA UTILIZADAS NO ENSAIO DE TRAÇÃO.....	54
FIGURA 4.12 - REPRESENTAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE FORÇAS DE UM LÍQUIDO EM CONTATO COM UM SÓLIDO, ONDE θ É A MEDIDA DO ÂNGULO E γ_{LV} , γ_{SV} E γ_{SL} REPRESENTAM AS ENERGIAS DA INTERFACE LÍQUIDO-VAPOR, SÓLIDO-VAPOR E SÓLIDO-LÍQUIDO, RESPECTIVAMENTE.	56
FIGURA 4.13 - FLUXOGRAMA DA NORMA ISO 10993-1 QUE DETERMINA SE O TESTE DE INTERAÇÃO COM SANGUE É NECESSÁRIO.....	61
FIGURA 5.1 – REDUÇÃO DO GO UTILIZANDO HEPARINA EM SOLUÇÃO ALCALINA.	67
FIGURA 5.2.- TERMOGRAMAS DA HEPARINA (EM VERMELHO), DO GO (EM PRETO) E DO RGO (EM AZUL).	68
FIGURA 5.3 - ESPECTRO RAMAN OBTIDO PARA A AMOSTRA DE HEPARINA, RGO HEP E GO.	70
FIGURA 5.4. ESPECTROS DE FTIR DOS MATERIAIS DE PARTIDA HEPARINA (EM VERMELHO), RGO (EM VERDE) E GO (EM AZUL).	71
FIGURA 5.5 - ESPECTRO RAMAN OBTIDO PARA A MEMBRANAS DE PU, PUGO E PURGO.	73
FIGURA 5.6 - ESPECTROS FTIR DA SUPERFÍCIE DAS MEMBRANAS DE PU E PU TRATADO COM HEPB.	74
FIGURA 5.7 - ESPECTROS DE FTIR DE PU (BIOSPAN), PU/GO (0,05;0,1 E 0,2%) E PU/RGO. (0,05;0,1 E 0,2%).	75
FIGURA 5.8 – (A) MÓDULO DE YOUNG X DEFORMAÇÃO E (B) TENSÃO X DEFORMAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PU, PUHEPB, PUGO E PURGO EM 500% DE DEFORMAÇÃO.....	77
FIGURA 5.9 - (A) ÂNGULOS DE CONTATO DA ÁGUA FORMADOS EM CONTATO COM A SUPERFÍCIE DAS MEMBRANAS E (B) ENERGIA DE SUPERFÍCIE COM AS COMPONENTES POLARES E DISPERSIVAS DA ÁGUA PARA AS MEMBRANAS SEM E COM TRATAMENTOS.	81
FIGURA 5.10 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HEPARINA EM 626NM.	82
FIGURA 5.11 – AMOSTRA DE PU COM HEPARINA EM SOLUÇÃO DE AZUL DE TOLUIDINA APÓS 8, 24, 48,72 E 96 HORAS.	83
FIGURA 5.12 – MICROGRAFIAS DE ADESÃO DE PLAQUETAS NAS SUPERFÍCIES DAS MEMBRANAS DE (A) PU BIOSPAN, (B) PUHEPB, (C) PUGO E (D) PURGO APÓS 1 HORA DE INCUBAÇÃO (5000 V).	84
FIGURA 5.13 – NÚMERO DE PLAQUETAS ADERIDAS NA SUPERFÍCIE DAS MEMBRANAS DE PU, PUHEPB, PUGO E PURGO.....	85
FIGURA 5.14 – ÍNDICE HEMOLÍTICO DE PU, PUHEPB, PUGO E PURGO.....	86
FIGURA 5.15 - MICROGRAFIAS DE: A) CÉLULA HUVEC NA MICROPLACA DE CULTURA (CONTROLE POSITIVO), B) PU, C) PU HEP, D) PUGO, E) PURGO CULTIVADAS COM CÉLULAS HUVEC DEMONSTRAM QUE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ESTÁ ALTERADA APÓS 24 HORAS.	87
FIGURA 5.16 - CURVA PADRÃO OBTIDA NA ABSORBÂNCIA DE 490 NM.....	88

FIGURA 5.17 - REDUÇÃO DE MTS A UM FORMAZAN SOLÚVEL AQUOSO ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS DO NADH NO CITOPLASMA.	88
FIGURA 5.18 – NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS APÓS CULTURA DE 24 E 72 HORAS.	89

Lista de Tabelas

TABELA 2.1 - CLASSIFICAÇÃO DE ALGUNS DISPOSITIVOS DE ASSISTÊNCIA CIRCULATORIA MECÂNICA.	22
TABELA 2.2 - EXEMPLOS DE BIOMATERIAIS E SUAS APLICAÇÕES.....	24
TABELA 4.1 - EXEMPLOS DE DISPOSITIVOS IMPLANTÁVEIS E ENSAIOS RECOMENDADOS	62
TABELA 4.2 - MÉTODO DE ENSAIOS PARA DISPOSITIVOS IMPLANTÁVEIS.	62
TABELA 5.1- AMOSTRA, TENSÃO À RUPTURA E MÓDULO DE YOUNG NA ELONGAÇÃO DE 500%.....	76
TABELA 5.2 - QUANTIFICAÇÃO DE HEPARINA NA SUPERFÍCIE DE PU.	83
TABELA 5.3 - VALORES MÉDIOS DE HEMATÓCRITO, PLAQUETAS, HEMOGLOBINA TOTAL E, HEMOGLOBINA SÉRICA OBTIDOS NO HEMOGRAMA (AMOSTRAS DE SANGUE COLETADOS EM DIFERENTES TEMPOS).....	86

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC(s) – Ângulo de Contato (s)
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM – *American Society for Testing and Materials*
ATO – Azul de Toluidina
ATR - Refletância Total Atenuada
BIA – Balão Intra-Aórtico
BioSpan® – Poliéter Poliuretano Segmentado
Ca²⁺- Íon cálcio
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CO₂ – Dióxido de carbono
DAV – Dispositivo de Assistência Ventricular
DAC(s) – Dispositivo(s) de Assistência Circulatória
DCL – Carbono tipo diamante
DMAC – N, N, Dimetil Acetamida
DMTA – Análise Térmica Mecânica Dinâmica
DP – Desvio Padrão
ECMO – Oxigenação por Membrana Extracorpórea
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA – *Food and Drug Administration*
FT – Fator Tecidual
FTIR – Infravermelho com Transformada de Fourier
HCl – Ácido clorídrico
IC – Insuficiência Cardíaca
I_D/I_G – Intensidade da banda D versus intensidade da banda G
InCor – Instituto do Coração
ISO – *International Organization for Standardization*
GO – Óxido de Grafeno
rGO – Óxido de Grafeno Reduzido
HEMA – 2-Hidroxietil Metacrilato
HepB – Heparinato de Benzalcônio
HUVEC – Células endoteliais da veia umbilical humana
LDH – Lactato desidrogenase
MCP – Metacriloil Oxietil Fosforilcolina
MES – composto ácido 2-etanossulfônico
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Mille Q – Água ultra pura

MTS – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- tetrazólio)

N₂ – Gás Nitrogênio

NaCl – Cloreto de sódio

NH₄OH – Hidróxido de Amônio

NHS – N-Hidroxisuccinimida

NO – Óxido Nítrico

NVP – N-Vinilpirrolidona

Omnirad 2959 – 1- [4- (2- hidroxietanoil) - fenil]- 2 - hidroxil - 2 - metil propanona

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato-salino

PCU – Policarbonato Uretano

PEG – Polietilenoglicol

PEGDA – Polietilenoglicol Diacrilato

PEGMA – Polietilenoglicol Monoacrilato

ph – Potencial Hidrogênio

PPR – Ponte para Recuperação

PPT – Ponte para Transplante

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PU – Poliuretano

PUHepB – Poliuretano heparina benzalcônio

PUGO – Poliuretano/Óxido de Grafeno

PUrGO – Poliuretano/Óxido de Grafeno Reduzido

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

SO₃ – Sulfito

SUS – Sistema Único de Saúde

TD – Terapia Destino

TGA – Análise Termogravimétrica

TiN – Nitreto de Titânio

TPU – Termoplástico de Poliuretano

UI – Unidade Internacional

UV – Ultravioleta

Sumário

INTRODUÇÃO	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E CONSIDERAÇÕES GERAIS	21
2.1 DISPOSITIVOS DE ASSISTÊNCIA VENTRICULAR (DAVs)	21
2.2 DISPOSITIVO DE ASSISTÊNCIA VENTRICULAR INCOR (DAV-INCOR).....	22
2.3 BIOMATERIAIS	23
2.4 BIOCOMPATIBILIDADE	26
2.5 HEMOCOMPATIBILIDADE	26
2.6 PROCESSOS DE COAGULAÇÃO	28
2.7 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE.....	31
2.7.1 <i>Métodos de tratamento de superfície</i>	31
2.7.1.1 <i>Revestimentos Passivos ou Inertes</i>	32
2.7.1.2 <i>Revestimentos ativos</i>	32
2.7.1.3 <i>Revestimentos Biomiméticos</i>	33
2.7.2 <i>Processos de tratamento</i>	33
2.7.2.1 <i>Tratamento químico com heparina</i>	33
2.7.2.2 <i>Tratamento por plasma</i>	34
2.7.2.3 <i>Tratamento por radiação Ultravioleta (UV)</i>	35
OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	38
MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 MATERIAIS	39
4.1.1 <i>Poliuretanos (PUs)</i>	39
4.1.2 <i>Heparina</i>	42
4.1.3 <i>Óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO)</i>	44
4.1.4 <i>Complexo de Heparinato de Benzalcônio (HepB)</i>	47
4.1.5 <i>N,N - Dimetilacetamida (DMAc)</i>	48
4.2 MÉTODOS	48
4.2.1 <i>Obtenção de Membranas de PU (BioSpan®)</i>	48
4.2.2 <i>Construção de Câmara UV com ambiente inerte</i>	49
4.2.3 <i>Tratamento com o complexo de Heparinato de Benzalcônio, por fotoreação, sob irradiação UV, para a obtenção de poliuretano/heparinato de benzalcônio (PUHepB)</i>	50
4.2.4 <i>Tratamento com a inserção de nanocargas de GO e rGO</i>	51
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	52
4.3.1 <i>Ensaio físico-químicos</i>	52
4.3.2 <i>Ensaio Biológicos</i>	60
4.3.2.3 <i>Ensaio de Biocompatibilidade “in vitro”</i>	64
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	65
RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS DE PARTIDA (HEPARINA, GO E RGO)	66
5.1.1 <i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	67
5.1.2 <i>Espectroscopia Raman</i>	68
5.1.3 <i>Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	70
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS	72
5.2.1 <i>Espectroscopia Raman</i>	72
5.2.2 <i>Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	73
5.2.3 <i>Ensaio mecânico de tração</i>	75
5.2.4 <i>Molhabilidade e energia livre de superfície</i>	78
5.2.5 <i>Ensaio Colorimétrico</i>	82
5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	83
5.3.1 <i>Avaliação da adesão de plaquetas</i>	83
5.3.2 <i>Atividade Hemolítica</i>	85

5.3.3. <i>Análise de Biocompatibilidade</i>	87
CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	93
ANEXO 1- APROVAÇÃO DA CEUA	100
ANEXO 2: NÚMERO DE ONDA CORRESPONDENTES A LIGAÇÕES QUÍMICAS	101

INTRODUÇÃO

Na ciência dos biomateriais, o desenvolvimento de materiais compatíveis com o sangue representa um grande desafio porque o sangue contém muitos tipos de células, proteínas funcionais e moléculas sinalizadoras que trabalham em conjunto para proteger o sistema circulatório de lesões, patógenos e materiais estranhos.

As diferenças nas propriedades físicas, químicas e biológicas entre os materiais sintéticos utilizados em implantes cardiovasculares e os tecidos biológicos leva a interações sangue-material indesejáveis. Para dispositivos cardiovasculares implantados e componentes de sistemas de suporte à vida, interações entre o sangue e o material, como coagulação (trombose) e inflamação, podem levar a resultados desfavoráveis (1).

Dentre os dispositivos que fazem contato com o sangue podemos incluir os implantes como *stents* e válvulas cardíacas, componentes de sistemas extracorpóreos de suporte à vida tais como cateteres, tubos e membranas usadas em oxigenadores de sangue etc. Algumas dessas aplicações requerem apenas um contato breve entre o material e o sangue enquanto outras envolvem contato em longo prazo (dias ou anos). Os bons resultados do uso dessas tecnologias dependem da capacidade de gerenciar e prevenir essas complicações.

Entre as doenças cardiovasculares, o infarto do miocárdio e a insuficiência cardíaca (IC) são as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo. No Brasil, a IC é de aproximadamente 2 milhões de pacientes, e aproximadamente 240 mil novos casos por ano e foram registrados 567.789 óbitos por IC em adultos com idade acima de 50 anos, entre os anos de 1998 a 2019. (2)

Na IC, o coração é incapaz de manter a circulação sanguínea adequada e corresponde a 21% das internações hospitalares no Brasil (3). Diante deste quadro, muitas pesquisas são realizadas em busca de novas tecnologias para o desenvolvimento de Sistemas de Assistência Circulatória Mecânicos cada vez mais eficazes e com tamanhos menores e, como esses entram em contato com o sangue, a hemocompatibilidade de tais dispositivos ainda é um grande desafio (4).

Apesar dos benefícios para a estabilização hemodinâmica do paciente, o uso de dispositivos artificiais pode resultar em complicações como trombose,

sangramentos e infecções, ocasionados pelas interações do sangue com os biomateriais utilizados nos mesmos, principalmente em usos de longo prazo (5). Ainda assim, em pacientes gravemente enfermos com IC em estágio terminal, o uso de dispositivos de assistência ventricular (DAVs) é uma terapia recomendada. Em alguns casos, os DAVs são utilizados como ponte para o transplante cardíaco, o que muitas vezes se torna demorado pela falta de órgãos compatíveis e em estado adequado (6).

As interações entre o sangue e os materiais dos dispositivos médicos permanecem um desafio, pois reações bioquímicas induzem mudanças nas funções fisiológicas do sangue. Este é um fenômeno complexo e as revisões sobre o assunto ainda não concluíram exatamente quais os parâmetros físico-químicos que regem as interações na interface biomaterial / sangue (7-9) e, apesar dos rápidos avanços na tecnologia cardiovascular, nenhum dos materiais em uso clínico pode atender a todos os requisitos de compatibilidade sanguínea (9).

Muitos estudos sobre as interações das superfícies dos biomateriais com componentes do sangue permitiram o entendimento sobre trombose e inflamação. A inibição da formação de trombos em superfícies artificiais pode ser abordada com modificação de superfície incluindo tratamentos a laser ou luz ultravioleta, polimerização por plasma, entre outros. Várias estratégias como a incorporação de polímeros hidrofílicos, componentes bioativos, endotelização de superfície e liberação de óxido nítrico (NO) têm sido propostas. Revestimentos como o de nitreto de titânio (TiN) (10) e de carbono tipo diamante (DLC) (11) são revestimentos inorgânicos; o tratamento com metacriloiloxietil fosforilcolina (MPC) é um tipo de revestimento orgânico (12,13); superfícies texturizadas e revestimento com células endoteliais (14) são tipos de revestimentos bioativos. Processos que incluem a funcionalização da heparina na superfície, por exemplo, o Processo Carmeda® (15), são métodos utilizados geralmente pelo próprio fabricante dos dispositivos e têm custos elevados, e os revestimentos com células ainda estão nos estágios iniciais de pesquisa e desenvolvimento (16).

A proposta deste trabalho é desenvolver um método nacional, eficiente e de baixo custo para melhorar a hemocompatibilidade do copolímero de poliéter poliuretano utilizado no desenvolvimento dos dispositivos ventriculares (DAV) desenvolvidos no InCor.

A funcionalização da superfície polimérica foi realizada utilizando dois métodos distintos: com o complexo de heparinato de benzalcônio ativado por luz ultravioleta (UV) com o propósito de torná-la mais hidrofílica e diminuir a adesão de proteínas; e a incorporação de nanocargas de óxido de grafeno (GO) em PU, visando a alteração da energia de superfície dos dispositivos, tornando-os mais hemocompatíveis e melhorando as propriedades físicas e biológicas (17,18). Após os tratamentos, as membranas foram avaliadas por ensaios de caracterização físico-químicos e biológicos, seguindo a norma ISO 10993-4 (19).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste capítulo, são apresentados os dispositivos de assistência circulatória mecânicos, as definições utilizadas no desenvolvimento deste trabalho e os mecanismos de coagulação que podem ocorrer nas superfícies dos dispositivos médicos. Ao final, são mostrados os processos de tratamento de superfícies e os métodos utilizados na caracterização físico-química dos materiais.

2.1 Dispositivos de Assistência Ventricular (DAVs)

Os dispositivos de assistência ventricular são utilizados como assistência circulatória quando há insuficiência cardíaca (IC), isto é, quando o bombeamento do sangue pelo coração não atende à demanda metabólica tecidual (20). Os DAVs consistem em bombas mecânicas para auxiliar ou até mesmo substituir a função ventricular.

Os dispositivos extracorpóreos são de uso temporários, enquanto os intracorpóreos podem ser implantados e possuem função em longo prazo .

As indicações para o uso desses dispositivos são: ponte para recuperação (PPR), ponte para transplante (PPT) e terapia de destino (TD).

Na PPR, os DAVs são empregados em pacientes em choque cardiogênico agudo ou IC que não respondem ao tratamento medicamentoso, por exemplo, o infarto agudo do miocárdio e miocardite aguda. Nesses casos, são mais utilizados o balão intraórtico de (BIA), DAVs extracorpóreos e a oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO), na qual o dispositivo serve como suporte cardíaco e pulmonar.

Quando não há melhora esperada da função cardíaca, o dispositivo que foi implantado como PPR pode servir como PPT ou PPP.

O dispositivo para PPT é usado quando há choque cardiogênico e/ou IC descompensada, não ocorre melhoras da função miocárdica ou resolução do quadro com medicamentos e é indicada para o transplante cardíaco. Nesses casos, são recomendados os DAVs implantáveis de longa duração.

Os dispositivos para Terapia de Destino (TD) são empregados em pacientes com IC grave irreversível e que não são candidatos a transplante cardíaco. Nessas

situações, é indicada a utilização de dispositivos de longo prazo (ex. bombas implantáveis) que permitam a mobilidade do paciente.

Os DAVs podem ser classificados em função de diferentes critérios, como apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Classificação de alguns dispositivos de assistência circulatória mecânica.

Tipo de Fluxo	Tipo de dispositivo
• Contra- pulsação	Balão intra-aórtico
• Contínuo	Bombas centrífugas e axiais
• Pulsátil	Ventrículo artificial pneumático ou elétrico
Posição em relação ao coração	Em série ou paralelo
Assistência Ventricular	Direito, esquerdo ou biventricular
Posição em relação ao paciente	Paracorpóreo ou implantável
Tempo de permanência	Curta duração (menor que 30 dias)
	Média duração (30dias – 1 ano)
	Longa duração (> 1 ano)

Fonte: própria autora.

2.2 Dispositivo de Assistência Ventricular InCor (DAV-InCor)

O DAV INCOR-FMUSP permite a assistência circulatória mecânica por semanas para pacientes internados com cardiomiopatias graves e com uma diminuição importante da capacidade de bombeamento do sangue do coração para os órgãos vitais. Os DAVs com volume de injeção de até 65 mL de sangue por batimento, já foram avaliadas clinicamente desde 1993 por períodos de até 42 dias de assistência.

O DAV INCOR-FMUSP é paracorpóreo e consiste em uma bomba mecânica para auxiliar a função ventricular (21). A prótese ventricular é acionada por sistema pneumático de fluxo pulsátil (22). Possui duas câmaras injetadas de Policarbonato Uretano (PCU), que são separadas por um diafragma de membrana flexível de Poliéter Poliuretano segmentado (*BioSpan*[®]). O DAV realiza o trabalho do coração e restabelece a pressão e a circulação sanguínea. A Figura 2.1 ilustra o DAV-InCor. Os polímeros utilizados são biocompatíveis e de grau médico para implantes de longa duração.

Todos os processos para a produção do DAV são realizados segundo a norma ABNT ISO 14644, relativa à produção de dispositivos médicos pós-esterilizáveis em uma área classificada ISO 8, no interior de fluxos laminares de classe ISO 5.

Figura 2.1 – DAV InCor de 65 mL.



Fonte: Foto disponibilizado pela Divisão de Bioengenharia - InCor HCFMUSP.

Apesar dos avanços nas últimas décadas, complicações como a trombose e as infecções continuam sendo problemas não resolvidos para os materiais sintéticos utilizados em aplicações de contato com o sangue por períodos prolongados.

2.3 Biomateriais

No desenvolvimento de dispositivos de uso médico são utilizados materiais biocompatíveis, denominados de biomateriais. O conceito de biomateriais sofreu várias alterações ao longo do tempo. Com os avanços tecnológicos na obtenção e aplicações destes, houve uma redefinição dos termos na Conferência em Chengdu, China, em 2018. Especialistas na área se reuniram para redefinir os princípios mais importantes de biomateriais e biocompatibilidade e o termo passou a ser definido como: *“Um material projetado para assumir uma forma que pode direcionar, por meio de interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico”* (4 p 22 , tradução livre) (23).

Os biomateriais podem ser divididos em quatro grandes classes: metais e suas ligas, polímeros, cerâmicas, compósitos e materiais biológicos. São amplamente utilizados em diferentes áreas médicas como: biomateriais cardiovasculares, para

geração de substitutos da pele, em sistemas de liberação de drogas, como implantes ortopédicos etc. A Tabela 2.2 apresenta alguns exemplos de biomateriais e suas aplicações.

Tabela 2.2 - Exemplos de biomateriais e suas aplicações.

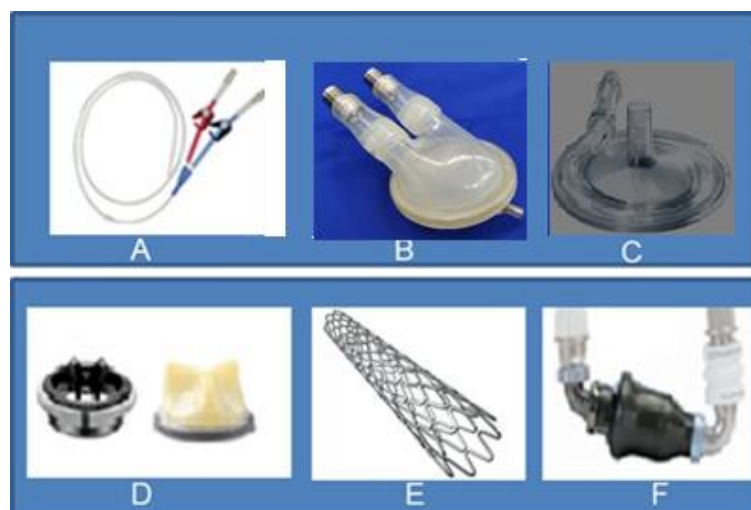
METAIS E LIGAS METÁLICAS	EXEMPLO DE APLICAÇÕES
Aços inoxidáveis; ligas de: cobalto-cromo, níquel-cromo, nitinol, (ligas efeito memória de forma); titânio e suas ligas	Arames guias, válvulas de coração mecânico, placas para fraturas, parafusos para reparo ósseo, suportes para corações artificiais, marca-passos
MATERIAIS SINTÉTICOS E BIOLÓGICOS NÃO DEGRADÁVEIS	
Acrílicos	Suportes para dispositivos extra-corpóreos
Epóxis	Suportes, compósitos de fibras
Fluorcarbonetos	Enxertos vasculares, remendos abdominais
Hidrogéis	Camadas para cateter, antiadesivos
Poliacetatos	Estruturas para válvula cardíaca, partes estruturais
Poliâmidas	Suturas, cateteres, curativos para ferimentos
Policarbonatos	Suportes para dispositivos extra-corpóreos
Poliéteres	Enxertos vasculares, balões de angioplastia, cateteres
Poli (metacrilato de metila)	Cimento ósseo, lentes intra-oculares
Poliolefinas (polietileno, polipropileno, etc)	Suturas, balões para angioplastia, cateteres
Polisulfonas	Componentes de sutura, dispositivos ortopédicos
Poliuretanos	Cateteres, corações artificiais, curativos
PVC (policloreto de vinila)	Tubos, bolsas sangüneas
Silicones	Juntas para dedos, cateteres, cânulas
Polietileno de ultra alto peso molecular	Cálice acetibular, tecidos de alta resistência
Pericárdio bovino	Substitutos de pericárdio, válvulas cardíacas
Tendões e osso bovino liofilizada e descalcificados	Tendões e implantes ósseos
Cordão umbilical humano	Enxertos vasculares
MATERIAIS SINTÉTICOS E BIOLÓGICOS BIOREABSORVÍVEIS	
Policaprolactonas	Suturas, liberação controlada
Copolímeros de Ácido Poli Lático/Ácido Glicólico	Suturas, liberação controlada, placas ósseas
Poli-hidroxil butiratos	Liberação controlada, placas ósseas
Poliésteres	Liberação controlada
Colágeno	Camadas, reconstrução de tecidos moles
Hidroxiapatita	Implantes ósseos, cirurgia reconstrutiva
Quitosana	Experimental, camadas, liberação controlada
Colágeno	Andaimos, curativos, órgãos híbridos
Elastina	Revestimento, andaimos
Gelatina liofilizada	Revestimento para corações artificiais
Ácido hialurônico	Anti-inflamatório ocular e de junta
COMPÓSITOS, CERÂMICAS E NANOMATERIAIS	

Vidros bioativos	Ligação óssea, cirurgia reconstrutiva
Alumina de alta densidade	Implantes odontológicos e ortopédicos
Hidroxiapatita, Fosfatos tricálcios	Ligação óssea, cirurgia reconstrutiva, Reparo ósseo
Carbono pirolítico	Válvulas cardíacas
Compósitos de fibra de carbono baseados em uma matriz polimérica ou resina	Materiais potenciais para orifícios, discos e implantes ortopédicos
Grafeno, Óxido de grafeno, nanotubos de carbono, etc.	Carregador de fármacos, formação de nanocompósitos, liberação de drogas, nanocargas em polímeros

Fonte: Helmus e Tweden (1995) apud Silva (2012). (24)

A exposição de uma superfície estranha ao sangue, independentemente do tipo do dispositivo ou duração do uso, pode ativar o processo de coagulação. Os coágulos sanguíneos, ou trombos, se ligam às paredes dos dispositivos e podem causar problemas locais ao obstruir um vaso ou complicações sistêmicas se o coágulo se desloca atingindo os pulmões, cérebro ou outros órgãos (14). Portanto, os materiais destinados à construção de dispositivos médicos devem ser biocompatíveis e ter as propriedades físico-químicas conforme as necessidades da sua utilização. Os DAVs, devido às complicações como tromboembolismo e sangramento (16, 24), são avaliados no ambiente clínico, animal e *in vitro*. Na Figura 2.2 são apresentados alguns exemplos de dispositivos médicos.

Figura 2.2 - Exemplos de dispositivos médicos. A) Cateter venoso central de duplo lúmen, B) DAV, C) Bomba centrífuga, D) Válvula cardíaca mecânica de duplo folheto e válvula biológica, E) *Stent* coronário, F) DAV, implantável, Thoratec.



Fonte: própria autora.

2.4 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade pode ser definida como “a capacidade de um biomaterial com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica” (4 p 25 , tradução nossa) (23) e pode ser entendida como a viabilidade de duas estruturas ou classes distintas de materiais, que podem ser misturadas parcial ou totalmente sem efeitos adversos (26).

A biocompatibilidade envolve respostas do complexo biomaterial-tecido e a interface do fenômeno que entra em ação quando se dá o contato e isto requer uma compreensão dos mecanismos fisiológicos que dão origem a interações indesejáveis entre o sangue e o material, como a coagulação do sangue e a inflamação (27). Há diferentes níveis de biocompatibilidade, principalmente implantáveis a curto e longo prazo. Além disso, são certificados como biocompatíveis dependendo de sua localização no corpo humano, duração da exposição e combinação com outros materiais.

Os testes de biocompatibilidade utilizados nos estudos das interações do organismo e o material descrevem e graduam respostas tanto do hospedeiro quanto do material, estabelecendo um critério de tolerância para o nível de risco do material (9). Esses testes seguem normas internacionais e devem ser avaliados de acordo com a composição do material, o tempo e o ângulo de contato. Para determinar a hemocompatibilidade do biomaterial, deve-se realizar a avaliação da trombogenicidade na superfície do dispositivo.

2.5 Hemocompatibilidade

A hemocompatibilidade define a compatibilidade do material com o sangue. Geralmente, o organismo reage a materiais estranhos a fim de eliminá-los ou isolá-los e para entender esses eventos é necessário avaliar a natureza química do material, suas características de superfície e os parâmetros do dispositivo, (10, 14). A norma ISO 10993-4 fornece um conjunto de testes estruturados para análise de compatibilidade do sangue com dispositivos artificiais, garantindo assim a segurança do paciente.

Quando um biomaterial é implantado no corpo, uma série de interações acontece com os fluidos biológicos. Na maioria dos casos, forma-se uma cápsula na

superfície do biomaterial. Esta cápsula, formada por uma camada de proteínas, pode alterar suas características e ainda atuar como uma barreira estrutural e biológica entre este e o tecido.

Porém, quando um biomaterial interage com o sangue, podem ocorrer eventos mais complexos. Em alguns casos, o biomaterial implantado também pode induzir alguns níveis de trombogenicidade que é definida como “*a capacidade do biomaterial de estimular e/ou promover a formação de um trombo em contato com o sangue*” (4 p 92 , tradução nossa) (23). Pode-se evitar a formação de um trombo por ativação mínima das plaquetas e da coagulação sanguínea, minimizando a ativação do sistema complemento e a hemólise (14).

No sistema biológico, há um equilíbrio físico-químico onde existem forças que propiciam a coagulação e forças contrárias que favorecem a anticoagulação, que permitem que o sangue permaneça na forma líquida na superfície interna do coração (endocárdio) e vasos sanguíneos (endotélio). Entretanto, quando o sangue entra em contato com outro tipo de superfície, seja biológica ou de outra natureza, o sistema de defesa natural do corpo é ativado e esse equilíbrio se altera fazendo com que o sangue tenha tendência em se coagular mesmo que essas aplicações sejam destinadas a beneficiar o paciente (27, 28, 29). Para prevenir ou minimizar essas respostas naturais para pacientes submetidos a procedimentos envolvendo interações sangue-material são utilizadas drogas anticoagulantes e/ou antiplaquetárias (29, 30).

As ativações dos sistemas de inflamação, da cascata de coagulação do sangue e complemento quando não controlados levam à formação de trombos que podem acarretar consequências graves. Os coágulos sanguíneos podem afetar o dispositivo, causar problemas locais ao ocluir o vaso no qual o dispositivo está implantado ou provocar complicações sistêmicas caso o coágulo se desloque para os pulmões, cérebro ou outros órgãos (14).

Existem dois mecanismos pelos quais a formação do trombo é iniciada a partir do contato entre sangue e materiais artificiais: a interação das plaquetas com a superfície do material, que é mediada por proteínas adsorvidas levando às ativações plaquetárias, e à ativação da cascata de coagulação intrínseca diretamente pelo contato com a superfície do material. O sistema inflamatório celular e a formação de

plaquetas estão entre as principais reações adversas do sangue que podem comprometer o desempenho de dispositivos médicos.

2.6 Processos de coagulação

O sangue é composto por várias substâncias dentre essas as proteínas, denominadas fatores de coagulação, que auxiliam no estancamento das hemorragias quando os vasos sanguíneos se rompem. Existem treze tipos diferentes de fatores de coagulação cujos nomes são expressos em algarismos romanos (Fator I ao XIII) e a ativação do primeiro leva à do seguinte até que ocorra a formação do coágulo.

A coagulação é uma cascata complexa de reações enzimáticas na qual os fatores ativam moléculas do fator seguinte formando uma quantidade de produtos como proteína insolúvel e fibrina (32). Ela se divide em duas vias: intrínseca e extrínseca e há uma via comum às duas chamada de protombinase (Figura 2.3).

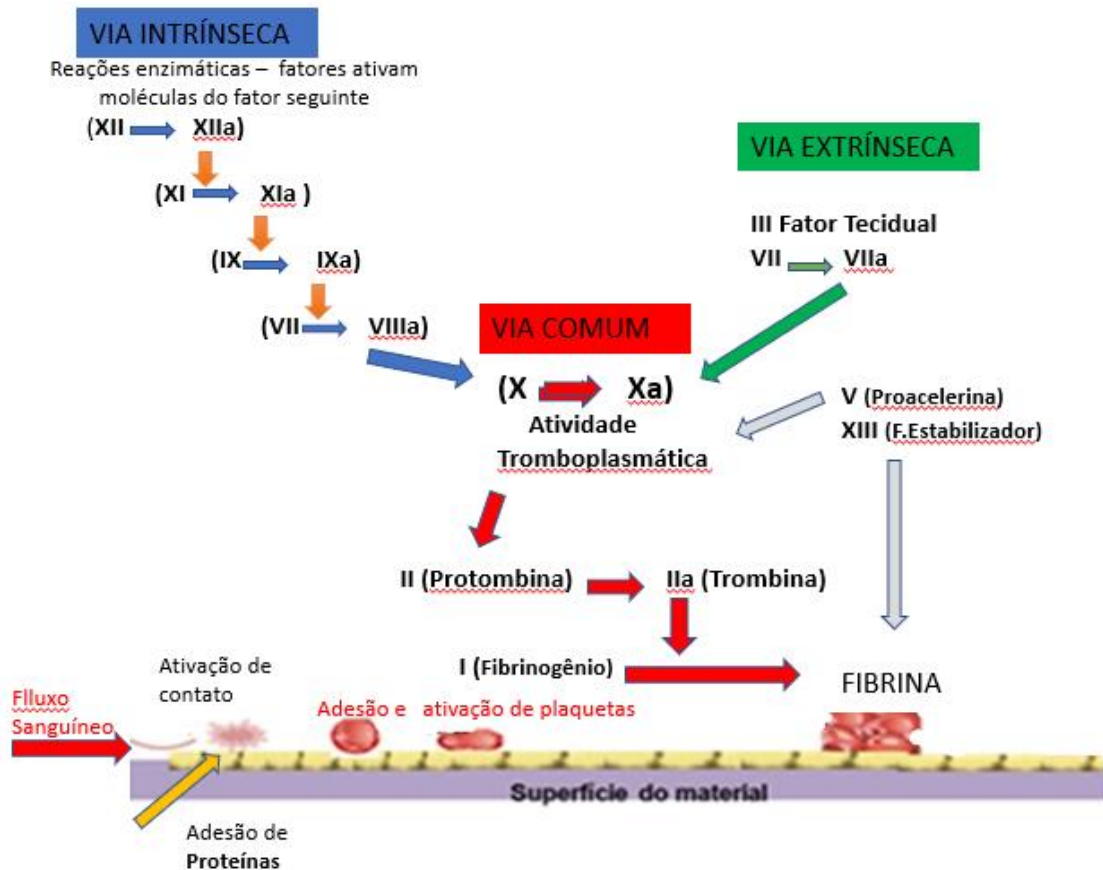
A primeira via é desencadeada pelo contato com plaquetas ativadas ou componentes do tecido endotelial. A adsorção de proteínas na superfície dos dispositivos médicos induz a adesão, ativação e agregação plaquetária. O fator XII (Fator de Hageman ou pré-caliceína) adsorvido à superfície sofre autoativação, e o fator XIIa resultante converte a pré-caliceína em caliceína. A serina protease ativa o fator XII que acionam o fator X. Os fosfolipídios plaquetários e o Ca^{2+} também acionam o fator X que, uma vez ativado, se combina ao fator V para formar a enzima ativa protombinase (assim como ocorre na via extrínseca), completando a via intrínseca (33).

A via extrínseca está associada a danos nos vasos sanguíneos. Nela, a proteína tecidual, chamada de fator tecidual (FT) e conhecida como tromboplastina, inicia a formação da protombinase a partir de células extrínsecas dos vasos sanguíneos. O fator tecidual liberado pelas superfícies das células danificadas interage com o fator VII. O complexo FT/fator VIIa desencadeia a coagulação sanguínea, convertendo o fator X em Xa. A ativação das plaquetas liga os fatores de coagulação e reúne os complexos para uma ativação da coagulação sanguínea (34).

Após a formação do fator Xa, ambas as vias, extrínseca e intrínseca levam à formação da rede de fibrina. Pelo complexo protombinase a protrombina é transformada em trombina, dando início à via comum. A trombina converte o

fibrinogênio (solúvel) em filamentos de fibrina (insolúveis) e também ativa o fator XIII (fator estabilizador da fibrina), que estabiliza os filamentos de fibrina no coágulo resistente (34). Além de induzir a deposição de fibrina na superfície, a trombina promove a ativação plaquetária. Os agregados plaquetários depositados na superfície são estabilizados pela fibrina para formar um trombo de fibrina e plaquetas. A caliceína, a trombina e outras enzimas de coagulação ativam o complemento, induzindo uma resposta inflamatória local. Os leucócitos também aderem à superfície onde são ativados e podem contribuir para a inflamação e trombose. O plasma contém certa quantidade de fator XIII, que também é liberado pelas plaquetas retidas no coágulo.

Figura 3.3 - Reações enzimáticas da cascata de coagulação sanguínea.



Fonte: própria autora.

A trombina depende do fator V, esta acelera a formação da protrombinase que, por sua vez, acelera a produção de mais trombina. O FXII (Fator Hageman) é ativado através do contato com superfícies levando à geração de trombina, formação de coágulos de fibrina e sinalização pró-inflamatória.

Muitas proteínas plasmáticas possuem domínios hidrofílicos em sua superfície e um núcleo hidrofóbico (35). A camada de adsorção final contém uma infinidade de proteínas, incluindo fibrinogênio e outros fatores de coagulação, imunoglobulinas e proteínas adesivas como a fibronectina. Portanto, os principais fatores que contribuem para a formação da trombose em dispositivos médicos são: fluxo sanguíneo, superfície dos materiais e as alterações dos fatores de coagulação.

A coagulação, a adesão e ativação plaquetária constituem, em conjunto, os principais eventos na trombose induzida por superfície. Após a adsorção de proteínas e a ativação de plaquetas, o fibrinogênio é convertido em fibrina e as plaquetas tornam-se ativadas e formam um trombo que deve ser minimizado. Tipicamente, o contato de biomateriais sintéticos com o sangue leva imediatamente à adsorção de proteínas plasmáticas na superfície do biomaterial (30,31). Este processo ocorre através de forças de interação física como as de Coulomb e de Van der Waals, levando à adsorção reversível ou irreversível de proteínas plasmáticas (36). A adsorção de proteínas na superfície se inicia com aquelas que são menores e mais abundantes, como a albumina do soro humano, depois podendo ser substituídas por proteínas de maior peso molecular com maior afinidade com a superfície. Leo Vroman avaliou a existência de uma sequência de adsorção de proteínas de menor para maior peso molecular, como a albumina deslocada por imunoglobulinas e fibrinogênio. Essa mudança na composição da camada proteica, conhecida como Efeito Vroman, é restrita a superfícies mais hidrofílicas (37). Em geral, a adsorção de proteínas plasmáticas depende do caráter das superfícies como propriedades de umectação e da densidade de carga (38).

A hemólise também influencia na formação da trombose por meio de um efeito na coagulação (39), mas no contexto de DAVs pode-se dizer que esta é consequência da tensão de cisalhamento e não um efeito do material (40). Complicações como a trombose associada ao dispositivo podem resultar em sua falha e aumento das taxas de morbidade e mortalidade do paciente. A trombose, ou a formação de coágulos sanguíneos, é um modo comum de falha para implantes cardiovasculares e circuitos extracorpóreos. Os efeitos clínicos adversos da trombose incluem oclusão trombótica em enxertos, obstrução de *stents*, complicações embólicas e pode exigir o uso de anticoagulantes por toda a vida (28).

Os métodos para prevenir a coagulação se baseiam em drogas antitrombóticas formuladas com agentes antiplaquetários ou anticoagulantes e também a modificação das superfícies dos dispositivos, sendo esta última abordada no presente trabalho.

2.7 Modificação de Superfície

Nos tratamentos de superfície, várias abordagens têm sido avaliadas para atenuar a coagulação, alterando a interface sangue-material para reduzir a adsorção de proteínas e a adesão e ativação de plaquetas nas mesmas. Esses tratamentos podem ser realizados utilizando métodos físico-químicos ou da biofuncionalização de superfície (41).

Historicamente, Vincent Gott (1963) utilizou as interações eletrostáticas dos grupos sulfato (carregados negativamente) da heparina com o grafite coloidal e o grupo benzalcônio (o cátion do cloreto de benzalcônio) em camadas alternadas (42). Posteriormente, métodos de derivatização química foram desenvolvidos para adaptar o método (heparina-grafite-benzalcônio) para plásticos e outros materiais a fim de diminuir a trombogenicidade deles.

Em projeto de dispositivos em contato com sangue, as questões pertinentes não são apenas porque as superfícies dos biomateriais atuais ativam esses sistemas inatos, mas como os mecanismos de ativação diferem na presença de superfícies sintéticas e o que pode ser feito para controlar ou prevenir esses efeitos (35).

A eficácia do emprego de determinado tipo de revestimento está diretamente relacionada às características da superfície modificada como espessura, topografia, concentração e distribuição de substâncias e estabilidade química do revestimento (43).

2.7.1 Métodos de tratamento de superfície

Os revestimentos utilizados na modificação de superfícies podem ser classificados em: passivos ou bioinertes, bioativos e biomiméticos.

As estratégias de modificação para tornar as superfícies dos biomateriais resistentes à adsorção de proteínas inespecíficas e adesão de células sanguíneas são baseadas em mudanças de algumas propriedades físicas, como a redução da energia interfacial que promove a adsorção de proteínas e cria barreiras repulsivas contra a

fixação de proteínas e células (15). Esses tipos de modificações estão relacionados ao tratamento químico de superfícies, enxertia de moléculas ou revestimentos.

2.7.1.1 Revestimentos Passivos ou Inertes

Este tipo de revestimento tem o objetivo de reduzir a trombogenicidade do material através da modificação química da superfície (por exemplo, alterando seu caráter hidrofílico ou sua topografia). Os revestimentos podem ser orgânicos ou inorgânicos (39) e atuam como uma barreira entre o material e o sangue e, deste modo, reduzem ou eliminam a adsorção de proteínas e adesão celular.

Superfícies texturizadas também melhoram a hemocompatibilidade de biomateriais em contato com o sangue quando promovem a formação de camada pseudo-neointimal de proteínas adsorvidas e desnaturadas e outros componentes sanguíneos aprisionados, ou seja, originam um revestimento biológico estável (44).

2.7.1.2 Revestimentos ativos

As espécies bioativas podem ser ligadas por quaisquer interações do tipo covalente ou não. Um exemplo de revestimento bioativo incorpora a heparina que pode ser diretamente ligada à superfície pela inserção de grupos funcionais.

Os métodos biofuncionais de superfície incluem a aplicação de revestimentos que podem ser adicionados passivamente ou ser covalentemente ligados à superfície, diretamente ou por meio de espaçadores (41). A biofuncionalização visa dotar a superfície da capacidade de interferir na ativação enzimática ou nos receptores da superfície celular (45). Os métodos de imobilização de biomoléculas, como a heparina, são utilizados para alterar a adesão celular e reduzir a atividade trombogênica.

Em muitos casos a modificação com espécie bioativa é combinada a substâncias bioinertes, por exemplo, a heparina e o polietileno glicol. Outros exemplos de revestimentos ativos é a texturização de superfície combinada ao revestimento com células endoteliais possibilitando a fabricação de materiais diferentes do polímero original e a formação de materiais híbridos funcionais. Também podem ser obtidos por enxertia, isto é, inserção de cadeias poliméricas para se conseguir propriedades adequadas da superfície de um polímero-base.

2.7.1.3 Revestimentos Biomiméticos

A estratégia biomimética foi estabelecida para acelerar a endotelialização (36). Para a aplicação destes revestimentos são necessários o conhecimento sobre o microambiente da célula endotelial e os materiais bioinspirados a serem utilizados (46). Assim, há muitas dificuldades para preparar uma superfície ideal com propriedades anticoagulantes que promovam a endotelialização e a inibição da proliferação de células musculares lisas. Essa estratégia revela algumas vantagens como a criação de superfícies repelentes de proteínas com boas propriedades de crescimento de células endoteliais, mas desvantagens como o alto custo e possíveis efeitos como ativação do sistema complemento (47).

2.7.2 Processos de tratamento

O tratamento de superfície consiste em um processo de revestimento, com o objetivo de criar uma camada de proteção que proporciona maior resistência, durabilidade, ou como o propósito deste trabalho, uma maior compatibilidade com o sangue. Os processos de tratamento geralmente utilizados podem ser: químico, por uso de plasma ou radiação (gama ou UV), entre outros.

2.7.2.1 Tratamento químico com heparina

A maior parte dos polímeros de uso médico não permite a ligação direta da heparina na superfície polimérica e, quando ligada, esta perde o seu poder anticoagulante. Assim, faz-se a ligação da heparina utilizando-se um componente intermediário ligado ao polímero. Podem-se utilizar espaçadores para aumentar a mobilidade e a atividade da heparina (48).

O processo Duraflo II (Baxter®) é um procedimento comercial para ligar a heparina através de interações iônicas (48) dos grupos com cargas negativas existentes nas heparinas. Porém, complexos iônicos de heparina não são estáveis e “desligam-se” da superfície com certa facilidade por isso este método é aplicado em dispositivos de curta duração (horas).

Outros métodos foram desenvolvidos envolvendo ligações covalentes através das terminações carboxila, hidroxila ou amina da molécula de heparina, utilizando-se da conjugação covalente na imobilização do grupo final, ou seja, materiais com ligações covalentes formadas através dos grupos (-COOH, -OH, -NH₂ da heparina).

Há tratamentos que incluem um espaçador ligado quimicamente à superfície do polímero e a heparina com seu grupo ativado criando sítios ativos para posterior imobilização desta. O acoplamento pela extremidade da heparina (cabeça/cauda) por ligação covalente, que mantém livre a sequência ativa da heparina, é o responsável pelo efeito antitrombogênico.

A presença de ligações químicas entre a superfície e o conjunto espaçador-heparina resulta em uma superfície polimérica mais trombo-resistente. O processo é mais eficiente, mas envolve mais etapas de tratamento da superfície e o emprego de reagentes de custo elevado.

A enxertia, ou “grafitização”, permite a fabricação de diferentes materiais com propriedades modificadas em relação ao polímero original. A enxertia permite a formação de materiais híbridos funcionais obtidos por meio da inclusão de cadeias poliméricas (41). Esse processo tem a vantagem de ser mais simples e envolver reagentes de custo mais baixo.

No mecanismo de ação do processo Carmeda (15), a heparina se liga à superfície por meio de um espaçador (ligação do tipo cabeça/cauda) e permite que a antitrombina se ligue à uma estrutura na molécula de heparina. A ligação envolve uma mudança conformacional que acelera a inativação da trombina e outros fatores de coagulação. Posteriormente, o complexo formado entre a antitrombina e a trombina é liberado, reexpondo a molécula de heparina e sustentando a atividade anticoagulante.

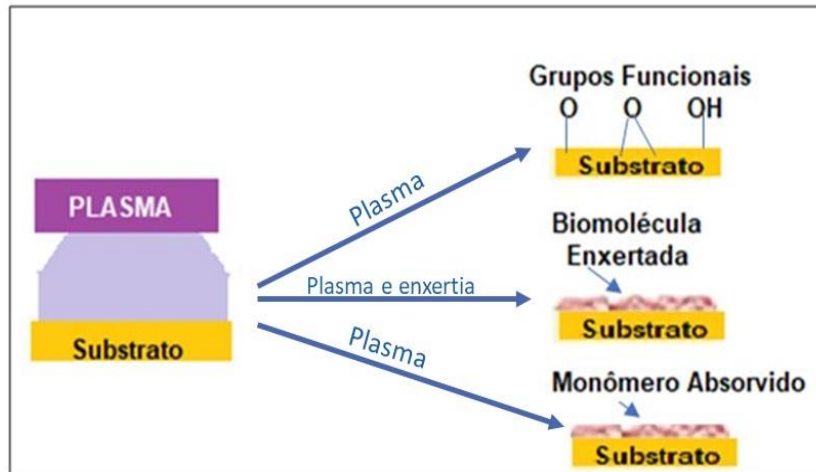
2.7.2.2 Tratamento por plasma

Neste tratamento, utiliza-se o gás ionizado (plasma) que é composto por cargas positivas originadas das moléculas cujos elétrons foram removidos de seus átomos. Os tipos de plasma podem ser divididos em térmicos ou não-térmicos, sendo os plasmas térmicos caracterizados por serem produzidos com altos níveis de ionização. Eles aquecem todo o fluxo de gás durante a operação. Os plasmas não-térmicos ou “frios” são gerados em temperatura próxima à ambiente. Nestes plasmas, os elétrons adquirem energias mais altas do que íons e moléculas. Uma grande variedade de espécies e íons excitados em fase gasosa está sendo usada para o crescimento e modificação de interfaces de polímeros (49).

O plasma também pode alterar a química da superfície, a adsorção de proteínas e a fixação celular nas superfícies. Para fins de engenharia de tecidos onde

são necessários adesão e proliferação celular, a modificação por plasma de oxigênio pode ser considerada uma técnica eficaz usada na modificação da superfície (50). A Figura 2.4 apresenta um exemplo esquemático de um reator a plasma e alguns exemplos de tratamento.

Figura 4.4 - Representação esquemática das diferentes estratégias de modificação do plasma.



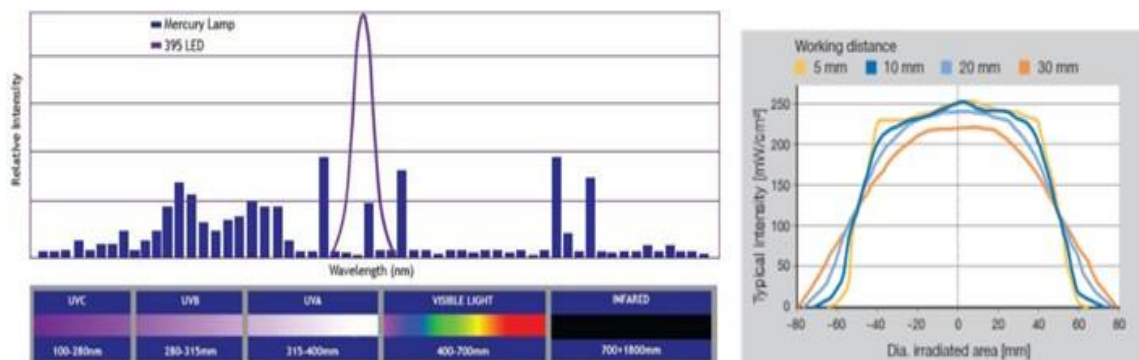
Fonte: própria autora.

2.7.2.3 Tratamento por radiação Ultravioleta (UV)

Dentre os vários métodos de modificação de superfície baseados em biomateriais, a modificação fotoquímica é simples, eficiente e de baixo custo.

Este tratamento utiliza a luz como gatilho para iniciar as reações. A radiação ultravioleta é uma radiação eletromagnética cujo comprimento de onda varia entre 100 e 400 nm, e se classifica em três grupos: UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm) (51), como mostra a Figura 2.5.

Figura 5.5 - (A) Gráfico de intensidade relativa em função do comprimento de onda de lâmpadas de mercúrio e LED, (B) Intensidade luminosa em função da posição.



Fonte: Catálogo DELOLUX®.

O tratamento de materiais poliméricos com radiação UV permite criar sítios ativos e hidropéroxidos na superfície que são pontos de iniciação da enxertia. A fonte luminosa de UV pode ser originada de lâmpadas de mercúrio ou LEDs (Diodos Emissores de Luz) (49).

A polimerização por esse método pode introduzir multifunções e melhorar muitas propriedades dos materiais biomédicos como hidrofiliabilidade (52),(53) citocompatibilidade (54) e hemocompatibilidade (41), (55) por meio de enxertos de diversos grupos funcionais para a superfície do material.

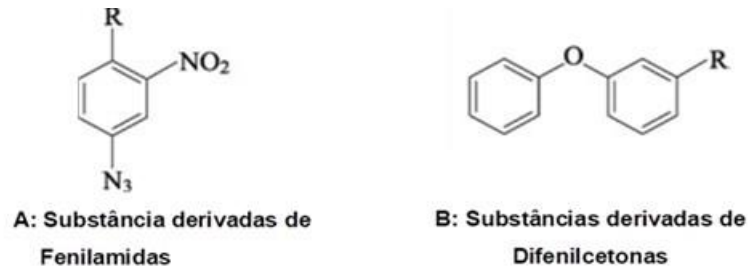
A polimerização de fotoenxertia por meio de radicais livres funcionais de monômeros insaturados pode acoplar moléculas ou grupos funcionais às superfícies de materiais através de fotoreação, sob irradiação UV, para melhorar as propriedades superficiais (56).

Na fotopolimerização, a energia radiante é convertida em energia química com a adição dos chamados fotoiniciadores ou fotolincadores, promovendo a formação de espécies reativas que levam às reações de fotopolimerização. Ao absorver a luz, o fotoiniciador induz reações químicas que alteram a solubilidade e as propriedades físicas da superfície do material (49).

Esse processo pode ocorrer inicialmente através da síntese de fotoiniciadores com grupos funcionais a partir da reação entre moléculas bioativas e grupos termoativos e, em seguida, ligá-los covalentemente à superfície do material por meio de reação fotoquímica. Alternativamente, pode-se fixar os fotoiniciadores à superfície através da radiação UV e, portanto, as moléculas-alvo ficam covalentemente ligadas à superfície por meio da reação com os grupos termoativos dos iniciadores (55).

Os fotoiniciadores mais utilizados são substâncias derivadas de fenilamidas e de difenilcetona, cujas estruturas químicas são ilustradas na Figura 2.6. As primeiras são fotolisadas irreversivelmente através da irradiação UV e produzem nitrogênio e nitrene (intermediário) altamente ativo. Essas reações imobilizam covalentemente moléculas bioativas presentes nos materiais poliméricos. A fotólise pode ocorrer em luz visível se o anel aromático tiver grupos nitro. Em geral, os grupos fenilamidas são incorporados em cadeias de copolímeros gerando polímeros fotorreativos para a modificação de superfície.

Figura 6.6 - Estrutura dos fotoiniciadores, fenilamidas e difenilcetonas, onde R: são os grupos termoativos tais como carboxil, grupos aldeídos, ou cadeias poliméricas etc.

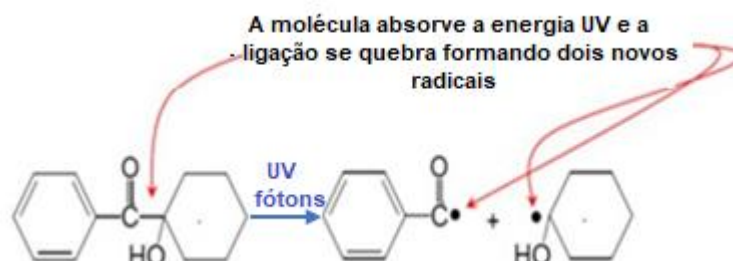


Fonte: catálogo Sigma Aldrich.

Em substâncias derivadas de difenilcetona, através da absorção de luz pelo fotoiniciador, inicia a decomposição em radicais livres. A Figura 2.7 ilustra a decomposição com UV a partir da difenilcetona. As substâncias derivadas da difenilcetona com dois anéis de benzeno em uma molécula têm alta hidrofobicidade e impedimento estérico.

Além dos fotoiniciadores, os monômeros podem ser utilizados na polimerização de fotoenxertia com a finalidade de melhorar sua aderência em substratos. A funcionalidade dos monômeros permite variar a velocidade de polimerização e propriedades físico-químicas (flexibilidade, dureza, resistência química, entre outras) (43), (57). Alguns exemplos de monômeros utilizados em fotopolimerizações de biomateriais são: 2- hidroxietil metacrilato (HEMA), N- vinilpirrolidona (NVP), 2 – metacrilóil oxietil fosforilcolina (MPC), polietileno glicol e seus derivados, etc.

Figura 7.7 - Exemplo de decomposição em radicais livres através da absorção de luz.



Fonte: Adaptado da referência (43).

OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho é desenvolver um processo para melhorar a hemocompatibilidade de poliuretanos visando sua aplicação ao DAV INCOR e outros dispositivos cardiovasculares.

3.1 Objetivos Específicos:

- a. Imobilização do complexo de heparinato de benzalcônio por via fotoquímica.
- b. Inserção de nanocargas de óxido de grafeno no copolímero.
- c. Redução do óxido de grafeno utilizando a heparina como agente redutor e sua inserção como nanocarga em PUs.
- d. Avaliação qualitativa dos processos de tratamento por caracterização físico-química e ensaios biológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os principais materiais utilizados, métodos de tratamentos, e caracterizações físico-químicas e biológicas.

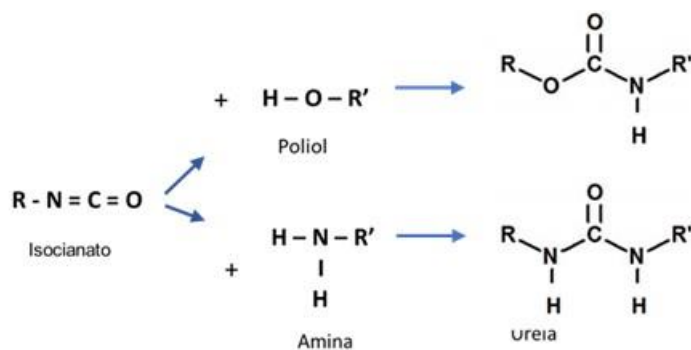
4.1 Materiais

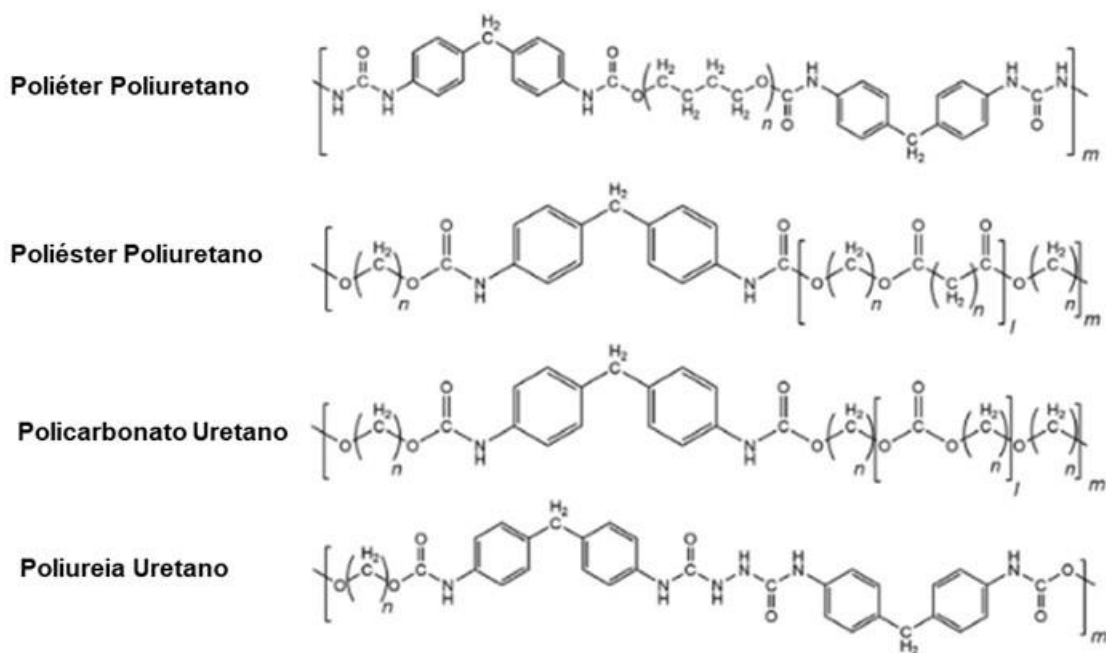
4.1.1 Poliuretanos (PUs)

Os poliuretanos (PUs) são polímeros com diversidade de composições químicas e características como boa flexibilidade mecânica, compatibilidade moderada com o sangue e estão entre os polímeros sintéticos mais usados em aplicações biomédicas. Em composições elastoméricas específicas de PU é possível se obter uma combinação de dureza, durabilidade, biocompatibilidade e bioestabilidade adequadas para os dispositivos médicos (58), (59).

Os termoplásticos de poliuretano (TPU), ou elastômeros de alto módulo, são sistemas que em geral tem dois componentes: um componente A cristalino (di- ou poli-isocianato), um componente B amorfo de cadeia longa (poliol (s) e/ ou poliamina) e um extensor de cadeia (geralmente, poliol ou poliamina de cadeia curta). Algumas reações típicas de obtenção de TPUs estão ilustradas na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Obtenção de TPU (R' pode ser aromático ou alifático) e estruturas químicas de poliuretanos comuns, utilizados em dispositivos cardiovasculares.





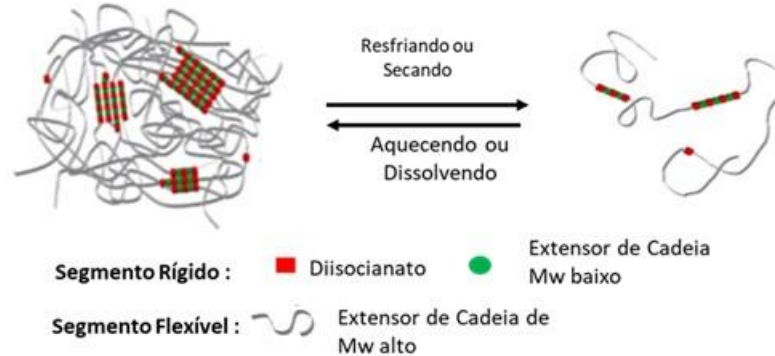
Fonte: Fórmulas Estruturais do catálogo de Sigma Aldrich.

Os poliuretanos segmentados contêm cadeias flexíveis e rígidas alternadamente na espinha dorsal do polímero. O precursor dos segmentos flexíveis macios são macromoléculas poliméricas com grupos terminais hidroxila, enquanto segmentos rígidos são obtidos devido à reação de diisocianato com diol ou diamina de baixo peso molecular. Devido à incompatibilidade química entre estes dois segmentos, os poliuretanos segmentados são separados por fases em nanoescala, o que leva à criação de domínios duros e macios. Os domínios duros são ricos em segmentos rígidos, responsáveis pela resistência mecânica e dureza, e os macios são ricos em cadeias que favorecem a elasticidade (60) e podem se comportar como uma borracha em condições ambientais. Além disso, os domínios duros atuam como uma ligação cruzada física pelas chamadas ligações cruzadas reversíveis por meio de interações de ligação de hidrogênio. Portanto, esses materiais são excelentes elastômeros termoplásticos que permitem ser processados por extrusão e moldagem por injeção.

A Figura 4.2 ilustra a morfologia do TPU e a agregação entre as fases. Os TPU formam uma fase homogênea e viscosa para processos termoplásticos quando aquecidos acima da temperatura de fusão dos segmentos rígidos. O mesmo ocorre

quando o polímero é dissolvido e, apesar das fases serem amorfas, os domínios duros microcristalinos ficam dispersos em fase amorfa flexível. A separação de fases entre domínios duros e macios resulta do resfriamento.

Figura 4.2 - Desenho esquemático da morfologia do TPU.



Fonte: Adaptada de Wendels S.e. Avérous L (2021, 1086). (61).

A natureza química e do tamanho dos segmentos flexíveis influenciam na mobilidade das cadeias macromoleculares. Os segmentos flexíveis devem ser amorfos e com baixa temperatura de transição vítrea (T_g) para ter boas propriedades elastoméricas, por exemplo na resistência ao impacto. Estes também são responsáveis pela capacidade de deformação do material antes da ruptura. Os segmentos rígidos atendem pelas características mecânicas do PU, atribuindo grande resistência às tensões aplicadas durante sua utilização.

Os PUs à base de poliéster sofrem rápida hidrólise quando implantados no corpo humano. Aqueles que são à base de policaprolactona são utilizados como adesivos médicos e arcabouços para cultura de células por serem biodegradáveis. Os que são à base de poliéter são estáveis no ambiente fisiológico, entretanto, quando utilizados por anos, perdem a bioestabilidade.

Para melhorar suas propriedades mecânicas, compatibilidade sanguínea e adesão a células endoteliais, além da redução da adesão de proteínas, vários estudos têm sido realizados para minimizar os problemas de biodegradação de PUs (61) utilizados em dispositivos em contato com o sangue, considerando sua composição e funcionalização de superfície (62), (63).

Na área cardiovascular, os PUs encontraram muitas aplicações devido à sua capacidade de tolerar forças contráteis que se originam durante o ciclo cardíaco sem sofrer deformação plástica ou falha (58).

As propriedades do poliuretano como alto alongamento com baixo estresse, boa flexibilidade, recuperação rápida e elevadas resistências à fadiga e à hidrólise, são consideradas adequadas para a produção da bomba de sangue de um coração artificial. Neste trabalho, foi utilizado o copolímero de poliéter poliuretano segmentado (BioSpan®) fornecido pela Royal DSM Co. (N.V., Holanda) em forma de solução, contendo 20% de PU e \pm 2% de sólidos. Este PU possui boa resistência ao alongamento e à fadiga por flexão, além de boa bioestabilidade e é amplamente empregado na confecção de diafragmas de dispositivos ventriculares.

4.1.2 Heparina

A heparina pertence à família dos glicosaminoglicanos que contém ligações a-glicosídicas. É um polissacarídeo sulfatado com grande quantidade de cargas elétricas negativas. Foi descoberta em 1916 e tem sido usada clinicamente como anticoagulante desde 1935 (57).

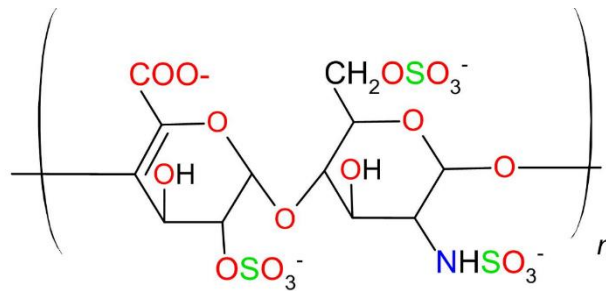
Este polímero linear de cadeia longa e não flexível é constituído por bases dissacarídicas como o ácido urânico e a hexosamina. As propriedades e o grau de pureza, variam com o tecido do qual é extraída, como a mucosa intestinal de suínos ou pulmões de bovinos. A mediana das massas molares varia de 3.000 a 40.000 Da. Na sua estrutura, pode ser observada uma pentosana com um anel de açúcar de cinco átomos de carbono em sua cadeia principal e grupos funcionais como carboxila, ácido sulfônico e hidroxila, como mostra a Figura 4.3.

Devido à presença desses grupos, a heparina possui caráter fortemente ácido e pode ser misturada, copolimerizada e formar compostos com vários polímeros sintéticos e naturais, além de atuar em diferentes vias da cascata de coagulação com efeitos anticoagulantes, antitrombóticos, antiagregantes e anti-inflamatórios (64).

A heparina ao inibir a antitromboplastina através da antitrombina, age como anticoagulante e atua indiretamente sobre vários fatores ativados da coagulação, como a trombina (Fator IIa). A inibição do Fator Xa ativado interfere na produção de trombina impossibilitando várias ações na coagulação, impede a transformação da protrombina em trombina evitando a conversão de fibrinogênio em fibrina reduzindo a

extensão do trombo e também pode induzir a dissolução de coágulos formados impedindo que se formem ou se expandam, e exercer algumas ações sobre as plaquetas. (65)

Figura 4.3 - Estrutura da heparina.



Fonte: própria autora.

Muitos processos foram desenvolvidos com biomateriais à base de heparina para aplicações biomédicas para aumentar a biocompatibilidade e diminuir a adesão plaquetária (66). Quando a heparina se liga à superfície dos biomateriais, o sangue em contato com esta é impedido de coagular e a coagulação é minimizada nas proximidades do material. A heparina liga-se à antitrombina III, acelerando o efeito de neutralização da enzima desse inibidor de serina protease e evitando a formação de trombina (67).

A atividade da heparina é expressa em Unidade Internacional (UI), indicando o grau de fluidez de um determinado volume de plasma após a sua recalcificação. O termo “Unidade Internacional” vem do sistema de medidas definido pela OMS e, geralmente, é empregado na área farmacêutica para quantificação de algumas vitaminas e medicamentos como a insulina, solução de heparina sódica etc. Por exemplo, cada mL de protamina inativa 1.000 UI de heparina sódica. Outra definição comum é: 1 UI de heparina é equivalente à aproximadamente 0,002 mg de heparina pura.

A modificação de biomateriais com heparina tem sido usada para um amplo espectro de aplicações, incluindo a redução da trombogenicidade do material, entrega de drogas, diferenciação celular e promoção da automontagem do material. Sua incorporação em materiais pode ser realizada por conjugação covalente ou interações não-covalentes com polímeros catiônicos, incluindo peptídeos e proteínas. Os métodos de imobilização e conjugação provaram ser úteis em muitos materiais

para aplicações na área médica (68). A imobilização covalente da heparina na superfície do biomaterial envolve a ativação dos grupos funcionais do material e/ou heparina (-COOH, -OH, -NH₂) para realizar a reação.

Neste trabalho, utilizou-se a heparina sódica (proveniente da mucosa intestinal) cedida pela Adeste Ind. de Prod. Animais Ltda. Todas as análises foram realizadas seguindo a Farmacopeia Brasileira 6.0 pelo fornecedor. Esta heparina foi utilizada como agente redutor e estabilizador no processo de redução do óxido de grafeno.

4.1.3 Óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO)

O grafeno e seus derivados têm sido amplamente estudados como nanoestruturas com potenciais aplicações em medicina regenerativa, odontologia e ciências dos materiais (69). O grafeno é composto por uma monocamada de átomos de carbono dispostos em uma rede hexagonal bidimensional e possui excelentes propriedades elétricas, térmicas e mecânicas comparadas a outros materiais existentes (70). Sua estrutura molecular pode ser modificada quimicamente possibilitando sua adesão a diferentes moléculas e, portanto, ser utilizado no desenvolvimento de dispositivos de alto desempenho (71). Devido à sua biocompatibilidade, este pode ser utilizado como carregador de genes, proteínas e fármacos e como material de revestimento para implantes, induzindo a proliferação e a diferenciação de células-tronco (72).

Derivados de grafeno como o GO e o rGO são a primeira escolha na família do grafeno devido à maior facilidade de obtenção e à maior solubilidade destes em solventes polares (por exemplo, água). Por outro lado, o GO tem uma condutividade elétrica menor que o grafeno e uma reatividade muito alta, em virtude da abundância de grupos funcionais oxigenados.

Os materiais à base de grafeno podem ser classificados de acordo com o número e arranjo espacial das folhas, o conteúdo de oxigênio e da modificação química. Diversas folhas de grafeno empilhadas umas sobre as outras formam a estrutura tridimensional do grafite; uma única ou algumas folhas de grafeno enroladas formam um nanotubo de carbono; e uma folha unida pelas extremidades em um formato esférico forma um fulereno. Devido à dificuldade de se obter grafeno de uma única camada, o GO ou rGO são usados com mais frequência em aplicações biomédicas. Folhas de GO apresentam vários tipos de grupos quimicamente ativos

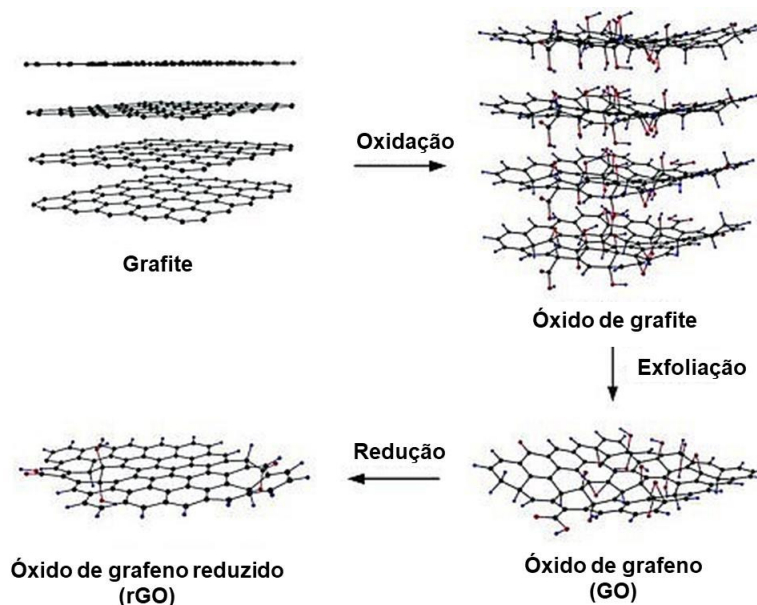
(carboxilas, epóxidos e hidroxilas) que, juntamente com a capacidade de fazer ligações π - π e de hidrogênio, são responsáveis por interações com outras espécies químicas. As propriedades físicas e químicas do grafeno, GO e rGO podem ser imaginadas em uma escala com o grafeno em uma extremidade (a melhor condutividade elétrica, hidrofóbica e menos reativa quimicamente), o GO na outra extremidade (reativo, hidrofílico e pior. Condutividade elétrica) e o rGO entre os dois. São materiais que possuem alta resistência mecânica e ao rasgo, leveza, flexibilidade, excelente condutividade térmica e alguns possuem alta condutividade elétrica (como o grafeno monocamada e o rGO) (73).

O óxido de grafite, preparado a partir da reação do grafite com fortes agentes oxidantes (método de Hummers), é um composto com estrutura em camadas. Cada camada consiste em regiões aromáticas não oxidadas distribuídas aleatoriamente e regiões alifáticas de seis membros com grupos polares ligados. Esses grupos polares, como hidroxila, epóxi, éter e carboxilas, são resultantes da oxidação.

A Figura 4.4 apresenta esquematicamente a obtenção do óxido de grafeno através da oxidação química do grafite e sua posterior esfoliação em meio líquido, mais comumente em água, produzindo o GO, através da separação das folhas bidimensionais contendo os grupamentos oxigenados. Posteriormente, o GO é quimicamente reduzido, por meio de agentes redutores.

O óxido de grafite possui propriedades físico-químicas atrativas como grande área de superfície, alta resistência em estrutura 2D, boas propriedades ópticas e eletrônicas, entre outras (74). Dentre suas principais propriedades, a facilidade de funcionalização e alta atividade antibacteriana se destacam como um material promissor para aplicações biológicas. Além disso, devido às transições π - π^* , uma baixa energia é necessária para o movimento dos elétrons em sua estrutura, o que torna este material propício para aplicações como biossensores e bioimagem.

Figura 4.4 - Apresentação esquemática da obtenção do óxido de grafite a partir da sua oxidação pelo método de Hummers modificado, seguido da esfoliação para formação de folhas de GO, e redução para formação de rGO.



Fonte: Bai H, Li C, Shi G. (2011, p1090). (75) (tradução livre)

Após as etapas de oxidação e esfoliação, o GO torna-se majoritariamente hidrofílico e, portanto, com excelente processabilidade aquosa e capacidade de funcionalização na superfície. Os nanocompósitos poliméricos à base de GO têm sido pesquisados para aplicações biotecnológicas em fototerapia, bioimagem, entrega de drogas e genes, biossensores e ação antibacteriana, entre outras. Estes nanocompósitos podem ser usados na engenharia de tecidos por serem biocompatíveis e apresentarem propriedades mecânicas apropriadas para desenvolvimento de arcabouços para células.

Quimicamente, o óxido de grafeno reduzido (rGO) tem limitada solubilidade aquosa e sofre de aglomeração irreversível durante sua preparação em água e em alguns solventes orgânicos devido à forte tendência de empilhamento π - π entre as folhas do rGO. Polímeros ou surfactantes, como o poli (N-vinil-2-pirrolidona) e poli (sódio-4-estireno sulfonato), podem ser introduzidos para melhorar a dispersibilidade das folhas de rGO e evitar a re-agregação.

Em geral, utiliza-se a hidrazina na redução do GO, entretanto, ela é tóxica para que possa ser aplicado na área médica. Algumas pesquisas empregaram vitamina C ou açúcares como agentes redutores e aminoácido como estabilizador (76)(77).

Os óxidos de grafeno exibem toxicidade dose-dependente para células e animais, como indução de apoptose celular e formação de granuloma pulmonar. Numerosos estudos avaliaram a biocompatibilidade e toxicidade do GO *in vivo* e *in vitro*. Em geral, a gravidade dos efeitos tóxicos desse nanomaterial varia de acordo com a via de administração e sua dose, de suas propriedades físico-químicas e o método de síntese do GO (78), com algumas evidências apontando para uma toxicidade mais alta para o grafeno puro do que para o GO (17).

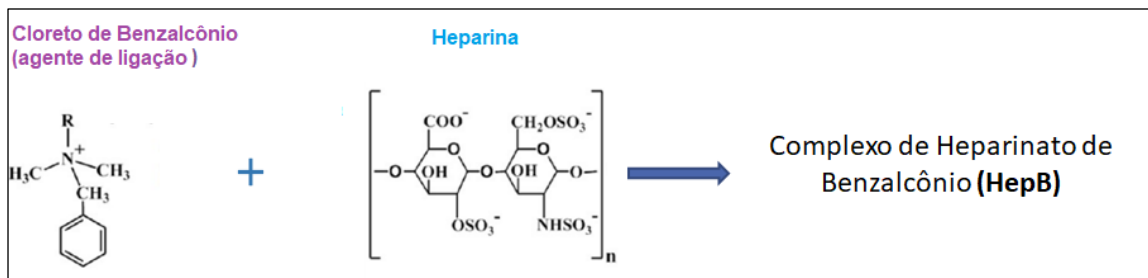
O óxido de grafeno utilizado neste trabalho foi produzido e fornecido pelo Centro de Pesquisas em Grafeno Nanomateriais e Nanotecnologias (MackGraphe) da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

4.1.4 Complexo de Heparinato de Benzalcônio (HepB)

O cloreto de benzalcônio, é um sal de amônio quaternário, e a sua adição torna a heparina solúvel em solventes orgânicos. O complexo de heparinato de benzalcônio (HepB) é composto por heparina sódica e cloreto de benzalcônio e se dissolve facilmente em água, acetona ou álcool. Ele também é utilizado como antisséptico, espermicida, bactericida, descongestionante nasal e sabonetes para higienização em centros cirúrgicos (79). Além disso, o complexo HepB. pode ser usado como um tensoativo catiônico em reações de polimerização química.

Na obtenção do HepB os radicais de amina positivos e os compostos de amônio quaternário são eletrostaticamente ligados aos radicais de sulfato negativos da heparina (sais de heparina) como mostra a Figura 4.5. cloreto de benzalcônio empregado neste trabalho foi adquirido da *Celsus Laboratories, Inc, USA*.

Figura 4.5 - Reação de formação do complexo de heparinato de benzalcônio.



Fonte: própria autora.

4.1.5 N,N - Dimetilacetamida (DMAc)

A dimetilacetamida é um, é um solvente comumente usado como solvente polar sem próton. A dimetil acetamida é um líquido transparente incolor, que pode ser misturado com água, álcool, éter e outros solventes orgânicos e é um solvente polar. Possui boa estabilidade térmica, é e estável em solução aquosa. O ponto de ebulição da dimetilacetamida é maior que o da dimetilformamida (DMF) em mais de 10 °C (o ponto de ebulição da dimetilformamida é de 153 °C), por isso tem melhor estabilidade térmica e química do que dimetilformamida. A Figura 4.6 apresenta a sua formula.

Figura 4.6 - Fórmula estrutural e massa molar do N, N- Dimetilacetamida.



Fonte: Fórmulas do catálogo de Sigma Aldrich.

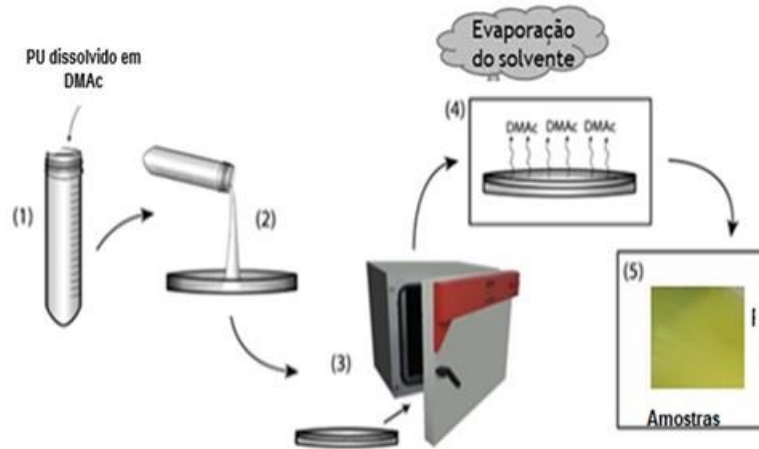
Os reagentes cloreto de benzalcônio e o solvente N, N- Dimetilacetamida empregados neste trabalho foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção de Membranas de PU (BioSpan®)

As membranas foram confeccionadas através da mistura de soluções e posterior evaporação do solvente. O copolímero de poliuretano (PU) na forma gel foi dissolvido em DMAc na proporção de 1:1 em massa. A mistura foi depositada sobre uma fôrma retangular de aço inoxidável, a fim de obter uma membrana polimérica plana e de superfície regular. A solução foi mantida em fluxo laminar com exaustão por 4 horas a 55°C. Posteriormente, as membranas foram colocadas em estufa a uma temperatura 60°C por 24 horas, para garantir a eliminação completa do solvente e lavadas diversas vezes em água pura (Milli-Q) antes dos tratamentos. A Figura 4.7 ilustra esquematicamente a preparação destas membranas.

Figura 4.7 - Esquema para a obtenção de membranas de PU

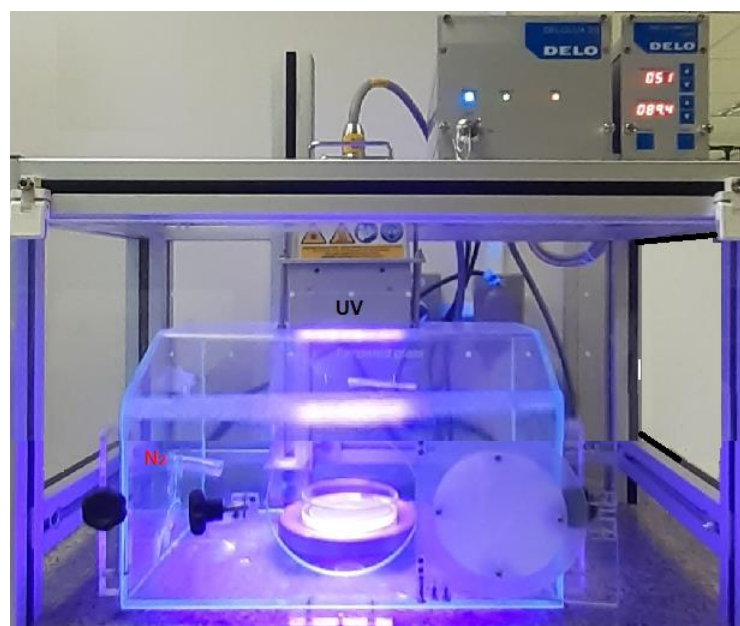


Fonte: própria autora.

4.2.2 Construção de Câmara UV com ambiente inerte

Para a fotopolimerização em ambiente inerte, foi construída uma câmara em policarbonato. Na parte superior, foi posicionado um sistema de LEDs ligado a um controlador de tempo do pulso (0,1 a 999,99 segundos) e amplitude (1 a 100%). A câmara possui uma válvula para o vácuo e outra para a entrada do gás nitrogênio, como pode ser observada na Figura 4.8.

Figura 4.8 - Câmara construída para fotopolimerização.



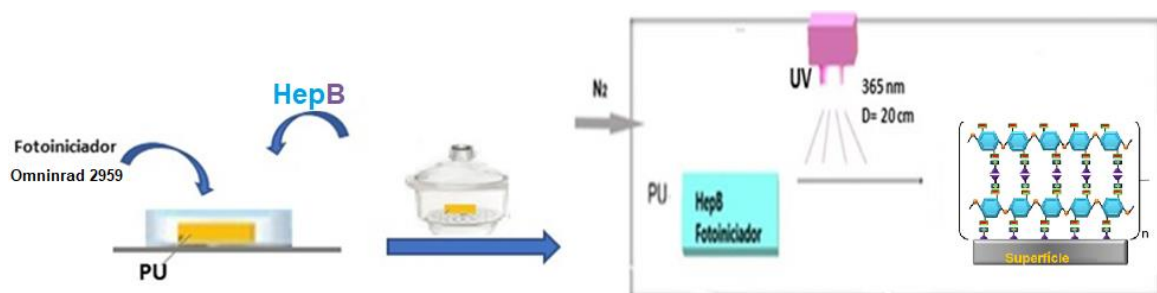
Fonte: própria autora.

4.2.3 Tratamento com o complexo de Heparinato de Benzalcônio, por fotoreação, sob irradiação UV, para a obtenção de poliuretano/heparinato de benzalcônio (PUHepB)

As membranas de PU foram colocadas em uma mistura contendo 15 mL de HepB (1,5% w/v) em isopropanol com 936 IU/mL (Celsus Laboratories Inc.) e 0,1% d 1- [4- (2- hidroxietoxil) - fenil]- 2- hidroxil- 2- metil] propanona (Omnirad 2959 – Quiminutri IGM® Resins) por 30 min. Posteriormente, as amostras foram secas e colocadas em um dessecador a vácuo no escuro.

As membranas de PU com HepB foram colocadas na câmara com gás N₂ e submetidas a UV durante 10 min de cada lado, a 20 cm de distância da fonte de luz com intensidade de 200 mW/cm² e faixa espectral visível entre 360 e 400 nm, conforme apresentado na Figura 4.9. Logo após, as membranas foram cortadas e lavadas repetidas vezes com água ultrapura para retirar qualquer substância não incorporada à superfície. Após a secagem, os corpos de prova foram mergulhados por cerca de 5 s em soro fisiológico e deixados ao ar novamente por cerca de 60 min para evaporação da água. O procedimento de lavagem é importante para retirar o excesso de heparina que não se ligou à superfície do poliuretano.

Figura 4.9 - Esquema para a obtenção de superfície tratada com o complexo de cloreto de benzalcônio por UV.



Fonte: própria autora.

4.2.4 Tratamento com a inserção de nanocargas de GO e rGO

4.2.4.1 Preparação dos nanocompósitos poliméricos de PUGO

Os nanocompósitos poliméricos são materiais bifásicos que consistem em uma matriz polimérica contendo partículas em escala nanométrica dispersas como reforço. Neste trabalho, foram produzidos nanocompósitos de poliuretano com o GO (PUGO) e rGO (PUrGO). A mistura de soluções foi o método utilizado para as preparações. O método consistiu em três etapas: dispersão da carga em um solvente adequado sob ultrassonificação incorporação do polímero e remoção do solvente por evaporação (80). Durante o processo de mistura da solução, o polímero reveste as folhas de GO e, pela evaporação do solvente, as folhas se remontam, entremeando o polímero para formar o nanocompósito (81).

Para a obtenção da membrana de PUGO, inicialmente o GO foi adicionado ao solvente DMAc (concentração de 1mg/mL) e sonificado por 30 minutos (37 kHz, 50°C) para obter uma dispersão polimérica de PU 10% com 0,05% de GO em DMAc. Do mesmo modo, foram obtidas as dispersões de PU 10% contendo 0,1% e 0,2% de GO. A membrana do nanocompósito foi obtida pela mesma técnica de evaporação de solvente.

4.2.4.2 Obtenção do óxido de grafeno reduzido com heparina (rGO)

Neste trabalho, a heparina foi utilizada como agente redutor e estabilizador para a produção de rGO a partir do GO (82).

Adicionou-se 50 mg de heparina à dispersão de 25 mg de GO em água Milli-Q (1 mg/mL) e a mistura foi sonificada por 1 hora (37 kHz a 50°C). Posteriormente, foram adicionados 20 µL de hidróxido de amônio (NH₄OH). A dispersão foi vigorosamente agitada sob aquecimento (95°C) por 1 hora, apresentando-se homogênea e estável. Após secagem o material foi redisperso em água ultrapura por três vezes, obtendo-se o rGO. A Figura 4.10 apresenta um esquema para a obtenção do rGO.

Figura 4.10 - Esquema para a obtenção de rGO.



Fonte: própria autora.

4.2.4.3 Preparação de membranas de PU com óxido de grafeno reduzido com heparina (PUrGO)

As misturas de soluções de 10% de PU e 0,05,0,1 e 0,2% de rGO foram preparadas utilizando-se DMAc como solvente e as dispersões foram sonificadas (37 kHz, 50°C) por 1 hora, sendo vertidas em placas de Petri deixadas a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ para a evaporação do solvente. Posteriormente, as membranas foram colocadas em um dessecador a vácuo por um dia e depois lavadas com água ultrapura e secas por três vezes, para garantir a total eliminação do solvente.

4.3 Caracterização dos materiais

4.3.1 Ensaios físico-químicos

Os ensaios físico-químicos foram realizados para avaliar como o material/produto se comporta após sua fabricação ou modificação. Nos ensaios físicos, amostras da mesma composição são submetidas a testes que fornecem informações diretas ou indiretas sobre o comportamento destas em determinadas condições. Em geral, são propriedades de nível macroscópico. Os ensaios químicos dão informações estruturais e de composição do material.

Ensaios termogravimétricos e de espectroscopias (FTIR e Raman) foram realizados para comprovar o sucesso da redução do GO com a heparina.

4.3.1.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

A caracterização termogravimétrica relaciona eventos de perda de massa (como evaporação da água, remoção de grupos oxigenados, queima de impurezas e

outras estruturas presentes nos materiais analisados) de acordo com o aumento da temperatura. A TGA é um ensaio destrutivo baseado na pirólise de uma amostra em alta temperatura para analisar seu conteúdo.

Para esta análise, foi utilizado o equipamento *TA INSTRUMENTS*, modelo SDT Q600 V20.9 Build20 (Waters, EUA) e *software Universal Analysis*. Durante o ensaio, foram empregados ar sintético e taxa de aquecimento de 5°C/ min. Esta caracterização foi realizada para o GO, rGO e heparina.

4.3.1.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é baseada no fenômeno de espalhamento inelástico de um feixe de luz monocromático, e fornece informações químicas e estruturais do material. A interação da luz com a matéria independe da frequência da luz incidente e é uma característica intrínseca do material analisado. Um espectro Raman é apresentado como uma mudança de intensidade *versus* número de onda (83). Os espectros podem ser registrados em uma faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

Essa técnica é muito utilizada para a detecção de pequenas alterações na morfologia estrutural de vários nanomateriais de carbono. Seu espectro mostra sinais específicos para cada alótropo de carbono quando a radiação monocromática interage com a amostra.

Para as análises de GO e o rGO, foi utilizado o espectômetro acoplado ao microscópio óptico confocal *WiTec* modelo Alpha 300R, (Witec GmbH Oxford Instruments Group, Alemanha) operando com uma fonte de laser de 532 nm e potência de 3 mW. Para calibrar o espectrômetro foi utilizado o substrato de óxido de silício. Os espectros obtidos (n=10) foram coletados pelo *software* Witec 3.0. e tratados pelo *software* OriginPro 2021 (OriginLab, EUA).

4.3.1.3 Ensaio Mecânicos de Tensão / Deformação

Estes ensaios determinam as propriedades dos materiais e também medem a capacidade de suportar determinados esforços mecânicos. O comportamento elástico são características importantes da resistência dos materiais. É a propriedade de certos materiais que sofrem deformações reversíveis após a remoção da carga.

No ensaio de tração aplica-se uma carga uniaxial crescente e o corpo de prova é estendido a uma velocidade constante por unidade de área até o momento da

ruptura. Os dados quantitativos das características mecânicas dos materiais podem ser obtidos medindo-se a variação do comprimento em função da carga

Os resultados obtidos como força (F) e variação do comprimento (ΔL) e a curva de tensão (σ) *versus* deformação (ϵ) são calculados empregando-se a Equação 1.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad e \quad A = w \cdot t \quad \epsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (1)$$

onde A= área, t = espessura e L_0 = comprimento inicial da amostra

Neste ensaio, foram avaliadas as propriedades mecânicas da membrana de PU, antes e após o tratamento. O ensaio de tensão-deformação foi realizado em um equipamento de ensaios mecânicos INSTRON modelo 3365, analisados com o *software* Bluehill 3[®] (Instron, USA). Os ensaios seguiram a norma ASTM D638-10 com corpos de prova tipo V cortados com facas de corte confeccionadas para esta finalidade, célula de carga de 100N, garras pneumáticas e velocidade de ensaio constante de 10 mm/min. A Figura 4.11 ilustra as garras pneumáticas usadas no ensaio.

Figura 4.11 - Vista das garras pneumáticas e corpo de prova utilizadas no ensaio de tração.



Fonte: própria autora.

O gráfico da tensão x deformação a inclinação do segmento linear corresponde ao módulo de elasticidade ou Módulo de Young.

Os ensaios foram realizados nas membranas de PU, PUHepB, PUGO e PUrGO. Cinco amostras de cada grupo de membranas foram cortadas com facas de corte tipo V apropriadas para evitar imperfeições que possam provocar danos prematuros na amostra. Os valores médios do módulo de Young, resistência à tração e alongamento final foram calculados.

4.3.1.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia por FTIR é uma técnica que fornece informações sobre as vibrações das ligações de espécies moleculares. É um método analítico que fornece informações sobre as espécies químicas presentes na estrutura. O modo de amostragem em refletância total atenuada (ATR) tem sido amplamente empregado em estudos de biomateriais para identificar os grupos funcionais presentes somente na superfície polimérica. A profundidade de penetração na amostra é de 1-5 μ m. Na FTIR-ATR, a radiação passa por um cristal, como o de germânio, com transmissão de alta taxa de refração, o que permite uma reflexão múltipla no interior do cristal. Isto possibilita que a onda eletromagnética, em contato com a superfície e o cristal, produza um espectro no qual serão analisados os grupos químicos presentes na superfície e, conseqüentemente, emitir resultados sobre a caracterização superficial do polímero.

Cada grupo funcional químico absorve em uma frequência característica e, deste modo, é possível identificar as ligações presentes em um determinado material (84). Portanto, pode-se avaliar qualitativamente a incorporação do anticoagulante e das nanocargas através da análise dos espectros de infravermelho registrados (absorbância *versus* número de onda).

Para esta análise, foi utilizado o espectômetro FTIR Shimadzu IRAffinity-1 com o acessório do modo ATR (Shimadzu, Japão), resolução de 4 cm^{-1} e faixa espectral de 600 a 4000 cm^{-1} . O material foi depositado sobre os cristais de seleneto de zinco do módulo ATR e foram acumulados 128 espectros. Os dados adquiridos pelo

software LabSolution foram tratados pelo editor de gráficos Origin Pro 2021 (OriginLab, EUA).

4.3.1.5 Ensaio de Molhabilidade e Energia Livre

O termo "molhabilidade" refere-se à facilidade com que um fluido se espalha por uma superfície sólida.

O ângulo de contato (representado na Figura 4.12) é definido geometricamente como o ângulo formado pela linha tangente da gota com interface líquido-vapor, desenhada através do limite trifásico. Para um sistema trifásico, onde duas das fases são fluidas (mais comumente, um líquido e um vapor) e a terceira fase é um sólido, a lei de Young (85) descreve a relação entre o ângulo de contato e as energias de interface do sólido-vapor, sólido-líquido e tensões interfaciais líquido-vapor.

Figura 4.12 - Representação do equilíbrio de forças de um líquido em contato com um sólido, onde θ é a medida do ângulo e γ_{LV} , γ_{SV} e γ_{SL} representam as energias da interface líquido-vapor, sólido-vapor e sólido-líquido, respectivamente.



Fonte: própria autora.

O equilíbrio de forças entre a tensão superficial líquido-vapor (γ_{LV}) de uma gota de líquido e a tensão interfacial entre um sólido e a gota (γ_{SL}) manifesta-se através do ângulo de contato (θ) da gota líquida com a superfície sólida e este pode ser utilizado para caracterizar quantitativamente a energia da superfície (γ_{sv}), segundo a Equação 2.

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

O ângulo de contato pode ser calculado conforme a equação de Young (Equação 3).

$$\cos \theta = \frac{(\gamma_{SV} - \gamma_{SL})}{(\gamma_{LV})} \quad (3)$$

A análise do ângulo de contato possibilita determinar o grau de molhabilidade de uma superfície classificando-a em hidrofílica ou hidrofóbica.

Tradicionalmente, superfícies que possuem ângulo de contato $\theta < 90^\circ$, são consideradas hidrofílicas, enquanto aquelas que possuem $\theta > 90^\circ$ são consideradas hidrofóbicas. Este limite decorre da equação de Young, onde as interações entre as três fases ocorrem em uma superfície perfeitamente lisa (modelo físico ideal). Para um ângulo de 180° a gota assume uma forma esférica apresentando uma molhabilidade nula e o sólido é considerado hidrofóbico; uma molhabilidade parcial é representada por ângulos entre 0° e 90° ; e para um ângulo igual a 0° a molhabilidade é perfeita e o sólido é hidrofílico. A afinidade entre moléculas de substâncias diferentes e a capacidade de mistura entre elas é denominada de tensão interfacial, também definida como a energia necessária para que uma fase se espalhe sobre a outra. Quanto maior a tensão interfacial, mais definida a divisão entre as camadas e menor é a capacidade de mistura, isto é, menor a afinidade entre as camadas.

O ângulo de contato relaciona-se de forma inversamente proporcional à energia de superfície, ou seja, quanto menor o ângulo, maior a energia de superfície e vice-versa. Um alto valor de energia de superfície significa que a “adesão” entre os materiais é forte. Esta energia de superfície está relacionada à molhabilidade e é um parâmetro que muitas vezes tem sido correlacionado com a interação biológica.

A teoria de Fowkes assume que a energia total da superfície é a soma dos componentes dispersivo e polar, como mostrado na Equação 4:

$$(\gamma_s) = (\gamma^d) + (\gamma^p) \quad (4)$$

Onde: γ_s - Energia superficial; γ^d - Energia dispersiva; γ^p - Energia polar.

A energia superficial (γ_s) das membranas produzidas foi calculada adotando-se o método de Owens-Wendt (86), (87). Esse método inclui a interação não-dispersiva da superfície e do líquido para calcular a energia superficial substituindo o valor do ângulo de contato de cada amostra obtida com água obtendo-se a Equação 5:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2 (\gamma_S^d \gamma_L^d)^{1/2} - 2 (\gamma_S^p \gamma_L^p)^{1/2} \quad (5)$$

onde γ_{SL} é a energia de superfície na interface sólido-líquido.

Os valores de energia livre de superfície, bem como os componentes dispersivos e polares foram obtidos de acordo com o método de Owens-Wendt (88) medindo o ângulo de contato estático com água.

Para a caracterização da molhabilidade e energia livre utilizou-se o goniômetro *Drop Shape Analyzer - DSA100* (KRÜSS- Germany) com câmera de vídeo acoplada. A medição dos ângulos de contato das membranas de PU e PU tratadas foram medidas à temperatura de 20 °C, seringa manual, com orientação de gota sessil pelo método de ajuste por elipse (tangente). Foram utilizados como líquidos a água deionizada e o etilenoglicol. Foram realizadas 10 medições por amostra em diferentes regiões através do *software Advance*.

4.3.1.6. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

MEV é uma técnica que fornece imagens de alta resolução, permitindo a observação das características microestruturais da superfície. É um método corroborativo a ser usado em conjunto com outros métodos de análise superficiais. A morfologia ou forma física da superfície pode ser classificada de acordo com a rugosidade, textura e porosidade

Esta análise foi empregada para observar a morfologia das superfícies das membranas antes e após os tratamentos, examinadas através de dois microscópios eletrônicos de varredura. O primeiro foi um microscópio de bancada *Hitachi TM 3000*, que opera sob vácuo de pressão variável e não necessita de metalização superficial das amostras. Permite ampliação de até 30000x e aceleração variável (5 kV e 15 kV). O segundo equipamento empregado foi um microscópio eletrônico *JSM-7800F*, com

aceleração de voltagem de 30kV, utilizando magnificações de 10000 a 100000x. Para este último, as amostras foram metalizadas com banho de ouro. Todas as imagens capturadas foram tratadas pelo *software* Image J.

4.3.1.7. Microscopia Óptica

Esse ensaio permite obter imagens ampliadas de um objeto, após a incidência da luz visível ou luz ultravioleta.

As amostras foram alocadas em uma lâmina de vidro para observação e registro de imagens com o microscópio *Eclipse TE 300* (Nikon).

4.3.1.8 Ensaio Colorimétrico por Espectroscopia na luz Ultravioleta (UV)

As propriedades do corante metacromático azul de toluidina (ATO) foram utilizadas para determinar colorimetricamente a quantidade de heparina na membrana de PU. O método envolve o monitoramento da depleção do corante no sobrenadante à medida que o ATO é adsorvido no polímero de heparina sobre a matriz (89), (90).

A solução de ATO a 0,005% foi preparada pela dissolução do corante (Sigma Aldrich, EUA) em uma solução de HCl 0,01 N aquoso e NaCl a 0,2%.

As amostras de PU tratadas com heparina foram cortadas em pedaços de 1x1 cm² e incubadas em solução de ATO para formação do complexo Heparina / ATO, seguido de enxágue com água deionizada para remover a solução de corante que não reagiu.

Para a remoção do complexo formado, adicionou-se 3 mL de hexano a cada tubo, sendo depois agitados vigorosamente por 30 s em um agitador vórtex. Devido à diferença de densidades, formaram-se duas camadas de soluções. A camada inferior contém o ATO restante que deve ser medido, e a camada superior, por sua vez, tem o complexo corante-heparina diluído em hexano. Após a remoção do complexo com auxílio de uma pipeta, as amostras das soluções de ATO foram retiradas de cada tubo e diluídas com etanol absoluto na proporção 1:10. As absorbâncias dessas soluções alcoólicas foram lidas com auxílio de um espectrofotômetro UV-visível no comprimento de onda máximo de absorção do corante ATO obtido.

Para realizar essa análise quantitativa, foi necessário construir uma curva de calibração relacionando a concentração de heparina à intensidade da absorbância obtida. Para a obtenção da curva de calibração, foi preparada uma solução contendo

uma quantidade definida de heparina e solução de azul de toluidina já que a heparina pura é transparente no ultravioleta.

Para este ensaio, foram utilizados cinco dos corpos de prova de dimensão 1x1 cm² que foram colocados em cinco tubos de ensaio contendo 2,5 mL da solução padrão de ATO diluídas a um volume total de 5 mL com solução 0,2% de NaCl. Após 24 horas, observou a formação do complexo entre o azul de toluidina e a heparina, que foi removido adicionando-se 3 mL de hexano em cada tubo. Após agitação por 30 s, a fase do complexo foi retirada e as soluções restantes foram diluídas na proporção 1:10 com etanol absoluto. Essas amostras foram lidas no comprimento de onda máxima do ATO, considerando como “branco” uma solução de NaCl em etanol absoluto. Com os valores de absorbância coletados e a equação da curva de calibração, foi possível determinar a quantidade de heparina.

Para os ensaios pelo método colorimétrico foi utilizado o espectrofotômetro UV-visível *FLORstar Omega* (BMG Labtec- Alemanha). Em todas as avaliações, as amostras das soluções foram preparadas em triplicata para cada tempo de incubação.

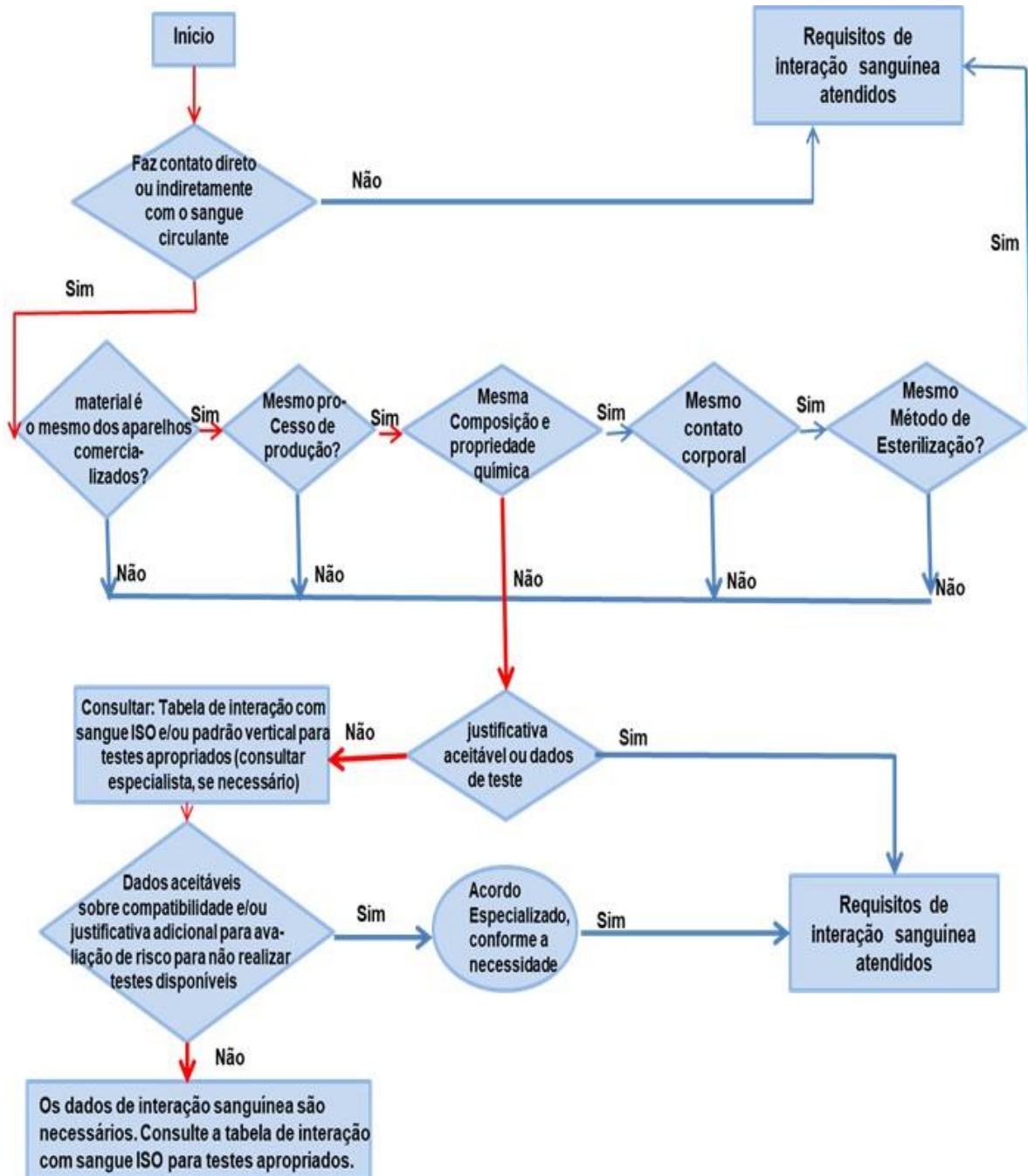
4.3.2 Ensaio Biológicos

Antes de qualquer análise biológica, os processos de tratamento e de caracterização dos materiais foram padronizados utilizando-se o poliuretano de grau médico e os tratamentos foram processados em sala limpa (ISO 8) em capelas de fluxo laminar (ISO 5). Amostras de PU, PUHepB, PUGO 0,2% e PUrGO 0,2% foram cortadas e lavadas em água e detergente neutro (2%v/v) em ultrassom por 15 min. Posteriormente, feitas mais três lavagens com água ultrapura e etanol 70% por 5 min, e secagem e esterilização com UV.

Os ensaios *in vitro* foram realizados com sangue animal (aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA- protocolo 1144/ 2018), cujo adendo foi aprovado em 19 de maio de 2021 para a avaliação da trombogenicidade de materiais poliméricos após o tratamento de superfície (Anexo 1). Esta abordagem permite o estudo da cinética de vários fatores e atividades, variando-se o tempo de exposição do material ao sangue de acordo com o ISO 10993-1 (91). A Figura 4.13 apresenta um fluxograma que, conforme a norma, pode ser usado para determinar quando o teste de interação com sangue é necessário. As categorias de testes apropriados para

os dispositivos ou componentes de dispositivos que entram em contato com sangue circulante são apresentadas na Tabela 4.1.

Figura 4.13 - Fluxograma da Norma ISO 10993-1 que determina se o teste de interação com sangue é necessário.



Fonte: ISO 10993-1- 2009 (E) (tradução livre). (92)

Tabela 4.1 - Exemplos de dispositivos implantáveis e ensaios recomendados

Exemplo de Dispositivos	Categoria de Testes				
	Trombos	Coagulação	Plaquetas	Hematológicos	Sistema Comp.
Anéis de anuloplastia, válvulas cardíacas	X			X ^a	
Balão intraórtico	X	X	X	X	X
Coração Total, DAVs	X	X	X	X	
Dispositivos de embolização				X ^a	
Enxertos endovasculares	X			X ^a	
Desfibriladores implantáveis e cardioversores	X			X ^a	
Eletrodos de Marcapassos	X			X ^a	
Filtros de remoção de leucócitos		X	X	X ^a	
Enxertos e remendos vasculares (sintéticas)	X			X ^a	
Stents	X			X ^a	
Válvulas cardíacas de tecidos	X			X ^a	
Enxertos vasculares	X			X ^a	
Filtros de veia cava	X			X ^a	
^a Somente ensaios de hemólise					

Fonte: ISO 10993-1- 2009 (E) (tradução livre). (92)

Os testes de trombose e ensaios hematológicos foram realizados através da avaliação da adesão e agregação de plaquetas, utilizando-se as técnicas de microscopia óptica e de MEV, conforme indicado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Método de ensaios para dispositivos implantáveis.

Categoria de testes	Método
Trombose	Microscopia eletrônica de Varredura (<u>adesão e agregação de plaquetas</u>); morfologia das plaquetas
Coagulação *	TP, TTPA
Plaquetas*	Contagem/adesão de plaquetas
	Agregação de plaquetas
Hematologia	<u>Hemólise</u>

Fonte: ISO 10993-1- 2009 (E) (tradução livre). (92)

Os critérios de seleção de testes dependem do dispositivo específico avaliado (19). Para se investigar a interação dos dispositivos de assistência ventricular (DAVs) com o sangue são necessários ensaios de trombose e hematológicos. O ensaio de trombose foi realizado através da avaliação da adesão de plaquetas e a visualização das plaquetas aderidas foi realizada no MEV. O ensaio hematológico apresentou as hemoglobinas totais e séricas para o cálculo da % de hemólise.

4.3.2.1 Avaliação da adesão de plaquetas

A adesão e ativação plaquetária são relatadas como indicadores precoces da trombogenicidade de implantes em contato com sangue. Este ensaio foi realizado para avaliar a existência e a extensão de alterações do sangue causadas pelo contato com o material.

Neste trabalho foram utilizadas plaquetas fornecidas pelo banco de sangue que não seriam mais utilizadas em pacientes, mas com validade para ensaios biológicos.

Três amostras de cada membrana (PU, PUHepB, PUGO e PUrGO) foram previamente colocadas em uma solução salina tampão de fosfato (PBS, pH = 7,4) a 37 °C por 12 h para equilibrar a superfície. Nessas amostras, foram depositadas as plaquetas e deixadas em repouso para aderir a 37 °C por 1 h, seguido de lavagem suave com PBS por três vezes para remover as plaquetas não aderentes. A Figura 4.14 apresenta uma figura esquemática do ensaio.

As amostras com as plaquetas aderidas foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 2,5% em peso em PBS à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas com PBS e as plaquetas aderentes nos substratos foram desidratadas em misturas de etanol/ água. Em seguida, elas foram secas a vácuo a 37 °C para as observações. As imagens das amostras foram obtidas por MEV.

4.3.2.2 Teste de Hemocompatibilidade pela Atividade Hemolítica

A avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* envolve diversos parâmetros como o sistema imune celular e humoral, bem como a cascata de coagulação sanguínea e plaquetas.

Vários métodos são empregados, e tanto os materiais quanto os extratos podem ser utilizados para determinar a hemólise. A quantidade de hemoglobina plasmática foi medida e comparada com materiais de referência e controle, conforme a prática ASTM F 756-13 (92) para a realização de testes de hemólise. Esta norma avalia as propriedades hemolíticas agudas *in vitro* de materiais destinados ao uso em contato com sangue.

O ensaio foi realizado por contato direto utilizando sangue suíno, previamente coletado em bolsa de sangue. Posteriormente, 4 alíquotas de 30 mL deste material foram colocadas em tubos de Falcon de 50 mL.

As membradas de PU, PUHepB, PUGO e PUrGO foram equilibradas em soro fisiológico (0,9% p/v) a 37°C por 30 min. e, depois 0,2 g/mL de cada amostra, foram adicionados separadamente nos tubos com o sangue, conforme a norma ASTM F619-14 (93), Após esse período, uma alíquota de 2 mL de cada tubo foi colocada em tubos de coleta EDTA K2, com anticoagulante, para a contagem de plaquetas (hemoglobina sérica) e outras de 2 mL foram colocadas em tubos de coleta amarelo gel SST™ para o hemograma. As coletas foram realizadas em tempos de 0, 1, 2, 5 horas.

O hemograma completo e a contagem de plaquetas foram obtidos através de um contador de células automático que usa a impedância elétrica para contagem de células e um citômetro de fluxo de dispersão, *Analizador Hematológico Drew Excell 2280*, (USA). A hemoglobina sérica, ou hemoglobina livre no soro, foi obtida pelo método colorimétrico de Crosby.

4.3.2.3 Ensaio de Biocompatibilidade “*in vitro*”

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando-se técnicas de cultura de células seguindo a norma ISO 10993-5 (94) . Estes ensaios medem a capacidade destrutiva de substâncias em células vivas ou sistemas de tecidos. Podem ser aplicados em sistemas *in vivo* e *in vitro* , onde cada método tem algumas vantagens e desvantagens. Neste trabalho foi utilizado o ensaio de citotoxicidade colorimétrica *in vitro* por análise espectrofotométrica (95). Os métodos colorimétricos são técnicas baseadas na mudança de cor usando sais de tetrazólio ou coloração específica de células usando corantes cristal violeta e vermelho neutro.

Para verificar a viabilidade celular foi utilizada uma linhagem imortalizada de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). O meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de penicilina/ estreptomicina foram utilizadas para o cultivo das células ,em ambiente a 37 °C sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

As amostras de poliuretano utilizadas nos ensaios foram cortadas em discos com 5,5 mm de diâmetro e foram posicionadas e esterilizadas previamente em placas de cultura de 96 poços. As células cultivadas foram então enzimaticamente dissociadas dos frascos de cultura com uma solução de 0,5% (w/v) de tripsina, 0,2% de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e PBS (fosfato salino, pH 7,4),

centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI 1640. Em seguida, foram semeadas 10000 células sobre cada amostra testada.

Os grupos experimentais foram: a) microplaca de cultura (controle positivo), b) PU, c) PUHepB, d) PUGO 0,2%, e) PUrGO 0,2%. A avaliação da proliferação celular foi feita após 24 e 72 h. de cultivo. Para demonstrar a morfologia celular, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% após 24 horas de cultivo e visualizadas sob microscopia óptica.

Para quantificar o número de células aderidas nas amostras poliméricas, foi determinado uma curva padrão, medindo se a absorbância em função do número. de células. Em placas de cultura de poliestireno de 96 poços, foram adicionadas células HUVEC com 3000, 6000, 9000 e 12000 células em cada poço. As absorbâncias foram lidas em triplicata (n=12).

A estimativa do número de células aderidas e viáveis nas amostras testadas foi realizada a partir do método colorimétrico com tetrazólio MTS.

O sal de tetrazólio MTS (3-(4,5-dimetil-1,2,4-tiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio) é carregado negativamente por isso necessita da ajuda de moléculas aceptoras de elétrons, como fenazina metilsulfato (PMS) ou fenazina etilsulfato (PES). Estas entram na célula e a aquisição de elétrons ocorre a partir do citoplasma ou da membrana plasmática, levando à redução do sal de tetrazólio. O formazan (cor rosa escuro/vermelho), que é produzido como produto após a reação de redução, é facilmente solúvel em água.

Nos poços com as amostras de PU, PUHepB, PUGO e PUrGO para a contagem de células foi adicionado o sal tetrazólio MTS, em cada poço, para a formação do formazan. Após o período de incubação, foram medidas as absorbâncias em 492 nm dessas soluções para quantificar as células viáveis, com o auxílio da curva padrão anteriormente obtida.

4.4 Análises Estatísticas

O teste ANOVA foi aplicado (Sigma Plot 11) considerando-se nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados e as discussões sobre os dados obtidos com cada técnica utilizada.

5.1 Caracterização dos materiais de partida (heparina, GO e rGO)

Os materiais de partida são aqueles que participaram da redução do GO (óxido de grafeno e heparina) e da preparação da membrana (óxido de grafeno reduzido). A heparina sódica utilizada neste trabalho possui as seguintes características físico-químicas: pó branco, pH 6.4; teores de 11,2% de sódio, 1,9% de nitrogênio e produção de monóxido de carbono, CO₂, óxidos de enxofre e de nitrogênio na combustão.

O GO utilizado possui folhas de dimensão lateral de 1,5 µm e espessura de 1 a 5 camadas (96). Na estrutura do GO há várias funcionalidades de oxigênio como hidroxila, carbonila, epóxido e grupos carboxílicos nas suas bordas e no seu plano basal (97). A presença de grupos polares facilita sua dissolução em água e solventes polares. Em tais casos, a estabilidade da dispersão do óxido de grafeno é ditada principalmente pela interação entálpica entre o óxido de grafeno e os solventes (75, 99).

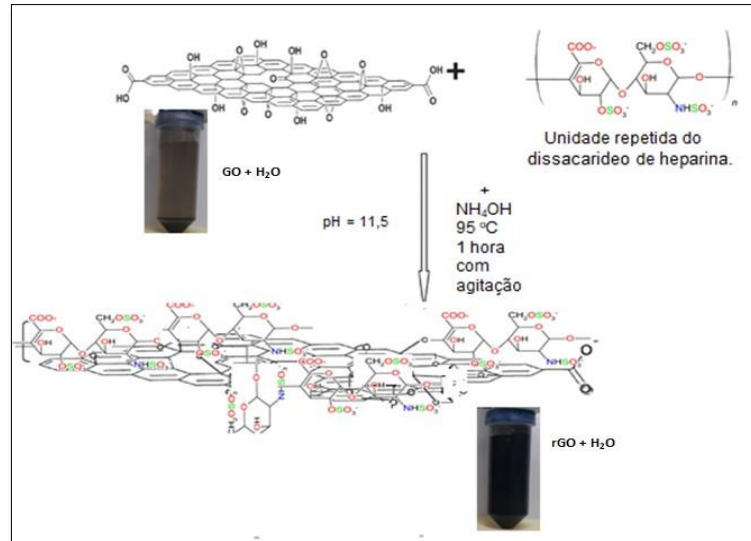
Essas funcionalidades do GO podem ser ligadas às da heparina, que tem em sua estrutura ligações glicosídicas e grupos sulfatos, aminos e carboxílicos, entre outros (99), que permitem a sua utilização na redução do GO sem o uso de quaisquer outros agentes redutores. A heparina também pode ser funcionalizada nas folhas de rGO por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A densidade de carga altamente negativa da heparina pode impedir a agregação do rGO em água por forte repulsão eletrostática (82).

O GO possui uma diversidade de propriedades físico-químicas, cuja principal característica é seu comportamento como um material predominantemente hidrofílico. Na obtenção das folhas de rGO a partir da redução do GO com a heparina, observou-se a formação de uma dispersão homogênea de rGO em solução aquosa, mesmo após 1 hora de repouso conforme ilustra a Figura 5.1.

A redução do GO pode ser explicada pelas seguintes etapas: (a) através da eliminação de carbono da rede do GO (descarboxilação); (b) desidratação por eliminação da hidroxila e hidrogênios adjacentes para formar éter e epóxido; (c) desidratação intermolecular para formar a ligação éter entre duas nanofolhas de GO;

e (d) redução por conversão do grupo carbonila (-CO) em grupo -OH (100). O oxigênio residual do rGO pode estar relacionado aos grupos epóxido, hidroxila e carbonila (101, 102).

Figura 5.1 – Redução do GO utilizando heparina em solução alcalina.



Fonte: própria autora.

5.1.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

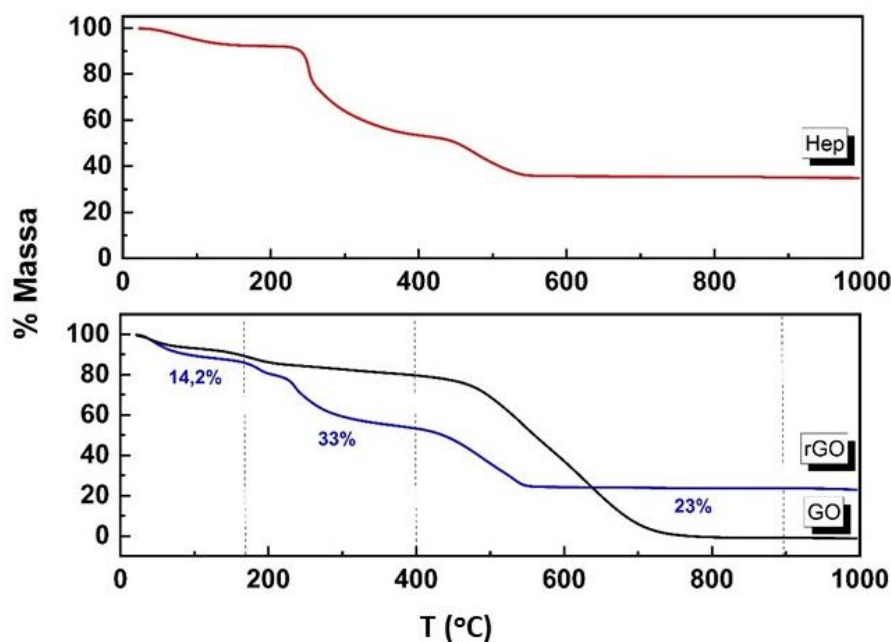
Por esta análise foi verificada se houve a redução do GO com a heparina. Na Figura 5.2, podem ser observados os gráficos que representam a perda de massa em função da temperatura (termogramas). Tanto o GO quanto o rGO são termicamente instáveis e começam a perder massa abaixo de 100°C, fato atribuído à remoção de água fisicamente adsorvida na superfície.

O rGO apresentou três patamares correspondentes aos eventos relacionados à perda de massa em seu termograma: no primeiro, até aproximadamente 160°C, ocorreu a perda de água por evaporação (14,2%). No segundo, a perda dos grupos oxigenados (cerca de 33%) remanescentes na estrutura após a redução abrangeu a faixa de 160 a 400°C; e por último, a combustão do material ocorreu acima dos 400°C (23%). Na faixa de 251°C, a perda de massa do rGO foi maior que a perda para o GO e pode estar relacionada à formação de organossulfatos (73) formados durante a redução do GO com heparina. O termograma de rGO demonstrou que houve mais perda de grupos oxigenados que o GO devido à funcionalização com a heparina, assim como a presença de um alto teor de resíduos (próxima a 20%), atribuído à

presença de impurezas oriundas da formação de óxidos metálicos do sal de heparina, fato que também é verificado no termograma da heparina, próxima a 35%.

O termograma do GO, na primeira fase, apresentou perda de massa associada à evaporação da água (~10%) na sua estrutura. A segunda retratou a perda de funções lábeis do tipo hidroxila na sua superfície do GO. Por fim, o terceiro nível apresentou a perda de massa causada pela decomposição das funções mais estáveis do GO, como os grupos de ácidos carboxílicos e os fenóis e também pela expulsão de monóxido de carbono (CO) e dióxido de carbono (CO₂), durante a pirólise do esqueleto de carbono (78).

Figura 5.2.- Termogramas da heparina (em vermelho), do GO (em preto) e do rGO (em azul).



Fonte: própria autora.

Comparando-se as curvas do rGO e GO, sugere-se que o material produzido neste trabalho possui ainda muitos grupos oxigenados em sua estrutura, necessitando de um tempo maior para que a redução ocorra. (102)

5.1.2 Espectroscopia Raman

Esta técnica analisa os modos vibracionais da estrutura, cada fase do carbono (sp²), carbono (sp³) e é muito utilizada para a caracterização de nanomateriais carbonáceos (82). Devido ao processo de fabricação do grafeno ser muito

diversificado, tais como esfoliação mecânica, deposição de vapor químico e esfoliação química, vários tipos de carbono podem existir como subprodutos. Os espectros da heparina, do GO e do rGO são mostrados na Figura 5.3.

O espectro da heparina apresentou uma banda em 1055 cm^{-1} produzida pelo modo de estiramento da ligação S-O, dos resíduos de nitrogênio e sulfato (103).

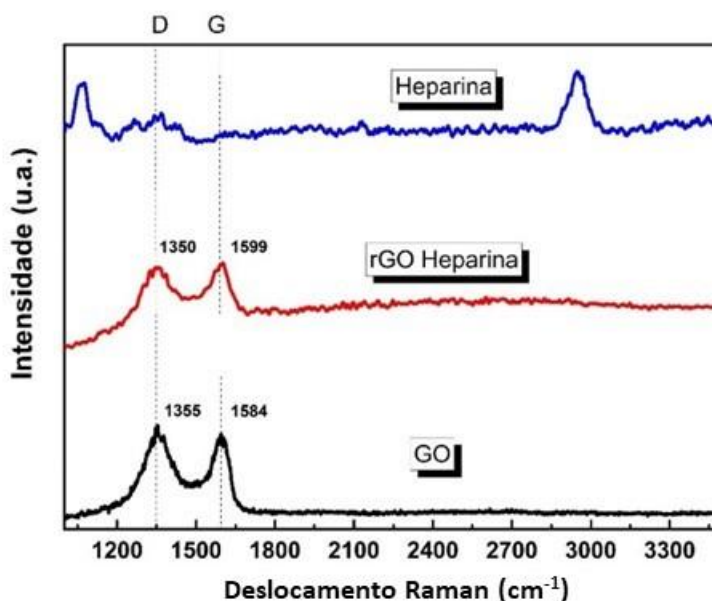
O GO exibiu sinais com maiores intensidades em 1584 e 1355 cm^{-1} correspondentes às bandas G e D. A banda D do GO é atribuída à desordem da estrutura cristalina. Sua intensidade depende do número de defeitos e átomos de oxigênio presentes na superfície do GO (105, 106). e ao efeito de borda, no qual as bordas apresentam ligações incompletas. As vibrações no plano da ligação dupla entre carbonos (C=C), das estruturas gráficas, é atribuída à banda G.

A redução do GO pode ser verificada pela diminuição da intensidade da banda D no espectro, que pode ser atribuído a um possível aumento na extensão dos domínios dos domínios sp^2 após o processo de redução pela remoção de grupos oxigenados da estrutura do GO (106). A posição e a intensidade da banda G forneceu informações referentes ao grau de grafitação da amostra. Os deslocamentos de 1584 para 1599 cm^{-1} indicam a diminuição no grau de grafitação (105) e o alargamento da mesma indica uma maior heterogeneidade ou desordem da estrutura.

Também pode ser avaliada através da razão entre as intensidades das bandas D versus G (I_D/I_G). A razão I_D/I_G é uma medida da extensão do distúrbio presente e é atribuída aos modos de estiramento das ligações C=C das estruturas gráficas (99, 106). Muitas vezes, é utilizada para estimar o grau de desordem de defeitos estruturais gráficos e é inversamente proporcional ao tamanho efetivo do cristalito dos domínios gráficos sp^2 (107).

Neste trabalho, as razões I_D/I_G calculadas foram de 1,06 para o GO e 1,16 para o rGO. Esse aumento nos valores relativos de I_D/I_G do rGO indica a formação de mais defeitos estruturais devido à eliminação de grupos de oxigênio que confirma a capacidade de desoxidação da heparina no GO (107)). Pode-se observar que o deslocamento da banda G do rGO corrobora com a eficiência da redução do GO (100).

Figura 5.3 - Espectro Raman obtido para a amostra de Heparina, rGO Hep e GO.



Fonte: própria autora.

5.1.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

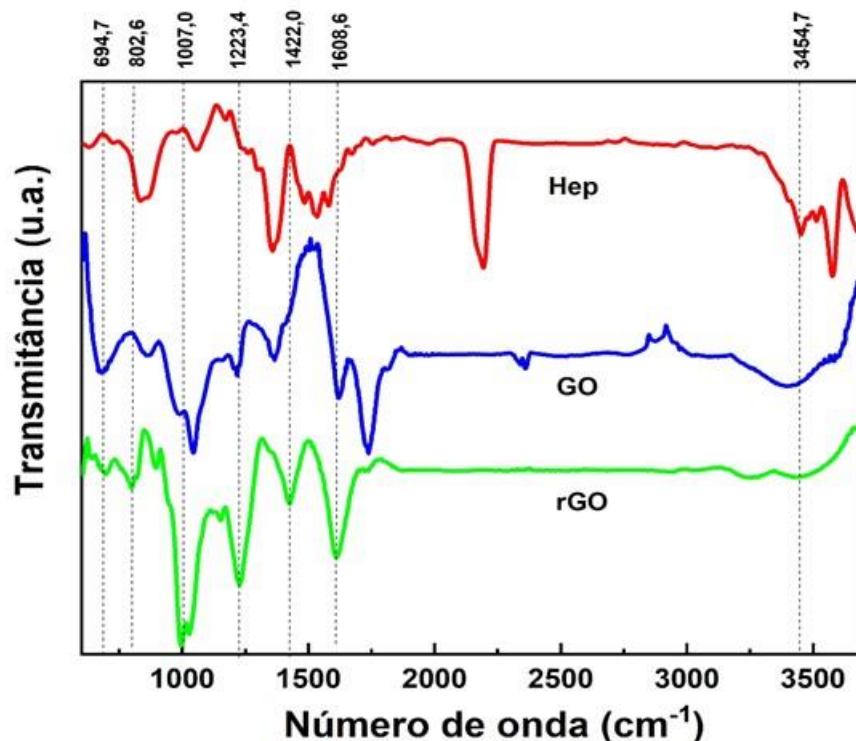
A análise de FTIR permitiu a comparação das intensidades das bandas para várias amostras, mas não forneceu informações claras sobre as estruturas químicas destas devido à subtração arbitrária de “fundo” e extensão das bandas. A heterogeneidade dos grupos funcionais oxigenados e suas interações levaram à sobreposição das bandas características e afetaram sua posição e intensidade. No entanto, os espectros registrados indicaram: (i) a presença (ou ausência) das estruturas químicas e (ii) mudanças nas intensidades relativas das respectivas bandas causadas por procedimentos de redução, informando sobre a transformação das estruturas químicas (107).

A caracterização por espectroscopia FTIR foi realizada para avaliar a desoxidação do GO pela heparina. Como mostrado na Figura 5.4, no espectro da heparina nota-se a presença das bandas referentes aos grupos funcionais existentes na cadeia tais como OH, CH, NH e C=O, que entre 1190 e 1235 cm^{-1} são atribuídas aos grupos N-sulfonato (108). As bandas localizadas entre 1530 e 1565 cm^{-1} são relacionadas às vibrações provenientes dos modos de deformação simétricos entre

C-H do grupo amida. Entre 1620 a 1630 cm^{-1} , encontra-se a banda de vibração característica da ligação C=O.

O GO exibiu suas bandas características no FTIR correspondentes aos grupos funcionais de sua estrutura, incluindo as bandas do modo de estiramento: do C–O (alcoxi) em 1099 cm^{-1} , do C-O-C em 1217,6 cm^{-1} , do C=O (ácidos carboxílicos e carbonilas) em 1720 cm^{-1} ; e dos modos de deformação do grupo O–H em 3315 cm^{-1} e 1303,9 cm^{-1} .

Figura 5.4. Espectros de FTIR dos materiais de partida Heparina (em vermelho), rGO (em verde) e GO (em azul).



Fonte: própria autora.

Após a redução com a heparina, observa-se no espectro do rGO uma banda com uma ondulação entre 1190 e 1218 cm^{-1} atribuída ao estiramento de grupos sulfonato polares da heparina e uma banda em 778,5 cm^{-1} característica da heparina (109). Bandas entre 2800 a 2940 cm^{-1} referentes ao grupo funcional O-H desapareceram. Na região de 1728 cm^{-1} , as bandas relacionadas à ligação de hidrogênio intramolecular com o C=O diminuíram. Em contrapartida, as bandas localizadas em 1620 cm^{-1} (referente ao grupo C=O) sofreram aumentos na intensidade. Pela avaliação dos espectros de FTIR do rGO em comparação com GO,

pode-se confirmar que algumas das funcionalidades do oxigênio no GO foram removidas pela heparina. Estas análises sugerem que a heparina está presente na superfície do rGO.

5.2 Caracterização das membranas poliméricas

No tratamento da membrana de PU por fotoenxertia, a ativação da superfície de PU permitiu a ligação com a amina do cloreto de benzalcônio, funcionando a superfície de PU com a heparina.

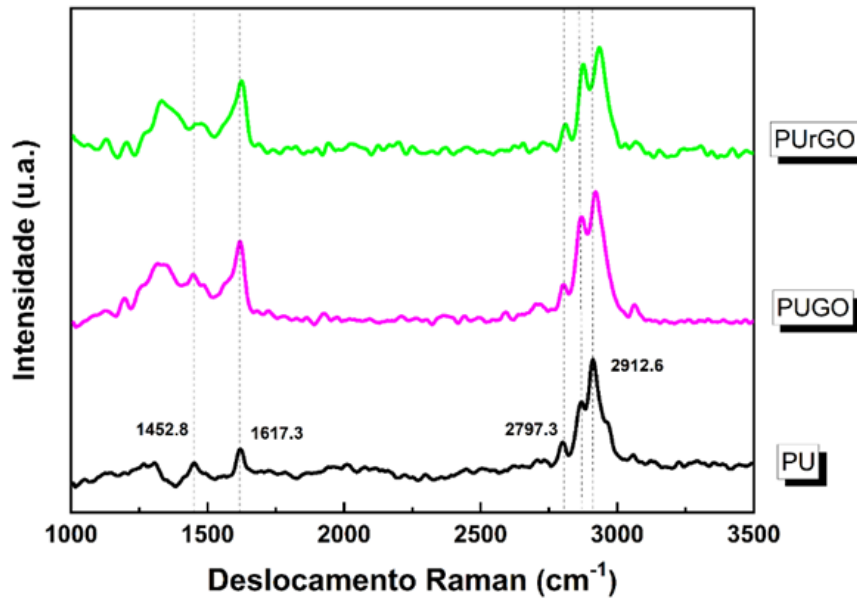
A mistura em ultrassom das soluções de PU e GO utilizando o DMAc como solvente foi eficaz para aprimorar a adesão interfacial entre elas. A combinação da agitação e da ultrassonicação da mistura de soluções também proporcionou uma distribuição mais uniforme da dispersão final o que proporcionou um aumento nas propriedades físico-químicas dos nanocompósitos (110). O solvente foi removido por evaporação.

5.2.1 Espectroscopia Raman

Os resultados da caracterização da superfície das membranas de PU, PUGO e PUrGO podem ser observados na Figura 5.5.

A adição de nanocargas dos derivados de grafeno contribuiu muito para aumentar a intensidade da banda aromática C=C. Sua posição muda, no entanto, para frequências mais baixas (de 1617,3 a 1452,8 cm^{-1}), o que significa que as interações entre as ligações duplas de carbono conjugadas são mais semelhantes a aromáticos. Enquanto isso, outras bandas oriundas das ligações C-O ou N-H também têm sua intensidade aumentada devido à mudança nas interações matriz-nanocargas.

Figura 5.5 - Espectro Raman obtido para as membranas de PU, PUGO e PUGO.



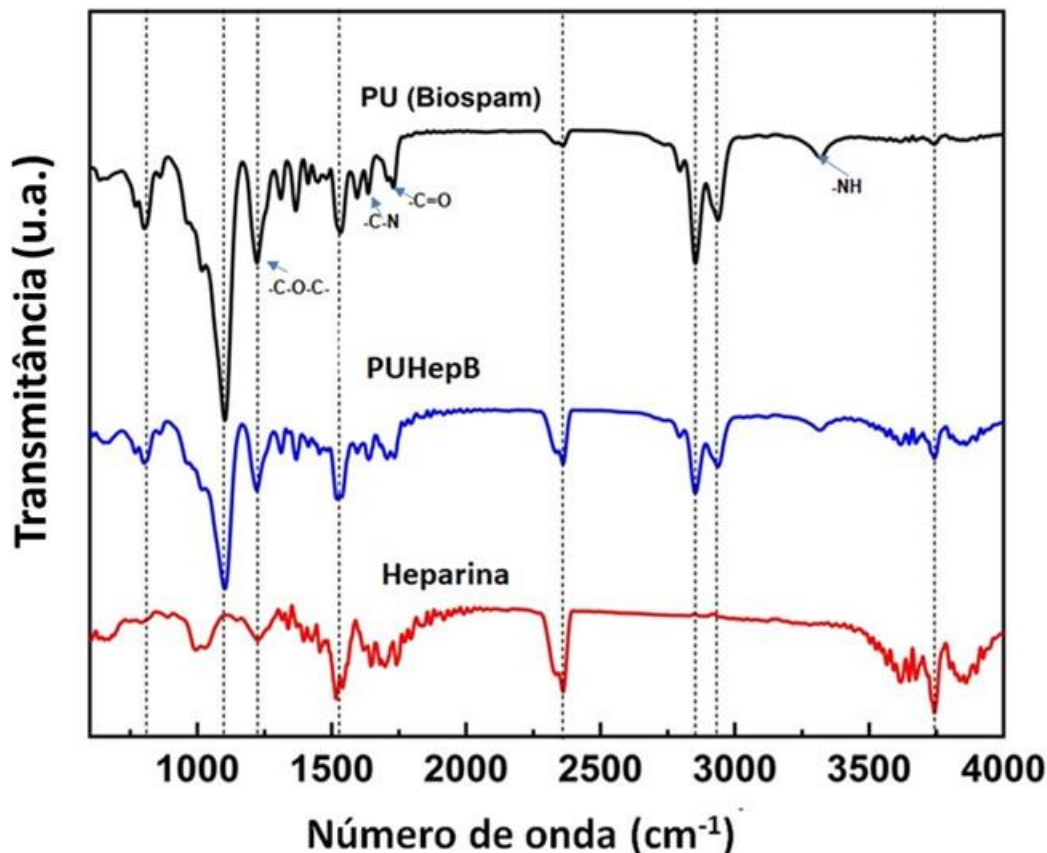
Fonte: própria autora.

5.2.2 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR - ATR mostraram que as membranas de PU e de PUHepB apresentaram diferenças como mostra a Figura 5.6 Alguns comprimentos de onda e as ligações correspondentes podem ser vistas no Anexo 2.

Na membrana de PU tratada com HepB, nas regiões entre 723,3 e 802,6 cm^{-1} , observam-se: variações na intensidade das bandas correspondentes ao modo de deformação das ligações N-H e S-O e C=C; uma banda do modo de estiramento entre C-O do álcool primário e éter alifático entre 1006,9 e 1099 cm^{-1} ; uma banda entre 1150 e 1250 cm^{-1} relacionada ao estiramento da ligação S=O; e uma outra de forte intensidade de um estiramento simétrico referente à sulfonamida em 1130 cm^{-1} . A banda em 2853,5 cm^{-1} apresentou intensidade reduzida na membrana tratada em relação à membrana de PU; e em 2945,7 cm^{-1} , a intensidade da banda mostrou-se aumentada após o tratamento devido aos estiramentos simétrico e assimétrico das ligações C-H mais presentes no benzalcônio. As bandas em 3315 cm^{-1} referente as ligações -NH do isocianato desaparecem na membrana tratada, o que evidencia que o -NH se liga aos grupos C-O (dos radicais éter alquil, aril e vinílico) após o tratamento.

Figura 5.6 - Espectros FTIR da superfície das membranas de PU e PU tratado com HepB.



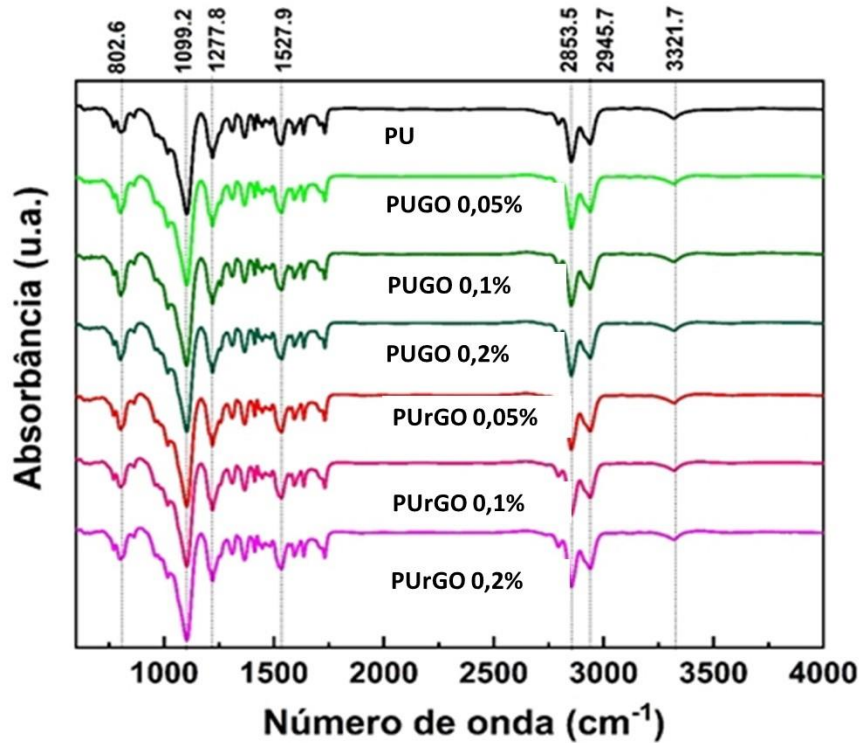
Fonte: própria autora.

Esta técnica foi aplicada a todos os nanocompósitos de PU com diferentes teores de GO e rGO e os resultados estão apresentados na Figura 5.7.

As bandas presentes no PU também aparecem em seus nanocompósitos com GO e rGO, diferindo nas intensidades. Em $802,6\text{ cm}^{-1}$, verifica-se uma banda mais intensa devido ao modo de dobramento das ligações C=C do GO e do rGO com relação ao PU. No entanto, em $987,60\text{ cm}^{-1}$, as bandas do modo de estiramento das ligações C-O e C=O podem pertencer tanto ao GO e rGO quanto ao PU, por estarem localizadas em regiões extremamente próximas. Há presença de bandas nas membranas de PU e seus nanocompósitos em 1528 cm^{-1} (estiramento C-N) e $1099,2\text{ cm}^{-1}$ (estiramento da ligação C-O, alifática). Em $1217,82\text{ cm}^{-1}$, aparece uma banda que pode estar relacionada aos estiramentos das ligações S=O da heparina ou C-O-C do rGO. As bandas de absorção do grupo carbonil -C=O encontram-se em torno de 1645 e 1722 cm^{-1} . Em 2853 e 2945 cm^{-1} (modos de vibrações de alongamento do CH₂

simétricas e assimétricas) confirmam a formação de ligação de uretano em PU e seus nanocompósitos (99,100).

Figura 5.7 - Espectros de FTIR de PU (BioSpan), PU/GO (0,05;0,1 e 0,2%) e PU/rGO. (0,05;0,1 e 0,2%).



Fonte: própria autora.

Nota-se também a ausência da banda em 2270 cm^{-1} , fato que ocorreu devido aos grupos NCO do diisocianato que foram ligados para formar grupos uretanos no PU. Em todos os nanocompósitos, o isocianato foi consumido para a formação do grupo de uretano contendo N-H (banda em 3320 cm^{-1} de anel aromático).

Ao comparar os espectros FTIR, nota-se que a adição das nanocargas não influencia a estrutura química da matriz de poliuretano, isto é, a absorção e a difração da radiação infravermelha têm baixa influência nas formas de onda devido ao baixo teor destas nanocargas (111).

5.2.3 Ensaio mecânico de tração

O desempenho mecânico dos materiais poliméricos é complexo porque apresentam um comportamento viscoelástico. Nesse trabalho, as membranas foram obtidas após a evaporação de solvente em placas de Petri podendo ser consideradas,

portanto, isotrópicas. Foram avaliados cinco corpos de prova por amostra nos ensaios de tensão e deformação. As análises foram realizadas até a elongação de 500% apesar da fratura atingir mais de 1000% de elongação.

Nanocargas de grafeno e seus óxidos são frequentemente utilizadas em nanocompósitos de PU para melhorar o desempenho mecânico do polímero puro, afim de aumentar a interação entre polímeros e materiais de carbono e aprimorar suas propriedades mecânicas e térmicas (112), (113). Essas propriedades dependem da forma, dimensão, quantidade, distribuição e dispersão das nanocargas, assim como da compatibilidade entre a carga e a matriz polimérica (114).

A dispersão das nanocargas é frequentemente afetada por fenômenos de agregação que determinam a redução de sua eficácia. A probabilidade de agregação da fase dispersa é maior conforme aumenta o seu teor. Neste trabalho foram avaliadas as concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,2% de GO e rGO. Na concentração igual a 0,2%, ambas nanocargas apresentaram aumentos significativos do módulo de Young.

Na Tabela 5.1 estão apresentados os valores obtidos no ensaio mecânico de tração e deformação de 500%. Os dados quantitativos foram apresentados como valores médios \pm DP.

Tabela 5.1- Amostra, tensão à ruptura e módulo de Young na elongação de 500%.

Amostra n = 5	Espessura (mm)	Extensão (mm)	Carga (N)	Tensão à ruptura (MPa)	Módulo de Young (Mpa)
PU	0,55 \pm 0,08	129,08 \pm 1,04	29,40 \pm 4,29	15,52 \pm 0,64	3,10 \pm 0,12
PUHepb		129,48 \pm 2,07	18,65 \pm 3,37	15,48 \pm 1,18	3,10 \pm 0,24
PUGO 0,2%	0,47 \pm 0,07	132,23 \pm 2,18	22,68 \pm 2,53	15,34 \pm 0,77	3,07 \pm 0,15
PUrGO 0,2%	0,36 \pm 0,02	128,86 \pm 0,37	18,06 \pm 0,77	16,10 \pm 1,53	3,22 \pm 0,31

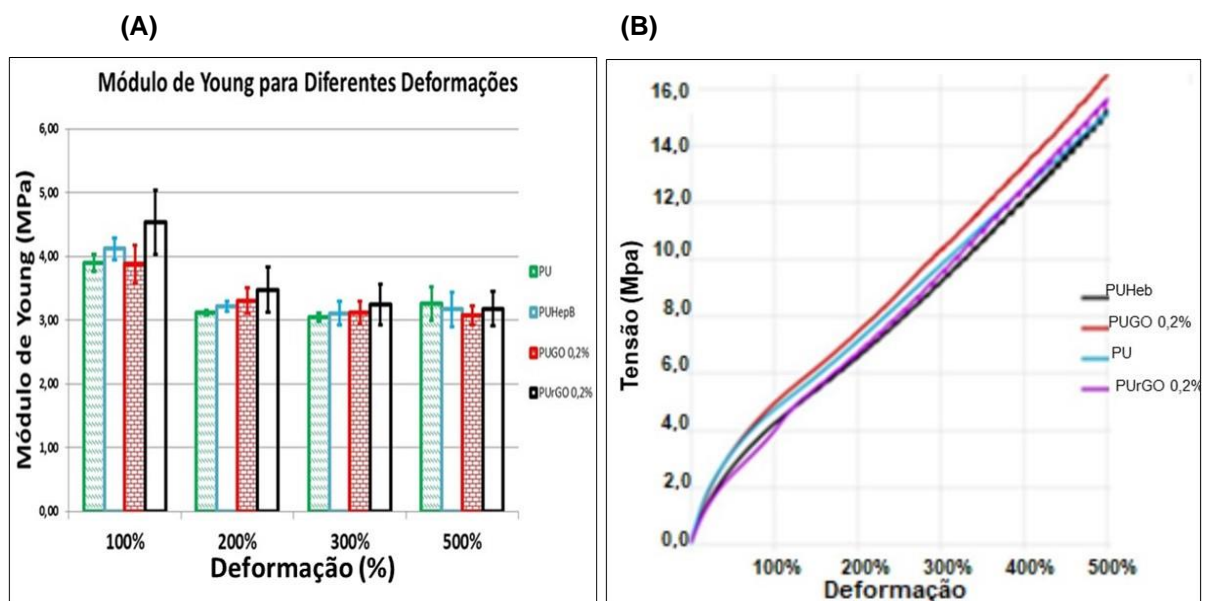
Fonte: própria autora.

Em geral, para caracterizar os elastômeros são avaliados os módulos de 100%, 200% e 300%. Eles não descrevem o módulo real, mas a tensão necessária para produzir tais deformações.

A Figura 5.8 (A) apresenta os módulos de elasticidade do PU e seus nanocompósitos nas diferentes deformações e a Figura 5.8 (B) as curvas de tensão *versus* deformação. As curvas ilustradas demonstram o comportamento de um elastômero com a adição de nanocargas. A inflexão apresentada no início da curva

ocorre devido à acomodação e aos artefatos, tais como, o alinhamento do corpo de prova na garra ou no sentido da tração. O alongamento máximo na ruptura pode ser correlacionado a resistência à deformação da amostra até o rompimento. No segmento da linha reta da curva de tensão e deformação, representa o desnovelamento e alinhamento das cadeias macromoleculares longas e flexíveis e o material exibe perfeita elasticidade. Posteriormente, apresenta deformações permanentes devido ao deslizamento das macromoléculas com o rompimento de ligações secundárias entre cadeias adjacentes. As curvas ilustradas demonstram o comportamento de um elastômero com a adição de nanocargas das amostras. As membranas apresentaram uma elevada deformação elástica quando submetidas à uma tensão de tração.

Figura 5 8 – (A) Módulo de Young x Deformação e (B) Tensão x Deformação das amostras de PU, PUHepB, PUGO e PUGO 0,2% em 500% de deformação.



Fonte: própria autora.

Utilizando a análise unidirecional de variância ANOVA e fazendo-se uma análise de comparação múltipla de pares (método de Holm-Sidak), para $P < 0,05$, verificou-se que houve uma variação da resistência à tração somente entre as membranas dos nanocompósitos de PU com GO e rGO, sendo que, as de PUGO tiveram maior tensão para uma mesma deformação de 500%. A tensão à ruptura aumentou com o incremento da quantidade de carga. Em 100%, o PUGO 0,2%

apresentou um valor de módulo de Young de 16,41% maior que o PU e, em 200%, cerca de 12,26% maior que o PU.

De modo geral, houve uma melhora das propriedades mecânicas com o aumento da concentração dos nanocompósitos de PUGO e PUGO em relação ao PU puro. A funcionalização covalente do GO e o PU resulta em ligações mais fortes, aumentando suas propriedades mecânicas, pois ocorre uma interação dos grupos oxigenados do GO com os grupos isocianato na parte final da cadeia de PU (115). A formação de ligação química entre o grupo hidroxila de rGO com o isocianato do PU pode aumentar o grau de esfoliação do rGO, resultando em melhores propriedades dos nanocompósitos (116) (118). A dispersão de rGO em PU, devido à presença da heparina, com densidade de carga negativa dos muitos grupos carboxílicos e sulfônicos evita que o rGO resultante se re-aglomere em solução e também proporcionaram um aumento nas propriedades mecânicas.

Tanto o GO como o rGO são cargas que aumentam a densidade de ancoramento. Como descrito anteriormente, o PU é composto de cadeias rígidas de isocianatos e flexíveis e amorfas de poliéter em sua estrutura. Assim, o GO (por ser polar) tende a se ligar preferencialmente com a cadeia polar rígida de isocianatos (C=N), enquanto o rGO adere preferencialmente nas cadeias amorfas de poliéter por ser mais apolar que o GO. Como as concentrações de nanocargas eram baixas, as membranas permaneceram flexíveis mesmo apresentando uma maior rigidez e menor elasticidade. Os nanocompósitos de PUGO na mesma concentração apresentaram maior módulo de Young devido à presença de grupos remanescentes de oxigênio na superfície das folhas de rGO, fator que restringe a mobilidade dos polissacarídeos misturados (118) por criar mais ligações cruzadas. Pode-se observar que o módulo de Young dos nanocompósitos de PU é maior que o do PU puro, o que pode ser atribuído à eficiente transferência de carga entre o GO e rGO na matriz polimérica (116).

5.2.4 Molhabilidade e energia livre de superfície

A molhabilidade da superfície, muitas vezes referida como hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, afeta a resposta biológica a um material implantado. As primeiras moléculas a atingirem a superfície em escala de nanossegundos são as moléculas de água que interagem e se ligam de forma diferente, dependendo das propriedades da

superfície. Essas águas superficiais influenciam na fixação de proteínas e outras moléculas. A adsorção de proteínas ocorre na superfície de um biomaterial após seu contato com fluidos biológicos e a resposta biológica é controlada pela natureza das proteínas adsorvidas na superfície (119). Portanto essas propriedades de superfície influenciam a adsorção de proteínas, adesão e ativação plaquetária, coagulação sanguínea e adesão celular e bacteriana (120).

Neste trabalho, a molhabilidade foi observado estaticamente avaliando-se os valores de ângulos de contato estáticos de equilíbrio das amostras de PU e de PU tratadas, apresentada na Figura 5.9 (a). Pôde-se notar que os ângulos de contato diminuíram nas membranas tratadas com heparinato de benzalcônio por fotoenxertia, isto é, mostraram caráter mais hidrofílico devido à presença da heparina, que é um mucopolissacarídeo aniônico com grande quantidade de grupos HSO^{3-} . Os resultados obtidos para a energia livre de superfície mostraram um aumento das interações polares em todas as amostras tratadas. A diminuição nos ângulos de contato pode representar uma medida indireta da extensão da mudança. Uma maior hidrofiliidade sugere que haverá menor adsorção de proteínas, aumentando assim a hemocompatibilidade de superfície da PU.

Com a adição de GO nos PUs os ângulos aumentaram conforme a concentração das nanopartículas cresceu. Nos tratamentos com a adição rGO, as superfícies se tornaram mais hidrofóbicas (na concentração de 0,2%, o ângulo de contato aumentou de 88° para 97° . O aumento esperado na hidrofobicidade pode ser atribuído à menor presença de grupos polares na estrutura do rGO em comparação ao GO. O ângulo de contato da membrana contendo GO foi menor quando comparado ao da membrana de rGO devido à maior presença de grupos oxigenados.

Com o aumento do ângulo de contato houve uma diminuição na energia de superfície e, em todos os tratamentos, as interações polares são maiores que as interações dispersivas, ou seja, há uma predominância de forças de Coulomb, mais intensa que as forças de Van der Waals das interações dispersivas, como mostrou a Figura 5.9 (b).

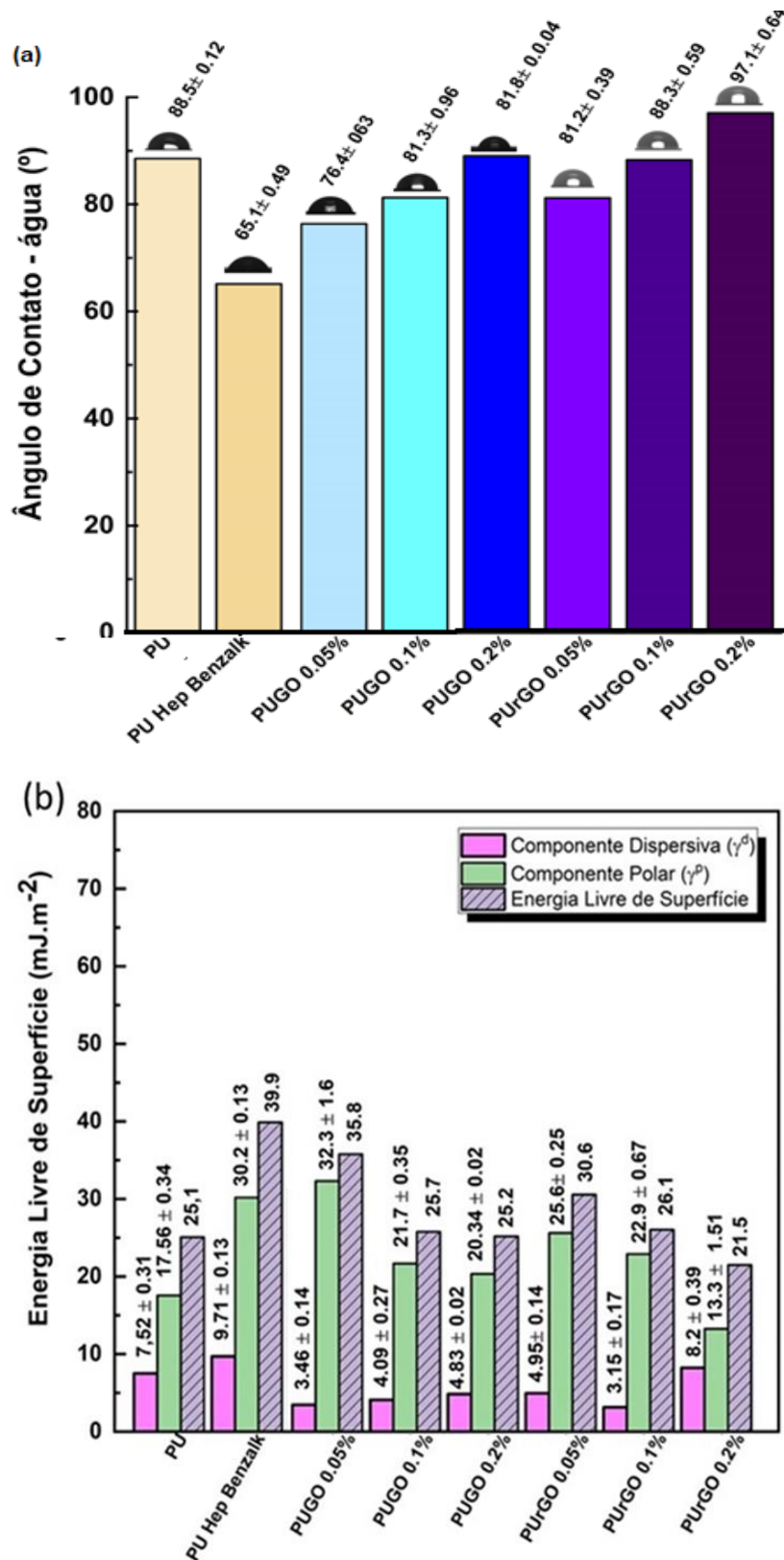
Em geral, as superfícies hidrofóbicas são consideradas mais adsorventes de proteínas do que as superfícies hidrofílicas decorrentes da água fortemente ligada nesta e nas superfícies inertes (122, 123).

A energia livre de superfície de um material é uma característica que influencia na hemocompatibilidade porque afeta a adesão do polímero, a molhabilidade do material e até a biocompatibilidade (89).

Estudos investigaram diferentes materiais com propriedades diversas de superfície e o ângulo de contato da superfície é capaz de afetar a adesão e proliferação celular, no entanto, não há muitos dados sobre o impacto desses fatores na diferenciação e função celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* (123). As proteínas tendem a se ligar a superfícies hidrofóbicas, enquanto as células são tipicamente aderidas e proliferadas nas superfícies hidrofílicas (124).

Para dispositivos de contato com sangue, a literatura sugere que biomateriais com baixo CA não necessariamente resultam em maior biocompatibilidade. Foram realizados estudos em que membranas com diferentes molhabilidades e deduziu-se que uma membrana com uma distribuição equilibrada de domínios hidrofóbicos e hidrofílicos teve a melhor biocompatibilidade e levou à uma redução na adsorção de proteínas e também na coagulação (126, 127). Outras pesquisas mostraram uma diminuição na ativação plaquetária com um aumento na molhabilidade (127). As plaquetas tendem a aderir no material estranho e tornam-se ativadas. Uma vez ativadas, iniciam a trombose pela secreção de fatores pró-trombóticos que levam à coagulação. Em condições normais, a trombose e a ativação do complemento são respostas favoráveis que impedem a perda sanguínea, no entanto, são desfavoráveis na presença de um material estranho.

Figura 5 9 - (a) Ângulos de contato da água formados em contato com a superfície das membranas e (b) Energia de superfície com as componentes polares e dispersivas da água para as membranas sem e com tratamentos.



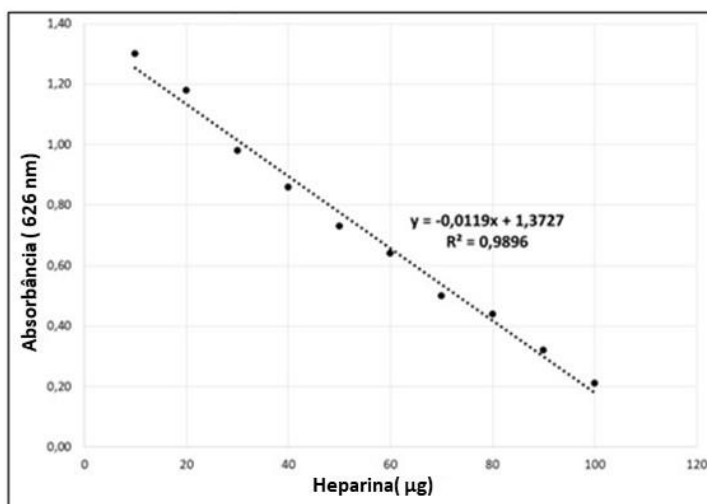
Fonte: própria autora.

Os resultados obtidos para a energia livre de superfície mostram um aumento das interações polares em todas as amostras tratadas. Assim, como há uma relação entre a hidrofiliicidade do material e a trombo-resistência, pois polímeros hidrofílicos reduzem a energia livre interfacial no sangue, cujo principal componente é a água, pode-se avaliar uma superfície trombo-resistente através do ângulo de contato.

5.2.5 Ensaio Colorimétrico

As membranas modificadas por fotopolimerização foram caracterizadas por espectroscopia UV. O comprimento de onda de absorção do corante azul de toluidina utilizado apresentou pico máximo em 626 nm. Com este valor de absorbância foi obtida a curva de calibração da heparina, apresentada na Figura 5.10, para o cálculo da quantidade de heparina na superfície, cujos valores estão na Tabela 5.2. A ilustração da Figura 5.11 apresenta membranas de PU com heparina em solução de azul de toluidina nos diferentes intervalos de tempo.

Figura 5.10 - Curva de calibração da heparina em 626nm.



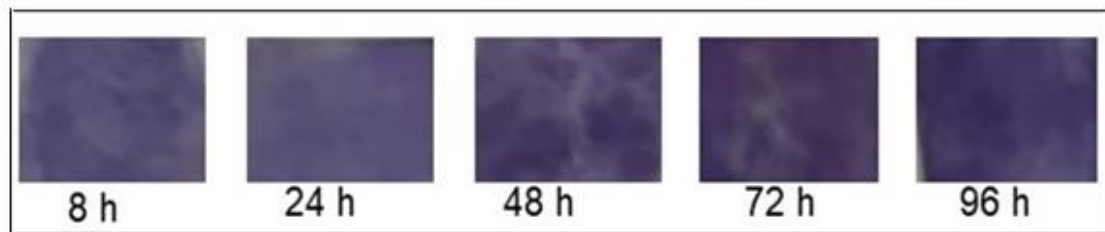
Fonte: própria autora.

Tabela 5.2 - Quantificação de heparina na superfície de PU.

PU tratado (n=3) Tempo (h)	Área média (cm ²)	Heparina/área (µg/cm ²)
1	0,99	1,34
8	1,10	1,49
24	1,00	1,36
48	1,09	1,37
72	1,10	1,49
96	1,10	1,37

Fonte: própria autora.

Figura 5. 11 – Amostra de PU com heparina em solução de azul de toluidina após 8, 24, 48,72 e 96 horas.



Fonte: própria autora.

5.3 Ensaios Biológicos *in vitro*

Os ensaios *in vitro* permitem a realização dos ensaios sem o sacrifício de animais e com custos relativamente baixos (128).

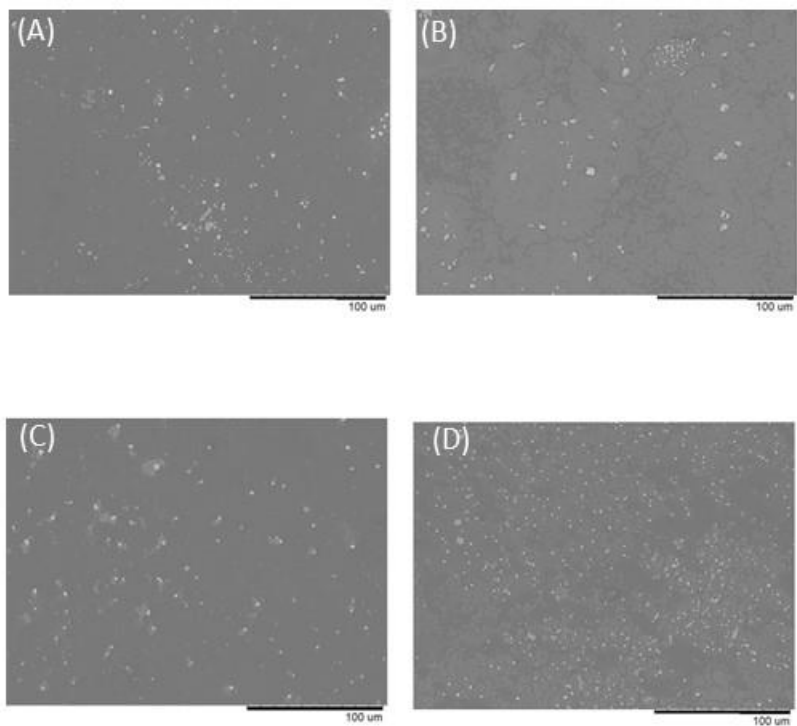
Foram avaliadas uma membrana de cada material (PU, PUHepB, PUGO e PUrGO) e de cada membrana foram retiradas amostras em triplicata para as avaliações.

5.3.1 Avaliação da adesão de plaquetas

A Figura 5.12 ilustra as diferentes membranas com as plaquetas aderidas nas superfícies após incubação. O número de plaquetas foi contado através das imagens obtidas por MEV, com três amostras de cada tratamento de superfície e plaquetas da mesma origem. A contagem foi realizada nos quatro quadrantes da imagem de cada amostra (n=12). A Figura 5.13 apresenta os valores da média e o desvio padrão de plaquetas por mm².

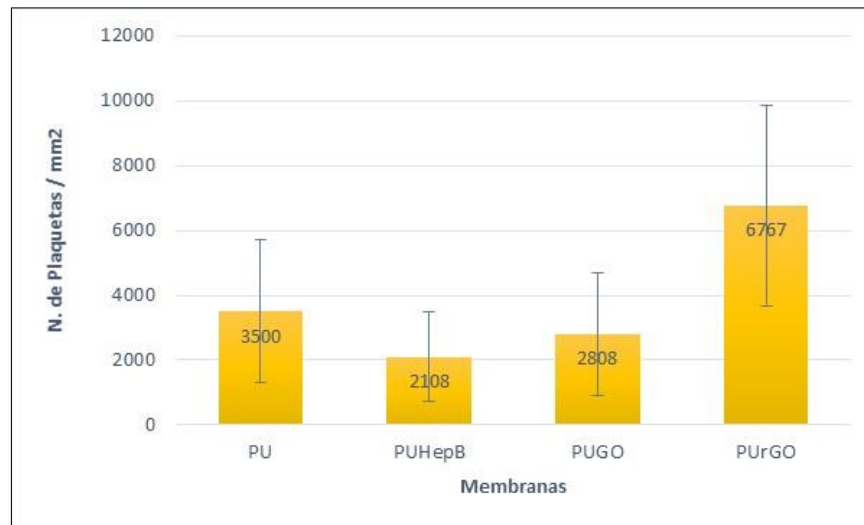
A adesão de plaquetas em substratos depende das características da superfície como molhabilidade, carga e rugosidade (129, 130) e a composição do meio de cultura das plaquetas. O meio padrão para as plaquetas é o plasma rico em plaquetas que contém fatores de coagulação e outras proteínas que podem influenciar a adesão plaquetária. Pode-se observar que a membrana de PUHepB, por ser mais hidrofílica, apresentou menor número de plaquetas aderidas. A maior adesão foi verificada nas superfícies mais hidrofóbicas de PUGO. Isso pode ter ocorrido como resultado das plaquetas não serem isentas de proteínas plasmáticas (131, 132).

Figura 5.12 – Micrografias de adesão de plaquetas nas superfícies das membranas de (A) PU BioSpan, (B) PUHepB, (C) PUGO e (D) PUGO após 1 hora de incubação (5000 V).



Fonte: própria autora.

Figura 5.13 – Número de plaquetas aderidas na superfície das membranas de PU, PUHepB, PUGO e PUrGO.



Fonte: própria autora.

5.3.2 Atividade Hemolítica

O número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas foi quantificado antes e depois da incubação de sangue com o biomaterial. As comparações da atividade hemolítica foram realizadas em função do tempo de incubação em condições estáticas.

A hemólise, é acompanhada pela liberação da hemoglobina. Assim, um aumento da concentração de hemoglobina livre no plasma é um indicador direto da destruição de eritrócitos e o aumento dos níveis de hemoglobina livre pode induzir toxicidade (132). Dependendo da hemólise, os materiais podem ser classificados em três categorias diferentes: aqueles que resultam em mais de 5% de hemólise são classificados hemolíticos, entre 5 e 2% como ligeiramente hemolíticos, e abaixo de 2% como não hemolíticos (92).

A dosagem de hemoglobina sérica (hemoglobina livre) mede a quantidade de hemoglobina flutuante no soro sanguíneo. O cálculo da % de hemólise ou índice hemolítico, pode ser realizado através da Equação 6.

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{\text{concentração da hemoglobina livre}}{\text{concentração da hemoglobina total}} \times 100 \quad (6)$$

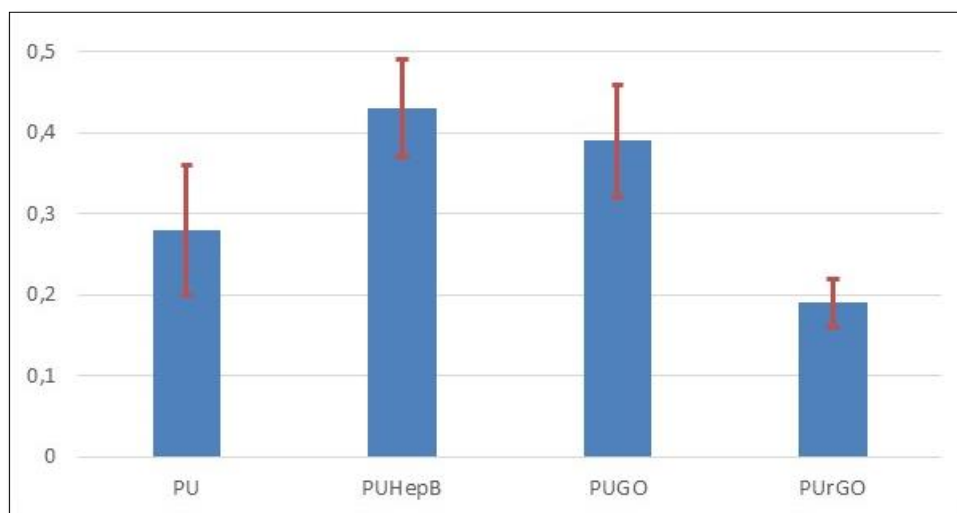
O resultado do teste de hemólise *in vitro* é influenciado pela variabilidade nas suas condições, como origem do sangue (humano, ou de coelho, ou de porco), variação diária na composição do sangue, variabilidade de incubação, tempo de exposição, temperatura do sangue, relação sangue/biomaterial, tipo de material de referência e o método de medição da hemoglobina (92). Foram avaliadas amostras de sangue coletada tempos diferentes e os resultados dos valores médios estão apresentados na Tabela 5.3. O índice hemolítico foi calculado utilizando a equação 6 e apresentado na Figura 5.14.

Tabela 5.3 - Valores médios de hematócrito, plaquetas, hemoglobina total e, hemoglobina sérica obtidos no hemograma (amostras de sangue coletados em diferentes tempos).

	Plaquetas (/mL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (/mL)	Eritrócitos (milh/mm ³)	Hb total (mg/dL)	Hb sérica (mg/dL)
PU	353,3 ± 2,5	32,3 ± 1,0	5,6 ± 0,3	5,7 ± 0,5	1066,7 ± 665,8	33,1 ± 12,2
PUHepB	286,0 ± 18,7	42,0 ± 0,0	8,0 ± 0,1	7,8 ± 0,1	1433,3 ± 57,73	58,9 ± 6,5
PUGO	227,7 ± 8,1	46,0 ± 0,0	6,2 ± 0,0	7,9 ± 0,1	15900,0 ± 100,0	54,3 ± 3,4
PURGO	390,1 ± 14,5	31,0 ± 0,0	5,6 ± 0,1	5,4 ± 0,1	10366,7 ± 208,2	20,3 ± 1,8

Fonte: própria autora.

Figura 5.14 – Índice Hemolítico de PU, PUHepB, PUGO e PURGO.



Fonte: própria autora.

A análise de comparação entre as quatro membranas avaliadas, a membrana de PURGO apresentou o menor valor de índice hemolítico entre todas as membranas.

Conforme a norma ASTM F 756-00 todas as membranas avaliadas apresentaram índices menores que 2% são consideradas não hemolíticas, o que significa que os tratamentos realizados não induz danos nas membranas dos eritrócitos que possa levar à sua lise.

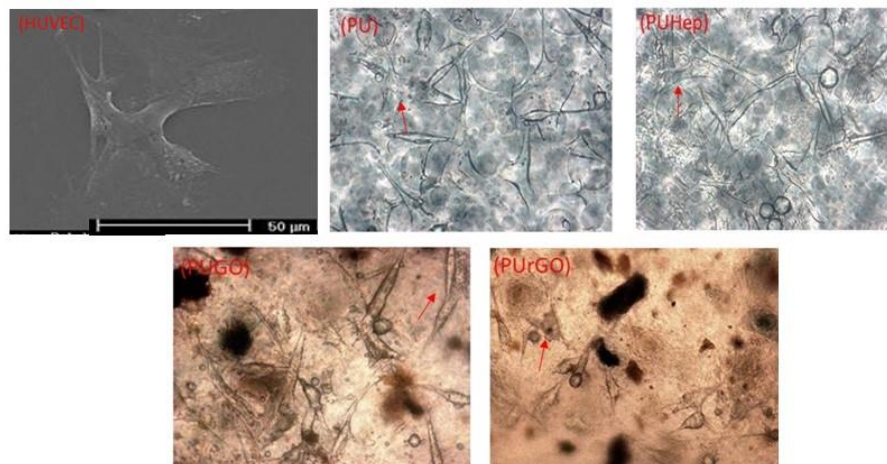
Neste trabalho este parâmetro é de extrema importância visto que o material estará em contato direto com o sangue durante toda a sua vida útil. Portanto, é seguro dizer que os filmes modificados não serão responsáveis pela ruptura dos eritrócitos. Tal característica é fundamental para a aplicação biomédica desejada.

5.3.3. Análise de Biocompatibilidade

Nas imagens apresentadas na Figura 5.15 observa-se a adesão de células em todas as amostras poliméricas. A morfologia das células aderidas se apresentam alongadas, diferentes das células iniciais, sugerindo que as células encontraram dificuldades de ancoramento, isto é, talvez a superfície não seja adequada para a cultura celular.

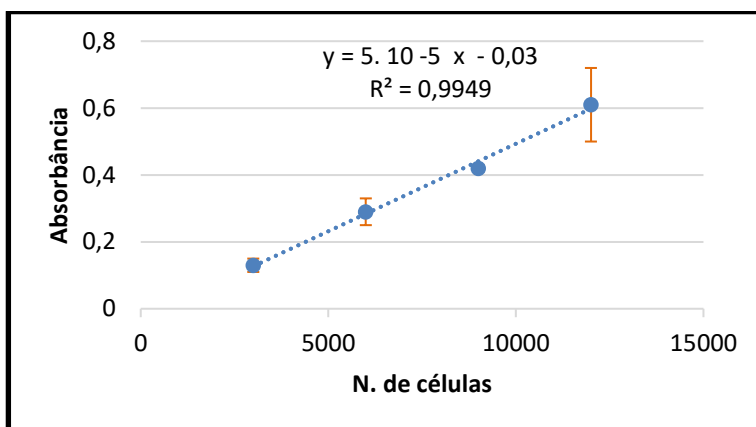
Para quantificar os números de células aderidas foi determinada uma curva padrão de absorvância vs número de células. Na curva ilustrada na Figura 5.16 cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 réplicas. O coeficiente de correlação da reta foi de 0,995, indicando uma resposta linear em absorvância máxima de 490 nm.

Figura 5.15 - Micrografias de: a) célula Huvec na microplaca de cultura (controle positivo), b) PU, c) PU Hep, d) PUGO, e) PUGO cultivadas com células HUVEC demonstram que a morfologia das células está alterada após 24 horas.



Fonte: própria autora.

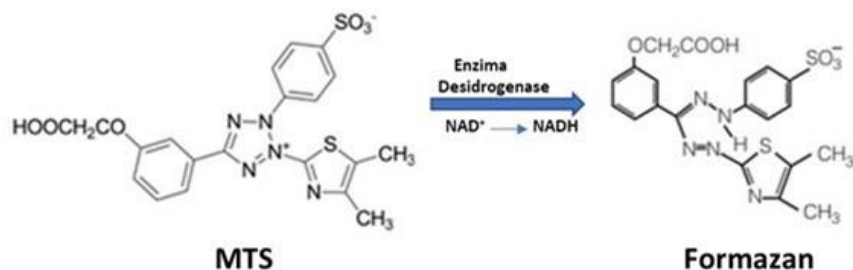
Figura 5.16 - Curva padrão obtida na absorbância de 490 nm.



Fonte: própria autora.

A redução de MTS em formazan solúvel está apresentada na Figura 5.17. O princípio dos ensaios colorimétricos reside no desenvolvimento da cor como resultado da taxa de atividade metabólica das células. Quando um reagente se encontra com as células viáveis, ele é convertido em um produto colorido pela atividade metabólica das células. Essa mudança de cor foi detectada, medida e quantificada por meio de medições espectrofotométricas (absorbância) em comprimento de onda específico de 492 nm. O sinal coletado reflete a população de células viáveis ou a atividade metabólica das células. A absorbância das amostras após os tempos de 24 e 72 horas foram obtidas e pela curva padrão foi determinado o número de células vivas em cultura.

Figura 5.17 - Redução de MTS a um formazan solúvel aquoso através da transferência de elétrons do NADH no citoplasma.



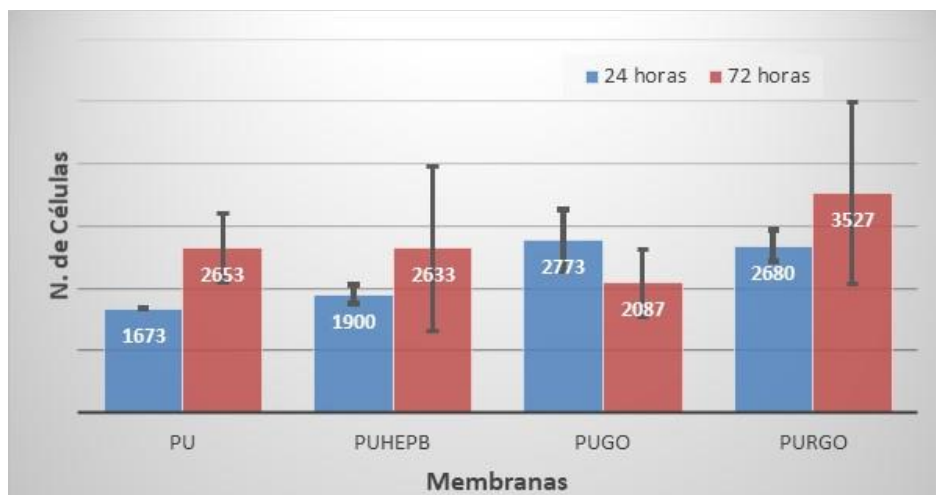
Fonte: própria autora.

A avaliação foi realizada com três réplicas de cada membrana. A Figura 5.18 apresenta a média e o desvio padrão da quantidade de células nas superfícies das réplicas de cada membrana após o tempo de cultivo de 24 e 72 horas.

As amostras de PUGO após 72 horas apresentaram menor número de células aderidas que em 24 horas. Este resultado sugere que pode ter ocorrido uma mudança na atividade metabólica ou algum problema no procedimento.

Em 24 horas de cultivo houve maior proliferação celular nas membranas contendo as nanocargas e, para 72 horas, a membrana de PURGO apresentou maior adesão e proliferação celular.

Figura 5.18 – Número de células aderidas após cultura de 24 e 72 horas.



Fonte: própria autora.

Houve a adesão e proliferação celular antes e após as modificações de superfície. Os resultados, ainda que preliminares sugerem que as membranas não apresentaram citotoxicidade e podem ser consideradas biocompatíveis .

CONCLUSÕES

Nesse projeto foram estudados métodos de modificação de superfícies: a) a membrana de PUHep foi obtida através da imobilização do complexo de heparinato de benzalcônio por via fotoquímica, e b) as membranas de PUGO e PUrGO foram produzidas com a inserção de nanocargas de GO e rGO, reduzido pela heparina.

Foram realizados ensaios físico-químicos de análise termogravimétrica (TGA), espectroscopias Raman e no Infravermelho (FTIR/ATR), mecânicos de tração, de molhabilidade e energia livre de superfície para a caracterização das membranas. As imagens das superfícies foram obtidas por microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e óptica e os ensaios colorimétricos por espectroscopia no ultravioleta. Para avaliar a biocompatibilidade, foram executados os ensaios de adesão de plaquetas na superfície das membranas. Através da atividade hemolítica foi verificada o índice hemolítico e, pelos ensaios de adesão e proliferação celular, a citotoxicidade.

A redução do óxido de grafeno com a heparina pode ser observada pelo termograma do TGA, onde se verificou que houve mais perda de grupos oxigenados que estavam presentes na estrutura original do GO. A espectroscopia Raman mostrou que houve a redução do GO pela diminuição da intensidade da banda D no espectro e através da razão entre a intensidades das bandas D vs G (I_D/I_G). O aumento nos valores relativos de I_D/I_G do rGO indicou a formação de mais defeitos estruturais devido à eliminação de grupos de oxigênio, o que confirma a capacidade de desoxidação da heparina no GO. Pode-se observar também que o deslocamento da banda G do rGO indica a eficiência da redução do GO. Os espectros de FTIR do rGO comparados com o GO confirmaram que algumas das funcionalidades do oxigênio foram removidas do GO pela heparina. Estes resultados sugerem que a heparina está presente na superfície do rGO.

No ensaio mecânico de tração, verificou-se que houve uma melhora das propriedades mecânicas com o aumento das nanocargas nos nanocompósitos em relação ao PU puro, possivelmente resultante do fato de que o GO e o rGO aumentam a densidade de ancoramento. A variação da resistência à tração ocorreu nas membranas dos nanocompósitos de PU com GO e rGO, sendo que, as membranas de PUrGO tiveram maior tensão para uma mesma deformação de 500%. Nos

nanocompósitos, a tensão à ruptura aumentou com o incremento da quantidade de carga. Em 100%, o PUrGO 0,2% apresentou um valor de módulo de Young de 16,41% maior que o PU e, em 200%, cerca de 12,26% maior que o PU.

Os ângulos de contato diminuíram nas membranas tratadas com heparinato de benzalcônio de 88° para 65,1°. Essas membranas mostraram caráter mais hidrofílico devido à presença da heparina, que é um mucopolissacarídeo aniônico com grande quantidade de grupos HSO³⁻. Resultados obtidos para a energia livre de superfície mostraram um aumento das interações polares em todas as amostras tratadas. Essa diminuição nos ângulos de contato pode representar uma medida indireta da extensão da mudança estrutural. Uma maior hidrofiliabilidade sugere que haverá menor adsorção de plaquetas, aumentando assim a hemocompatibilidade da superfície de PU tratadas com heparinato de benzalcônio por fotoenxertia.

Com a adição de GO nos PUs, os ângulos de contato aumentaram com maiores concentrações de nanopartículas. Nos tratamentos com a adição de rGO, as superfícies se tornaram mais hidrofóbicas (na concentração de 0,2%, o ângulo de contato aumentou de 88° para 97°). O aumento esperado na hidrofobicidade pode ser atribuído à maior ausência de grupos polares do rGO. O ângulo de contato da membrana contendo GO foi menor quando comparado ao da membrana de rGO devido à maior presença de grupos oxigenados em sua estrutura. Com o aumento do ângulo de contato houve uma diminuição na energia livre de superfície e em todos os tratamentos as interações polares mostraram-se maiores que as interações dispersivas.

No tratamento por fotoenxertia por UV, o aumento da hidrofiliabilidade sugere menor possibilidade de adsorção de plaquetas, aumentando assim a hemocompatibilidade da superfície da PU. O ensaio de FTIR-ATR nas membranas de PUHepB mostrou que houve modificações na superfície com a presença de heparina, onde se observam variações características de ligações de S=O, uma banda de forte intensidade proveniente do estiramento simétrico referente à sulfonamida.

A biocompatibilidade das membranas tratadas foi avaliada através da adesão plaquetária, hemólise e citotoxicidade e os resultados comparados ao poliuretano de grau médico utilizado nos dispositivos cardiovasculares, como por exemplo o Dispositivo de Assistência Ventricular INCOR.

As membranas de PUHepB parecem ter menor potencial de trombogenicidade do que o poliuretano de grau médico devido à menor adesão de plaquetas. Não foi observada hemólise nas membranas avaliadas, tendo a membrana de PUrGO apresentado o menor índice hemolítico. As membranas mostraram-se biocompatíveis não sendo observada citotoxicidade.

Os resultados obtidos neste trabalho são preliminares e novos estudos são necessários para avaliar as características físico-químicas dos materiais e a interação do sangue com superfícies sintéticas, especialmente considerando-se os mecanismos de coagulação em períodos prolongados.

REFERÊNCIAS

1. Cestari VRF, Garces TS, Sousa GJB, Maranhão TA, Souza JD, Pereira MLD, et al. Distribuição Espacial de Mortalidade por Insuficiência Cardíaca no Brasil, 1996-2017. *Arq Bras Cardiol.* 2021 Nov;118:41–51.
2. Vilmeyze Larissa de Arruda , Lúbia Maieles Gomes Machado, Jaqueline Costa Lima Silva PR de S. Tendência da mortalidade por insuficiência cardíaca no Brasil : 1998 a 2019. *Arq Bras Cardiol.* 2022;118:41–5.
3. Kubrusly LF. Ventricular Assist Devices: an Evolving Field. *Brazilian J Cardiovasc Surg [online].* 2019;v.34(1):III–V.
4. Han J, Trumble DR. Cardiac assist devices: Early concepts, current technologies, and future innovations. *Bioengineering.* 2019;6(1).
5. Potapov E V., Loforte A, Weng Y, Jurmann M, Pasic M, Drews T, et al. Experience with over 1000 implanted ventricular assist devices. *J Card Surg.* 2008;23(3):185–94.
6. Lala A, Rowland JC, Ferket BS et al. Strategies of Wait-listing for Heart Transplant vs Durable Mechanical Circulatory Support Alone for Patients With Advanced Heart Failure. *JAMA Cardiol.* 2020;5(6):652–659.
7. Sefton M V., Sperling C, Maitz MF, Werner C. The blood compatibility challenge: Editorial introduction. *Acta Biomater [Internet].* 2019;94(June):1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.041>
8. Maitz MF, Martins MCL, Grabow N, Matschegewski C, Huang N, Chaikof EL, et al. The blood compatibility challenge. Part 4: Surface modification for hemocompatible materials: Passive and active approaches to guide blood-material interactions. *Acta Biomater.* 2019;94:33–43.
9. Ratner BD, Horbett TA, Wagner WR. Evaluation of Blood–Materials Interactions. Fourth Edi. *Biomaterials Science.* Elsevier; 2020. 879–898 p.
10. Kamkar S, Mohammadi M, Karimi M, Salehi M. Electrochemical and biological properties of mono- and bilayer nitride coatings deposited on Ti–6%Al–4%V alloy. *Mater Chem Phys.* 2022;286(November 2021).
11. Hauert R, Thorwarth K, Thorwarth G. An overview on diamond-like carbon coatings in medical applications. *Surf Coatings Technol.* 2013;233:119–30.
12. Goda T, Ishihara K, Miyahara Y. Critical update on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer science. Vol. 132, *Journal of Applied Polymer Science.* 2015.
13. Qi P, Maitz MF, Huang N. Surface modification of cardiovascular materials and implants. *Surf Coatings Technol.* 2013;233:80–90.
14. Jaffer IH, Weitz JI. The blood compatibility challenge. Part 1: Blood-contacting medical devices: The scope of the problem. *Acta Biomater [Internet].* 2019;94:2–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.021>
15. Biran R, Pond D. Heparin coatings for improving blood compatibility of medical devices. *Adv Drug Deliv Rev [Internet].* 2017;112:12–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.12.002>
16. Dong-Choon Sin, Ho-Lun Kei XM. Surface Coatings for Ventricular Assist Devices Dong-Choon. *J Expert Rev Med Devices.* 2009;12(November):1–17.
17. Arkowski J, Obremaska M, Kędzierski K, Sławuta A, Wawrzyńska M. Applications for graphene and its derivatives in medical devices : Current knowledge and future applications. 2020;
18. Hoseini-Ghahfarokhi M, Mirkiani S, Mozaffari N, Abdollahi Sadatlu MA, Ghasemi A, Abbaspour S, et al. Applications of graphene and graphene oxide in smart drug/gene delivery: Is the world still flat? *Int J Nanomedicine.* 2020;15:9469–96.
19. ISO. 10993-4. Biological evaluation of medical devices, Part 4: Selection of tests for interactions with blood, 2017.
20. Filho AB. Dispositivos De Assistência Circulatória: Passado, Presente E Futuro. *Brazilian J*

Cardiovasc Surg [Internet]. 2020;4. Available from: <https://blog.bjcv.org/single-post/2020/07/23/dispositivos-de-assistencia-circulatoria-passado-presente-e-futuro/#:~:text=Os dispositivos de assistência circulatória consistem em bombas mecânicas produzidas,cavidade cardíaca%3B qual dos ventrículos>

21. Galantier J, Moreira LFP, Benício A, Leirner AA, Cestari I, Bocchi EA, et al. Desempenho hemodinâmico e resposta inflamatória durante o uso do DAV-InCor como ponte para o transplante. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(5):327–34.
22. Cestari IA, Mazzetto M, Oyama HTT, Bacht S, Jatene MB, Cestari IN, et al. Design and hydrodynamic performance of a pediatric pulsatile pump. In: *IFMBE Proceedings.* 2019.
23. Williams, David and Zhang, Xingdong D of biomaterials for the twenty-first century. Ed. 2019., editor. *Biomaterials and biomedical materials.* In: *Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century.* 1 st. Elsevier; 2019. p. 15–23.
24. Silva MHP. Apostila de Biomateirias [Internet]. 2012. p.1- 80, (Publicação Técnica). Disp. em: <http://ftp.demec.ufpr.br/disciplinas/EME715/AT2021/ApostilaBiomateriais.pdf>.
25. Maryam Rahmati MM. Biocompatibility of alumina-based biomaterials—A review. *J Cell Physiology.* 2019;234(4):3321–35.
26. Rahmati M, Mozafari M. Biological response to carbon-family nanomaterials: Interactions at the nano-bio interface. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(JAN):1–22.
27. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. Third Edit. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition.* Elsevier; 2013. xxv–xxxix.
28. Sotiri I, Robichaud M, Lee D, Braune S, Gorbet M, Ratner BD, et al. BloodSurf 2017: News from the blood-biomaterial frontier. *Acta Biomater.* 2019;87:55–60.
29. Braune S, Latour RA, Reinthaler M, Landmesser U, Lendlein A, Jung F. In Vitro Thrombogenicity Testing of Biomaterials. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(21).
30. Reviakine I, Jung F, Braune S, Brash JL, Latour R, Gorbet M, et al. Stirred, shaken, or stagnant: What goes on at the blood–biomaterial interface. *Blood Rev.* 2017;31(1):11–21.
31. Liu X, Yuan L, Li D, Tang Z, Wang Y, Chen G, et al. Blood compatible materials: State of the art. *J Mater Chem B.* 2014;2(35):5718–38.
32. Ferreira CN, Sousa M de O, Dusse LMS, Carvalho M das G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações A cell-based model of coagulation and its implications *REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA.* *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(5):416–21.
33. RODRIGUES E. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. *Rev da Univ Val do Rio Verde.* 2012;10(1):218–33.
34. Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet.* 2000;355(8):1627–32.
35. Deepika N, Sarod SR. Devices, In vitro models for thrombogenicity testing of blood-recirculating medical. *Expert Rev Med Devices.* 2019;16(7):603–16.
36. Hedayati M, Neufeld MJ, Reynolds MM, Kipper MJ. The quest for blood-compatible materials: Recent advances and future technologies. *Mater Sci Eng R Reports.* 2019;138(May):118–52.
37. Vroman L. When blood is touched. *Materials (Basel).* 2009;2(4):1547–57.
38. Coglitore D, Janot JM, Balme S. Protein at liquid solid interfaces: Toward a new paradigm to change the approach to design hybrid protein/solid-state materials. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019;270:278–92.
39. Wang X. Overview on Biocompatibilities of Implantable Biomaterials. *Adv Biomater Sci Biomed Appl.* 2013;
40. Zia F, Zia KM, Zuber M, Tabasum S, Rehman S. Heparin based polyurethanes: A state-of-the-art review. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2016;84:101–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.004>

41. Yang J, Lv J, Gao B, Zhang L, Yang D, Shi C, et al. Modification of polycarbonateurethane surface with poly (ethylene glycol) monoacrylate and phosphorylcholine glyceraldehyde for anti-platelet adhesion. *Front Chem Sci Eng*. 2014;8(2):188–96.
42. Gott, V.I., Whiffen, J.D., Dutton RC. Heparin bonding on colloidal graphite surfaces. *Science* (80-). 1963;142:1297–8.
43. Qiu H, Qi P, Liu J, Yang Y, Tan X, Xiao Y, et al. Biomimetic engineering endothelium-like coating on cardiovascular stent through heparin and nitric oxide-generating compound synergistic modification strategy. *Biomaterials* [Internet]. 2019;207(November 2018):10–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.033>
44. Zapanta CM, Griffith JW, Hess GD, Doxtater BJ, Khalapyan T, Pae WE, et al. Microtextured materials for circulatory support devices: Preliminary studies. *ASAIO J*. 2006;52(1):17–23.
45. Butruk-Raszeja B, Trzaskowski M, Ciach T. Cell membrane-mimicking coating for blood-contacting polyurethanes. *J Biomater Appl*. 2015;29(6):801–12.
46. Adipurnama I, Yang MC, Ciach T, Butruk-Raszeja B. Surface modification and endothelialization of polyurethane for vascular tissue engineering applications: A review. *Biomater Sci*. 2017;5(1):22–37.
47. Sefton M, Gemmell C GM. Nonthrombogenic Treatments and Strategies. In: *Biomaterials Science - Chapter II52*. 2012. p. 1488–509.
48. Yii M, Gourlay T, Fleming J, Matata B, Taylor KM. Evaluation of Carmeda® Bioactive Surface (CBAS®), Duraflo II and a novel nonspecific protease-modified surface using a new in vitro model simulating cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 1996;11(3):229–40.
49. Alves P, Cardoso R, Correia TR, Antunes BP, Correia IJ, Ferreira P. Surface modification of polyurethane films by plasma and ultraviolet light to improve haemocompatibility for artificial heart valves. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2014;113:25–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.039>
50. Hasirci N, Ayse Aksoy E. Synthesis and modifications of polyurethanes for biomedical purposes. *High Perform Polym*. 2007;19(5):621–37.
51. He D, Susanto H, Ulbricht M. Photo-irradiation for preparation, modification and stimulation of polymeric membranes. *Prog Polym Sci*. 2009;34(1):62–98.
52. Janorkar AV, Proulx SE, Metters AT H DE. Surface-confined photopolymerization of single- and mixed-monomer systems to tailor the wettability of poly(L-lactide) film.pdf. 2006;44(22):6534–43.
53. Zhu S, Hirt DE. Improving the Wettability of Deep-Groove Polypropylene Fibers by Photografting. *Text Res J*. 2009;79(6):534–47.
54. Suri S, Singh A SC. Photofunctionalization of materials to promote protein and cell interactions for tissue-engineering application. In: David A. Puleo RB, editor. *Biological Interactions on materials surfaces: Understanding and controlling protein, cell and tissue responses*. New York: SpringerDordrecht Heidelberg London New York; 2009. p. 297–318.
55. Delaittre G, Goldmann AS, Mueller JO, Barner-Kowollik C. Efficient Photochemical Approaches for Spatially Resolved Surface Functionalization. *Angew Chemie - Int Ed*. 2015;54(39):11388–403.
56. Susanto H, Ulbricht M. Photografted Thin Polymer Hydrogel Layers on PES Ultrafiltration Membranes: Characterization, Stability, and Influence on Separation Performance. 2007;(2):7818–30.
57. Linhardt R, Murugesan S, Xie J. Immobilization of Heparin: Approaches and Applications. *Curr Top Med Chem*. 2008;8(2):80–100.
58. Akindoyo JO, Beg MDH, Ghazali S, Islam MR, Jeyaratnam N, Yuvaraj AR. Polyurethane types, synthesis and applications-a review. *RSC Adv*. 2016;6(115):114453–82.
59. Gostev AA, Karpenko AA, Laktionov PP. Polyurethanes in cardiovascular prosthetics. *Polym Bull* [Internet]. 2018;(May). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2266-x>

60. Bagdi K, Molnár K, Sajó I, Pukánszky B. Specific interactions, structure and properties in segmented polyurethane elastomers. *Express Polym Lett.* 2011;5(5):417–27.
61. Wendels S, Avérous L. Biobased polyurethanes for biomedical applications. *Bioact Mater.* 2021;6(4):1083–106.
62. Boffito M, Meglio F Di, Mozetic P, Giannitelli SM, Carmagnola I, Castaldo C, et al. Surface functionalization of polyurethane scaffolds mimicking the myocardial microenvironment to support cardiac primitive cells. Vol. 13, *PLoS ONE.* 2018.
63. Chandy T, Van Hee J, Nettekoven W, Johnson J. Long-term in vitro stability assessment of polycarbonate urethane micro catheters: Resistance to oxidation and stress cracking. Vol. 89, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials.* 2009. p. 314–24.
64. Lima M, Rudd T, Yates E. New applications of heparin and other glycosaminoglycans. Vol. 22, *Molecules.* 2017.
65. Melo EI, Pereira MS, Cunha RS, Sá MPL de, Mourão PAS. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2008;23(2):169–74.
66. He C, Ji H, Qian Y, Wang Q, Liu X, Zhao W, et al. Heparin-based and heparin-inspired hydrogels: size-effect, gelation and biomedical applications. *J Mater Chem B.* 2019;7(8):1186–208.
67. Liu XY, Zhang CC, Xu WL, Ouyang C xi. Controlled release of heparin from blended polyurethane and silk fibroin film. *Mater Lett.* 2009;63(2):263–5.
68. Sakiyama-Elbert SE. Incorporation of heparin into biomaterials. *Acta Biomater.* 2014;10(4):1581–7.
69. Chung C, Kim YK, Shin D, Ryoo SR, Hong BH, Min DH. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. Vol. 46, *Accounts of Chemical Research.* 2013. p. 2211–24.
70. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Sbricoli L, Gobbato L, Ludovichetti FS, et al. Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment. *J Transl Med.* 2014;12(1).
71. Wu S, Zhao X, Cui Z, Zhao C, Wang Y, Du L, et al. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene oxide loaded with doxorubicin on human multiple myeloma cells. Vol. 9, *International Journal of Nanomedicine.* 2014. p. 1413–21.
72. Wu SY, An SSA, Hulme J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:9–24.
73. Maestrelli LMD, Oyama HTT, Muñoz PAR, Cestari IA, Fechine GJM. Role of graphene oxide on the mechanical behaviour of polycarbonate-urethane/ graphene oxide composites. *Mater Res.* 2021;24(3).
74. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev.* 2010;39(1):228–40.
75. Bai H, Li C, Shi G. Functional Composite Materials Based on Chemically Converted Graphene. 2011;1089–115.
76. Fernández-Merino MJ, Guardia L, Paredes JI, Villar-Rodil S, Solís-Fernández P, Martínez-Alonso A, et al. Vitamin C is an ideal substitute for hydrazine in the reduction of graphene oxide suspensions. *J Phys Chem C.* 2010;114(14):6426–32.
77. Lee DY, Khatun Z, Lee JH, Lee YK, In I. Blood compatible graphene/heparin conjugate through noncovalent chemistry. *Biomacromolecules.* 2011;12(2):336–41.
78. Rhazouani A, Gamrani H, Achaby M El, Aziz K, Gebrati L, Uddin S, et al. Review Article Synthesis and Toxicity of Graphene Oxide Nanoparticles : A Literature Review of In Vitro and In Vivo Studies. 2021;2021.
79. Pereira BMP, Tagkopoulos I. Benzalkonium chlorides: Uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(13):1–13.
80. Verdejo R, Bernal MM, Romasanta LJ, Lopez-manchado MA. Graphene filled polymer nanocomposites †. 2011;3301–10.

81. Nanocomposites G, Galpaya D, Wang M, Liu M, Motta N, Waclawik E, et al. Recent Advances in Fabrication and Characterization of. 2012;2012(October):30–49.
82. Wang Y, Zhang P, Fang Liu C, Zhan L, Fang Li Y, Huang CZ. Green and easy synthesis of biocompatible graphene for use as an anticoagulant. *RSC Adv.* 2012;2(6):2322–8.
83. Pradhan S, Rajamani S, Agrawal G, Dash M, Samal SK. NMR, FT-IR and raman characterization of biomaterials [Internet]. *Characterization of Polymeric Biomaterials.* Elsevier Ltd.; 2017. 147–173 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00007-8>
84. Harada NS, Oyama HT, Bártoli JR, Gouvêa D, Cestari IA, Wang SH. Quantifying adsorption of heparin on a PVC substrate using ATR-FTIR. *Polym Int.* 2005;54(1).
85. Young T. An Essay on The Cohesion of Fluids. *Phil Trans R Soc.* 1805;95:65–87.
86. Ren Z, Chen G, Wei Z, Sang L, Qi M. Hemocompatibility evaluation of polyurethane film with surface-grafted poly(ethylene glycol) and carboxymethyl-chitosan. Vol. 127, *Journal of Applied Polymer Science.* 2013. p. 308–15.
87. Kozbial A, Li Z, Conaway C, McGinley R, Dhingra S, Vahdat V, et al. Study on the surface energy of graphene by contact angle measurements. *Langmuir.* 2014;30(28):8598–606.
88. Rudawska A, Jacniacka E. Analysis for determining surface free energy uncertainty by the Owen-Wendt method. *Int J Adhes Adhes.* 2009;29(4):451–7.
89. Smith PK, Mallia AK, Hermanson GT. Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations. *Anal Biochem.* 1980;109(2):466–73.
90. Bae JS, Seo EJ, Kang IK. Synthesis and characterization of heparinized polyurethanes using plasma glow discharge. *Biomaterials.* 1999;20(6):529–37.
91. ISO 10993-1- 2009 (E) Biological evaluation of medical devices —Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. 2009;
92. ASTM F 756-00. Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials. Philadelphia. *Am Soc Test Mater.* 2000;(January):5.
93. F619.14 A. Standard Practice Extraction of Medical Plastics. 2014;d:1–5.
94. Standard I. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009;2009.
95. Eslin Ustun Karatop CE, Aksu C e AM. IntechOpen.
96. Andrade C. S. Síntese Controlada De Óxido De Grafeno Obtida Em Reator De Bancada. 2020.
97. Park S, Dikin DA, Nguyen ST, Ruoff RS. Graphene Oxide Sheets Chemically Cross-Linked by Polyallylamine. 2009;6–9.
98. Park S, Ruoff RS. Chemical methods for the production of graphenes. *Nat Nanotechnol* [Internet]. 2009;4(march):45–7. Available from: www.nature.nanotechnology
99. Costinas C, Salagean CA, Cotet LC, Baia M, Todea M, Magyari K, et al. Insights into the Stability of Graphene Oxide Aqueous Dispersions. 2022;
100. Kumar N, Setshedi K, Masukume M, Sinha S. Facile scalable synthesis of graphene oxide and reduced graphene oxide : comparative investigation of different reduction methods. 2022;1031–46.
101. Kim S, Zhou S, Hu Y, Acik M, Chabal YJ, Berger C, et al. Room-temperature metastability of multilayer graphene oxide films. 2012;11(May).
102. Domingues SH. Filmes Finos, Transparentes E Condutores Baseados Em Grafeno. 2013.
103. Eipa VYR. Structural Analysis of Heparin by Raman Spectroscopy. 1996;85(1):52–6.
104. Choi WS, Choi SH, Hong B, Lim DG, Yang KJ, Lee JH. Effect of hydrogen plasma pretreatment on growth of carbon nanotubes by MPECVD. *Mater Sci Eng C.* 2006;26(5–7):1211–4.
105. Strankowski M, Włodarczyk D, Piszczyk Ł, Strankowska J. Polyurethane Nanocomposites Containing Reduced Graphene Oxide, FTIR, Raman, and XRD Studies. *J Spectrosc.* 2016;2016.

106. Fang M, Wang K, Lu H, Yang Y, Nutt S. Covalent polymer functionalization of graphene nanosheets and mechanical properties of composites. *19(2009):7098–105.*
107. Biniak S, Ko L. Chemical and structural properties of reduced graphene oxide — dependence on the reducing agent. *2021;3738–54.*
108. Grant D, Long WF, Moffat CF, Williamson FB. Infrared spectroscopy of chemically modified heparins. *1989;261:1035–8.*
109. Cheng C, Li S, Nie S, Zhao W, Yang H, Sun S, et al. General and Biomimetic Approach to Biopolymer-Functionalized Graphene Oxide Nanosheet through Adhesive Dopamine. *2012;*
110. Joshi M, Adak B, Butola BS. Progress in Materials Science Polyurethane nanocomposite based gas barrier films, membranes and coatings: A review on synthesis, characterization and potential applications , membranes and coatings : A review on synthesis , characterization and potential . *2018;97(December 2017):230–82.*
111. Pokharel P, Choi S, Lee DS. The effect of hard segment length on the thermal and mechanical properties of polyurethane/graphene oxide nanocomposites. *Compos Part A Appl Sci Manuf. 2015;69:168–77.*
112. Wang X, Hu Y, Song L, Yang H, Xing W LH. No In situ polymerization of graphene nanosheets and polyurethane with enhanced mechanical and thermal properties. *J Mater Chem. 2011;21:4222–7.*
113. Fu W, Wang L, Huang Z, Huang X, Su Z, Liang Y, et al. Comparison of Effects of Different Sacrificial Hydrogen Bonds on Performance of Polyurethane/Graphene Oxide Membrane. *Membranes (Basel). 2022;12(5).*
114. Strankowski M, Korzeniewski P, Strankowska J, Anu AS, Thomas S. Morphology, mechanical and thermal properties of thermoplastic polyurethane containing reduced graphene oxide and graphene nanoplatelets. *Materials (Basel). 2018;11(1).*
115. Liang J, Huang Y, Zhang L, Wang Y, Ma Y, Cuo T, et al. Molecular-level dispersion of graphene into poly(vinyl alcohol) and effective reinforcement of their nanocomposites. *Adv Funct Mater. 2009;19(14):2297–302.*
116. Cai D, Yusoh K, Song M. The mechanical properties and morphology of a graphite oxide nanoplatelet/polyurethane composite. *Nanotechnology. 2009;20(8).*
117. Lia J, , Guoping Zhang LD, Zhaoa S, Gaoa Y, Jianga K, Rong Sun CW. In situ polymerization and mechanical reinforced, thermal healable graphene oxide/polyurethane composites based on Diels-Alder chemistry. *J Mater Chem A. 2012;2019-Novem.*
118. Yadav SK, Cho JW. Functionalized graphene nanoplatelets for enhanced mechanical and thermal properties of polyurethane nanocomposites. *Appl Surf Sci. 2013;266:360–7.*
119. Weathersby PK. Adsorption of proteins from plasma to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers. I. Analysis with the. *J Biomed Mater Res. 1981;15:403–23.*
120. Junkar I. Interaction of cells and platelets with biomaterial surfaces treated with gaseous plasma. *Adv Biomembr Lipid Self-Assembly. 2016;23:25–59.*
121. Noh H, Vogler EA. Volumetric interpretation of protein adsorption : Mass and energy balance for albumin adsorption to particulate adsorbents with incrementally increasing hydrophilicity. *2006;27:5801–12.*
122. Luan Y, Li D, Wang Y, Liu X, Brash JL, Chen H. I - Radiolabeling, Surface Plasmon Resonance, and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation: Three Tools to Compare Protein Adsorption on Surfaces of Di f f erent Wettability *125. 2014;*
123. Amani H, Arzaghi H, Bayandori M, Dezfuli AS, Pazoki-Toroudi H, Shafiee A, et al. Controlling Cell Behavior through the Design of Biomaterial Surfaces: A Focus on Surface Modification Techniques. *Adv Mater Interfaces. 2019;6(13):1–30.*
124. Arima Y, Å HI. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *2007;28:3074–82.*
125. Deppisch R, Storr M, Buck R, Göhl H. Blood material interactions at the surfaces of membranes

- in medical applications. *Sep Purif Technol.* 1998;14(1–3):241–54.
126. Menzies KL, Jones L. The Impact of Contact Angle on the. 2010;87(6):387–99.
 127. Wan GJ, Huang N, Yang P, Fu RKY, Ho JPY, Xie X, et al. Platelet activation behavior on nitrogen plasma-implanted silicon. *Mater Sci Eng C.* 2007;27(4):928–32.
 128. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz ÁS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mater Res.* 2003;6(3):317–20.
 129. Lee JH, Lee HB. Platelet adhesion onto wettability gradient surfaces in the absence and presence of plasma proteins. 1997;
 130. Fujimoto K, Tadokoro H, Ueda Y, Ikada Y. Polyurethane surface modification by graft polymerization of acrylamide for reduced protein adsorption and platelet adhesion. 1993;14(6):442–8.
 131. Surface molecular mobility and platelet reactivity of segmented poly (etherurethaneureas) with hydrophilic and hydrophobic soft segment components. 1989;1(1):1989.
 132. Qian Q, Nath KA, Wu Y, Daoud TM. Hemolysis and Acute Kidney Failure. 2010;56(4):780–4.

Agradecimentos

A FINEP (1253), CNPQ (380312/2022-0) pelo suporte financeiro, a Divisão de Bioengenharia pela oportunidade de desenvolver este trabalho, ao Instituto Mackgraphe - Mackenzie pela doação do óxido de grafeno e ao Grupo Adeste pelo fornecimento da heparina sódica.

Anexo 1- Aprovação da CEUA



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 19/05/2021 **APROVOU** o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **180/11** intitulado “**Avaliação Experimental Crônica em Ovelhas do Dispositivo de Assistência Ventricular Pediátrico InCor**” apresentado pela Comissão Científica do InCor.

- **Utilização de sangue** do protocolo 1144/2018 já aprovado por esta CEUA, para a avaliação da trombogenicidade de materiais poliméricos após tratamento de superfície.

Pesquisador Responsável: **Idágene A. Cestari**

CEUA-FMUSP, 19 de maio de 2021

ANEXO 2: Número de onda correspondentes a ligações químicas

NÚMERO DE ONDA	LIGAÇÃO CORRESPONDENTE
604,76 - 613,36	C-X (X = halogênio): Para esta faixa, o halogênio encontrado é o Cloro
697,36 – 755,9	Anel aromático: deformação angular de 5H adjacentes (anéis monossustituídos)
719,75	Deformação angular de $-(CH_2)_n$ para $n > 3$
726,09	Ligação $-CH=CH-$ fora do plano
728,88 - 729,19	C-H fora do plano
793,52	$R_2C=CH_2$ com C-H fora do plano
811,24	$R_2C=CH_2$ fora do plano
874,01	Anel aromático com 2H adjacentes (anéis pára-sustituídos)
916,75	Ligação O-H: deformação angular fora do plano da ligação C=O de ácidos carboxílicos
964,2 - 966,24	Ligação $-CH=CH-$
1091,49	Ligação C-O de álcoois e fenóis (álcool terciário)
1095,79 - 1172,91	Ligação C-O de álcoois e fenóis: álcool terciário
1237,82	Ligação C-O de ésteres saturados
1371,12 – 1377,19	deformação angular de CH_3
1458,12 - 1463,92	Deformação angular de $-(CH_2)_n$
1492,85 – 1583,15	C=C de aromáticos: vibrações de núcleos aromáticos
1577,83 - 1613,71	NH ₂
1639,21	C=O de amidas
1716,94	Ligação C=O de cetonas: acíclicas (dialquil-cetonas)
1733,47	C=O de aldeídos: absorção sujeita a efeitos de conjugação e de efeito indutivo
1950,25 - 1954,99	Ligação C=C=C (alenos): duas bandas para alenos terminais ou ligados a grupos de efeito -I
2111,24	Ligação C-H de alcinos
2849,9	C-H alifáticos: carbonos primários e secundários
2850,91	C-H alifático: carbono terciário
2890,27 – 2962,34	Ligação C-H alifáticos: carbonos primário e secundários

3001,13	Ligação de hidrogênio intramolecular com C=O e NO ₂ .
3024,81	Ligação C-H de aromáticos
3053 – 3081,78	Ligação C-H de alcenos
3301,37	Ligação C-H de alcinos
3412,53	Ligação O-H associado (resultante de associações poliméricas)
3431,94	Ligação O-H associado resultante de associação polimérica
3550,31 – 3551,33	Ligação O-H associado (resultante de ligações diméricas)
3629,63	Ligação O-H livre