UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA

Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia

Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências

Dissertação de Mestrado

PROPRIEDADES HEMOCOMPATIVEIS DO DENDRIMERO BIOATIVO DE POLIGLICEROL CONJUGADO COM ESTREPTOQUINASE

Janderson Freitas Leite

Orientador: Prof. Dr. Álvaro António Alencar de Queiroz

Itajubá, dezembro de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia
Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências

Dissertação de Mestrado

PROPRIEDADES HEMOCOMPATIVEIS DO DENDRIMERO BIOATIVO DE POLIGLICEROL CONJUGADO COM ESTREPTOQUINASE

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Universidade Federal de Itajuba (UNIFEI), como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências dos Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Biomateriais.

Orientador: Prof. Dr, Álvaro António Alencar de Queiroz

Itajubá, dezembro de 2008.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá –
Bibliotecária Margareth Ribeiro- CRB_6/1700

L533p

Leite, Jandervon Freitas
Propriedades hemocompatíveis do dendrímero bioativo de poliglicerol conjugado com estreptoquinase / Jandervon Freitas Leite. -- Itajubá,(MG) : [s.n.], 2008.
108 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Hemocompatíveis. 2. Dendrímero. 3. Poliglicerol. 4. Estreptoquinase. I. Queiroz, Alvaro Antonio Alencar de, orient. II. Universidade Federal de Itajubá. III. Título.

CDU 66.095.26(043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA
Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia
Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências

PROPRIEDADES HEMOCOMPATIVEIS DO DENDRIMERO BIOATIVO DE POLIGLICEROL CONJUGADO COM ESTREPTOQUINASE

Janderson Freitas Leite

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências dos Materiais para Engenharia.

Aprovada por:

Prof. Dr. Álvaro António Alencar de Queiroz - Orientador

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek

Profa. Dra. Maria Elena Leyva Gonzales

Itajubá, dezembro de 2008.

O conhecimento não é propriedade de ninguém!

Agradecimentos

À Deus, que com sua imensa misericórdia, me deu forças para vencer todos os obstáculos e sempre colocou a meu lado pessoas espetaculares que me ajudaram em mais essa vitória.

Ao professor Dr. Álvaro António Alencar de Queiroz, pessoa extraordinária, de imensa sabedoria, que sempre me apoiou em todos os momentos. Exemplo de caráter. brilhantismo e dedicação, por sua orientação académica amizade, paciência e por dividir comigo essa jornada.

À minha iàmília que sempre me deu carinho e amor incondicional: Minha esposa Pollyanna meu filho Nathan, meu pai Jomar, minha mãe Angela e meus amados irmãos Joelson e Jobson.

Aos professores do curso de mestrado em Materiais para Engenharia pelo desenvolvimento do meu conhecimento científico, em especial Dr. Demétrio Artur Werner Soares pelo voto de confiança

Ao professor Dr. Júlio San Román e à professora Dra. Maria Rosa Aguilar do Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Tecnológicas/Instituto de Ciência y Tecnologia de Polímeros. Madrid, Espana, por prover condições para que esta pesquisa fosse realizada

Ao Dr. Gustavo Abraham (Instituto de Tecnologia de Materiales/INTEMA, Argentina) pelas sugestões e esclarecedoras discussões.

Aos funcionários da secretaria do ICE/UNIFEI, em especial tis Roseli e Matilde. Às funcionárias da PPG/IJNIFEI, em esjDecial à Maria Auta. Ao Glauber, técnico responsável pelo Laboratório Didático de Química da IJNIFEI. Aos meus queridos amigos.

Aos colegas do curso de mestrado em Materiais para Engenharia, em especial Alexandra, que se tomou uma grande amiga

Ao colega Wagner, pela ajuda no Laboratório de Medidas Elétricas da UNIFEI.

Uma parte desta pesquisa foi suportada pela red CYTED (Ciência y Tecnologia para el Desarrollo, Jornada VIII.J. Biomateriales para Ia salud) e IPEN/USP. Agradecemos a estas instituições nas pessoas de Dr. Roberto Sastre e Dra Oíga Zazuco Miga.

Enfim, a todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Nesse trabalho, sintetizou-se um poliglicerol com estrutura de dendrímero via policondensação em etapas do tipo divergente. Desprotonando o glicidol e utilizando um núcleo oligomérico de poliglicerol, uma estrutura arborescente com dispersão na massa molecular (Mw/M_n) igual a 1,05 foi obtida. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ('H) e carbono (^{13}C) indicaram um grau de ramificação de 0,85, característica da estrutura de um dendrímero. A temperatura de transição vítrea (Tg) determinada pela calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi de -20,2 °C, indicando que a macromolécula possui as características físics adequadas para sua aplicação como revestimento de superfícies sintéticas de interesse da área cardiovascular. Através do método da cianação, o polímero arborescente foi imobilizado na superfície de tubos de polietileno. Os grupos -OH periféricos da superfície do dendrímero sofreram ativação para imobilização da estreptoquinase via reação com grupos isocianato e formação de ligação do tipo amida. O bioconjugado obtido exibiu um comportamento fibrinolítico e propriedades hemocompatíveis promissoras para sua utilização na área biomédica. Baseando-se nesses estudos, delinea-se possíveis aplicações das estruturas arborescentes contendo estreptoquinase imobilizada na área cardiovascular para os próximos anos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL..... l
1.1 Introdução.....1
1.2 ObjetivosdaTese.....4
1.3 Estrutura da Tese.....4
1.4 Referências Bibliográficas.....6
2 POLÍMEROS HEMOCOMPATÍVEIS: REVISÃO DA LITERATURA..... 11
2.1 Introdução.....11
2.2 A Cascata de Coagulação Sanguínea..... 12
2.3 Modelos que Explicam a Hemocompatibilidade de Superfícies Sintéticas..... 14
2.4 Métodos de Obtenção de Polímeros Compatíveis com o Sangue..... 15
2.5 MacromoléculasDendriméricas..... 17
2.6 A terapia trombolítica..... 18
2.7 Referências Bibliográficas.....20
3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLIGLICERÓISDENDRÍTICOS..... 32
3.1 Introdução.....32
3.2 Materiais e Métodos.....34
3.2.1 Síntese do poliglicerol com estrutura dendritíca..... 34
3.2.2 Controle da Reação de polimerizacão..... 35
3.2.3 Caracterização físico-química do dendrímero obtido..... 38
3.3 Resultados e Discussão.....40
3.4 Referências Bibliográficas.....53
4 OBTENÇÃO DE REVESTIMENTOS DENDRÍTICOS COM ATIVTDADE FIBRINOLÍTICA..... ..64
4.1 Introdução.....64
4.2 Materiais e Métodos.....66
4.2.1 Funcionalização da poliolefina e revestimento com o PGLD..... .66
4.2.2 Imobilização da Estreptoquinase na superfície polimérica.....67
4.3 Resultados e Discussão.....68
4.4 Referências Bibliográficas.....70
5 PROPRIEDADES HEMOCOMPATÍVEIS *IN VITROIEX VTVO* DO SISTEMA PGLD-Sk..... ..76
5.1 Introdução..... 76
5.2 Materiais e Métodos.....78
5.2.1 Adsorção proteica.....78
5.2.2 Adesão plaquetária.....79
5.2.3 Formação de trombos.....80
5.2.4 AtívidadefibrinolíticadaSkimobilizada.....80
5.2.5 Ensaio ex-vivo em cães.....81
5.3 Resultados e Discussão.....82
5.3.1 Adsorção Proteica.....82
5.3.2 Adesão plaquetária..... 83
5.3.3 Atividade fibrinolítica da Sk imobilizada..... 86
5.3.4 Ensaio ex-vivo em cães..... 89
5.4 Referências Bibliográficas.....90
6 CONCLUSÃO..... 105
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... 107

l

INTRODUÇÃO GERAL

1.1- Introdução

Há pouco mais de meio século o ser humano vem utilizando, de modo sistemático, macromoléculas sintéticas para a fabricação de biomateriais, elementos que visam substituir um tecido ou órgão biológico com a finalidade última de favorecer a vida. Uma grande parte dos biomateriais utilizados atualmente é composta por polímeros, especialmente projetados para sua utilização em contato com o organismo biológico. A Figura l ilustra os principais campos de aplicação dos polímeros sintéticos na medicina.'

De origem petroquímica, os polímeros sintéticos afetaram profundamente não somente as engenharias mas principalmente a medicina, biotecnologia e também a área farmacêutica. Na área médica, cabe ressaltar a fabricação de dispositivos como oxigenadores, válvulas cardíacas, membranas para hemodiálise, cateteres e suturas cirúrgicas.[2,4] É o surgimento de novos materiais poliméricos que interagem favoravelmente com o organismo biológico tornando possível a substituição de órgãos lesados irreversivelmente promovendo, desta maneira, a qualidade de vida do paciente.

A biotecnologia sofreu profundas modificações no que se refere às áreas de biocatálise e processos de separação. Nas últimas três décadas uma grande ênfase foi dada às técnicas de imobilização de enzimas em suportes poliméricos bem como a utilização de polímeros na purificação de princípios ativos naturais.[5,9]

O desenvolvimento da técnica de imobilização de enzimas em membranas poliméricas influiu de maneira considerável para a redução das etapas de operações unitárias dos processos bioquímicos e, conseqüentemente, no custo do produto final. Tais membranas com biocatalisadores imobilizados também tiveram um papel muito importante para o desenvolvimento dos biosensores de enzimas imobilizadas, amplamente utilizados nas áreas de controle e automação de processos fermentativos, bem como na bioquímica clínica.[10,11]

O impacto nas ciências farmacêuticas não foi menor relativamente à medicina e biotecnologia. A síntese de polímeros solúveis em água via polimerização radicalar como a poli(vinilpirrolidona), poli(etilenoglicol), poli(ácido acrílico), poli(ácido lático) entre tantos outros tornou possível a obtenção de agentes expansores de plasma, géis para ultra-sonografía, sistemas com propriedades antimicrobianas, cosméticos, membranas para o tratamento de queimaduras ou simplesmente a adsorção de exudados de feridas de pacientes com mobilidade restringida, revestimentos de cápsulas de comprimidos e outros materiais já amplamente difundidos pela industria farmacêutica.[13]

Embora houvesse uma verdadeira explosão com relação ao desenvolvimento de novas rotas de síntese e uma grande evolução nas técnicas de caracterização de polímeros na década de 60, há somente três décadas um controle preciso dos processos de polimerização foi atingido de modo a obter-se materiais microestruturalmente projetados para atingir-se os objetivos altamente específicos das áreas médica e farmacêutica.

No final do século XX surgem os polímeros de microestrutura digitalizada ***(imprintíng polymers)*** e macromoléculas altamente ramificadas denominadas dendrímeros. Tais sistemas macromoleculares causaram uma verdadeira revolução nas áreas médica e farmacêutica uma vez que mimetizam proteínas, agem como receptores artificiais de anticorpos, promovem a síntese quiral pois possuem capacidade para a separação de enantiomeros e várias outras propriedades características de materiais nanotecnologicamente projetados.[13,15]

Dendrímeros são considerados atualmente como os blocos fundamentais da química nanoscópica. Tais compostos isomoleculares possuem elevado nível de organização estrutural e marcam o início de uma nova era na ciência macromolecular: a era da química nanoscópica.

Com respeito à estrutura supramolecular, as estruturas dendríticas marcam uma evolução notável quanto à capacidade humana de controlar a síntese molecular ao nível nanométrico.

As macromoléculas dendríticas apresentam a extraordinária capacidade mimetizante das proteínas globulares. O caráter inerte, quanto a sua imunogenicidade aliado à elevada funcionalidade superficial e microestrutura composta essencialmente de nanocavidades

homogeneamente distribuídas pela macromolécula dendrítica, tem atraído a atenção de inúmeros pesquisadores da área biotecnológica.

A aplicação de macromoléculas dendríticas nas ciências farmacêuticas, particularmente na área de sistemas de liberação controlada de fármacos tem evoluído significativamente na última década. Neste sentido, a literatura tem destacado a aplicação de dendrímeros na obtenção de imunoconjugados,[16] contrastes radiológicos,[17] fármacos para o tratamento de câncer[18] entre outros.

Há cerca de uma década nosso laboratório tem se dedicado à pesquisa para obtenção de superfícies poliméricas biocompatíveis, particularmente àquelas compatíveis com o fluído biológico vital; o sangue.[19]

Inicialmente, nossa preocupação era minimizar as interações entre a superfície sintética e os elementos sanguíneos. Optamos neste sentido pela síntese de copolímeros de enxerto hidrofílicos em uma superfície hidrofóbica. O elevado conteúdo de água da superfície sintética levava a uma minimização na energia livre de superfície e consequentemente, a uma maior hemocompatibilidade da macromolécula sintética.

Em uma etapa posterior, 1994, passamos a imobilizar compostos bioativos em superfícies sintéticas de modo a inibir a cascata de coagulação sanguínea. "[21] Albumina e derivados do ácido salicílico foram imobilizados covalentemente nas superfícies de polietileno (PE) e poli(cloreto de vinila) (PVC), materiais reconhecidamente trombogênicos. Uma melhora significativa nas propriedades hemocompatíveis foi observada após a modificação superficial dos polímeros de base petroquímica (PE, PVC). Em ambos os processos (obtenção de copolímeros de enxerto de elevada hidrofilicidade e biofuncionalização de superfície) utilizamos essencialmente a radiação ionizante.

A síntese de polímeros através da radiação ionizante apresenta algumas vantagens em relação às metodologias convencionais uma vez que envolve a formação de radicais livres ou reações iônicas sem a necessidade de adição de catalisadores ou de aquecimento do sistema reacional. Simultaneamente ao processo de síntese o material também é esterilizado, o que constitui uma

vantagem adicional quando o processo envolve a obtenção de biomateriais. A Figura 2 ilustra as fontes de radiação utilizadas em nosso trabalho para a síntese de copolímeros de enxerto.

Recentemente, os poligliceróis têm despertado nossa atenção devido às suas propriedades biocompatíveis. Tais polímeros são poliéteres de elevado peso molecular solúveis em água, obtidos a partir da reação de policondensação da glicerina.

As propriedades biocompatíveis (baixa citotoxicidade) dos poligliceróis levaram à aprovação pelo FDA ***(Food and Drug Administration)*** de sua utilização na indústria farmacêutica e alimentícia como emulsionantes. [2,23] Tais propriedades tornam os poligliceróis compostos altamente promissores para o projeto de revestimentos de superfícies com atividade fibrinolítica. A aplicação de dendrímeros do tipo poligliceróis densamente ramificados com atividade fibrinolítica é uma alternativa interessante para a obtenção de revestimentos hemocompatíveis de aplicação imediata na área cardiovascular, ainda não devidamente explorada pela literatura.

1.2- Objetivos da Tese

Este trabalho teve por objetivo investigar a obtenção de dendrímeros com atividade fibrinolítica baseados no sistema poliglicerol dendrítico (PGLD)/estreptoquinase (Sk) com a finalidade de imputar propriedade hemocompatível à superfície polimérica de poliolefinas. A poliolefina utilizada neste trabalho foi o polietileno de baixa densidade (PE).

1.3- Estrutura da Tese

No capítulo 2 é apresentada uma revisão geral da literatura com relação às técnicas de síntese de polímeros compatíveis com o sangue. A descrição de superfícies tipo hidrogéis introduz a técnica da copolimerização por enxertia para a obtenção de superfícies poliméricas com baixa energia livre de superfície. A biofuncionalização de superfícies com compostos bioativos para a inibição da cascata de coagulação do sangue é apresentada como uma rota alternativa para a obtenção de materiais poliméricos compatíveis com o sangue. Novos sistemas

macromoleculares baseados em dendrímeros são apresentados como uma alternativa promissora para a obtenção de polímeros compatíveis com o sangue.

A síntese e a caracterização de poliglicerol dendrítico são apresentadas no capítulo 3. A técnica de síntese tipo divergente é descrita e as caracterizações fisico-químicas para a determinação da dispersão na massa molecular, tensão superficial, difusão de água e microestrutura são estudadas pelas técnicas cromatografía de permeação em gel (GPC), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia vibracional (FTIR/ATR) e ressonância magnética nuclear ('H-NMR, ^{13}C-NMR); respectivamente.

A obtenção de superfícies dendríticas com elevada atividade fibrinolítica é discutida no capítulo 4. Tubos de polietileno sofreram amonólise após serem submetidos à descarga de plasma em atmosfera de NEfyg). Os grupos -NÜ2 superficiais foram utilizados para o acoplamento do dendrímero PGLD, seguido de biofuncionalização da superfície sintética com a estreptoquinase (Sk).

No capítulo 5 são descritas as propriedades bioquímicas *in vitro* relacionadas às propriedades hemocompatíveis da superfície de PE revestida com o conjugado PGLD estreptoquinase. Os fenómenos de adesão e ativação plaquetária, bem como a formação de trombos, foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (SEM). O estudo da bioatividade da estreptoquinase foi realizado por técnicas *ex-vivo* e *in vitro*.

O capítulo 6 contém uma discussão a respeito das conclusões gerais dos resultados obtidos neste trabalho.

O capítulo 7 apresenta as perspectivas futuras com relação às possíveis aplicações dos resultados aqui apresentados.

1.4- Referências Bibliográficas

1. RATNER, B.D. New ideas in biomaterials science- a path to engineered biomaterials. ***J.Biomed.Mater.Res.*** 27: 837-850, 1993.
2. PISKIN, E. Synthetic polymeric membranes: biológica! applications. In: PISKIN, E.; HOFFMAN, A.S. ***Polymeric biomaterials.*** Dordrecht, Netherlands, Martinus NijhoffPublishers, 1986. pp. 110-135.
3. RATNER, B.D. Biomedical applications of synthetic polymers. In: ALLEN, G.; BEVINGTON, J. (Eds.) ***Comprehensive polymer science.*** New York (EUA), Pergamon Press, 1989. v.7, pp. 201-47.
4. VERT, M. Design and synthesis of bioresorbable polymers for the controlled release of drugs. In: ILLUM, L.; DA VIS, S.S. (Eds). ***Polymers in controlled drug delivery****, 2003.* pp. 117-30.
5. WISEMAN, A. ***Manual de biotecnologia de los enzimas.*** Zaragoza (Espana), Editorial Acribia, 1991.
6. BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. ***Biochemical engineering fundamentais.*** New York, McGraw-Hill, 1986. pp. 180-220.
7. DE QUEIROZ, A.A.A.; VÍTOLO, M.; DE OLIVEIRA, R.C.; HIGA, O.Z. Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. ***Radiat.Phys.Chem.*** 47(6): 873-80, 1996.
8. DE QUEIROZ, A.A.A.; VARGAS, R.R.; HIGA, O.Z.; BARRAK, E.R.;BECHARA, E.J.H.; WLASDISLAW, B.; MARZORATI, L. Graft copolymers with immobilized peroxidase for organic synthesis. ***Radiat.Phys.Chem.*** 55: 345-52, 1999.
9. DE QUEIROZ, A.A.A.; VARGAS, HIGA, O.Z.; RIBEIRO, R.R.; VÍTOLO, M. Lactam-amide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization. ***J.Appl.Polym.Sci.*** **84:** 767-77, 2002.

10. SCHEPER, T.H.; REARDON, K.F. Sensors in biotechnology. In: GÕPEL, W.; JONES, T.A.; KLEITZ, M.; LUNDSTRÕM, L; SEIYAMA, T. ***Chemical and biochemicalsensors.Wewheim(Gennany),VCll,*** 1992. v.3,pp. 1025-102.
11. LIU, Y.; YU, T. Polymers and enzyme biosensors. ***J.M.S.-Rev.Macromol.Chem.Phys.*** C37(3): 459-500, 1997.
12. FALCÃO M.L.C. ***Síntese e caracterização de estruturas porosas de quitosana pela técnica de separação de fase para aplicações biomédicas.*** Itajubá/MG, 2003. Dissertação de mestrado, Departamento de Física e Química/Universidade Federal de Itajubá.
13. MATHEW-KROTZ, J.; SHEA, KJ. Imprinted polymer membranes for me selective transport oftargeted neutral molecules. ***J.Am.Chem.Soc.*** **118:** 8154-57, 1996.
14. HART, B.R.; RUSH, D.J.; SHEA, J.K. Discrimination between enantiomers of structurally related molecules: separation of benzodiazepines by molecularly imprinted polymers. ***J.Am.Chem.Soc.*** **122:** 460-, 2000.
15. HART, B.; SHEA, KJ. Synthetic peptide receptors. Molecularly imprinted polymers (MIP's) for the recognition of peptides using peptide-metal interactions. ***J.Am.Chem.Soc.*** **123:** 2072-76, 2001.
16. BARTH R.F., ADAMS D.M., SOLOWAY A.H., ALAM F., DARBY M.V. Boronated starbust dendrimer-monoclonal antibody immunoconjugates: evaluation as a potential delivery system for neutron capture therapy. ***Bioconjugate Chem.*** 5: 58-66, 1994.
17. WIENER E.C., BRECHBIEL M.W., BROTHERS H., MAGIN R.L., GANSOW O.A., TOMALIA D.A., LANTERBUR P.C. Dendrimer-based metal-chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. ***Magn.Reson.Med.*** 31:1-8, 1994.
18. BAKER J.RJr., QUINTANA A., PIEHLER L., BANAZAK-HOLL M., TOMALIA D. A., RACZKA E. The synthesis and testing of anti-cancer therapeutic nanodevices. ***Biomed.Microdevices*** 3: 61-69, 2001.

19. DE QUEIROZ A.A.A. ***Obtenção de copolímeros de enxerto via radiação ionizante, caracterização e estudo de suas propriedades hemocompatíveis.*** São Paulo, 1993. Tese de doutoramento, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo.

20. DE QUEIROZ A.A.A., BARRAK E.R., GIL H.A.C., HIGA O.Z. Surface studies of albumin immobilized onto PE and PVC films. ***J.Biomater.ScLPolym.Edn.*** **8** (9): 667-81, 1997.

21. DE QUEIROZ A.A.A., GALLARDO A.; SAN ROMAN J., HIGA O. Hemocompatible properties of polymeric derivative of paracetamol. ***J.Biomater.Sd.Polym.Edn.*** 7(6): 523-30, 1995.

22. MICHAEL W.R., COOTS R.H. Metabolism of polyglycerol and polyglycerol esters. ***ToxicolAppLPharmacol*** **20:** 334-45, 1971.

23. WILSON R., van SCHIE B.J., HOWES D. Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricmoleate (PGPR). ***FoodChem.Toxicol.*** **36:** 711-18,1998.

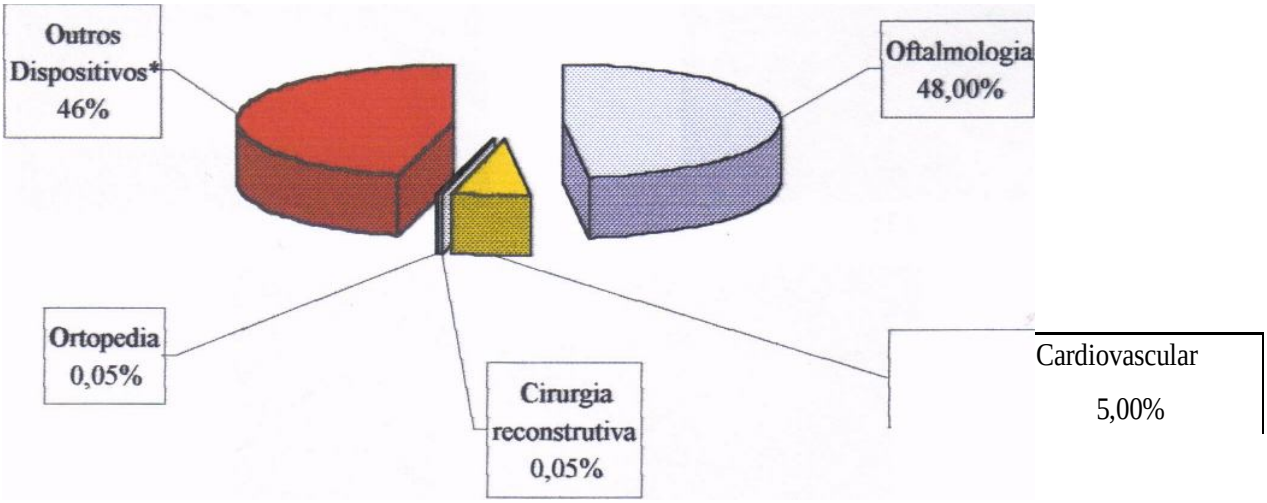


Figura l - Uso anual por área da medicina de biomateriais poliméricos nos EUA no ano de 2002. Outros dispositivos incluem cateteres, membranas para oxigenadores e dialisadores, suturas e drenos cirúrgicos.

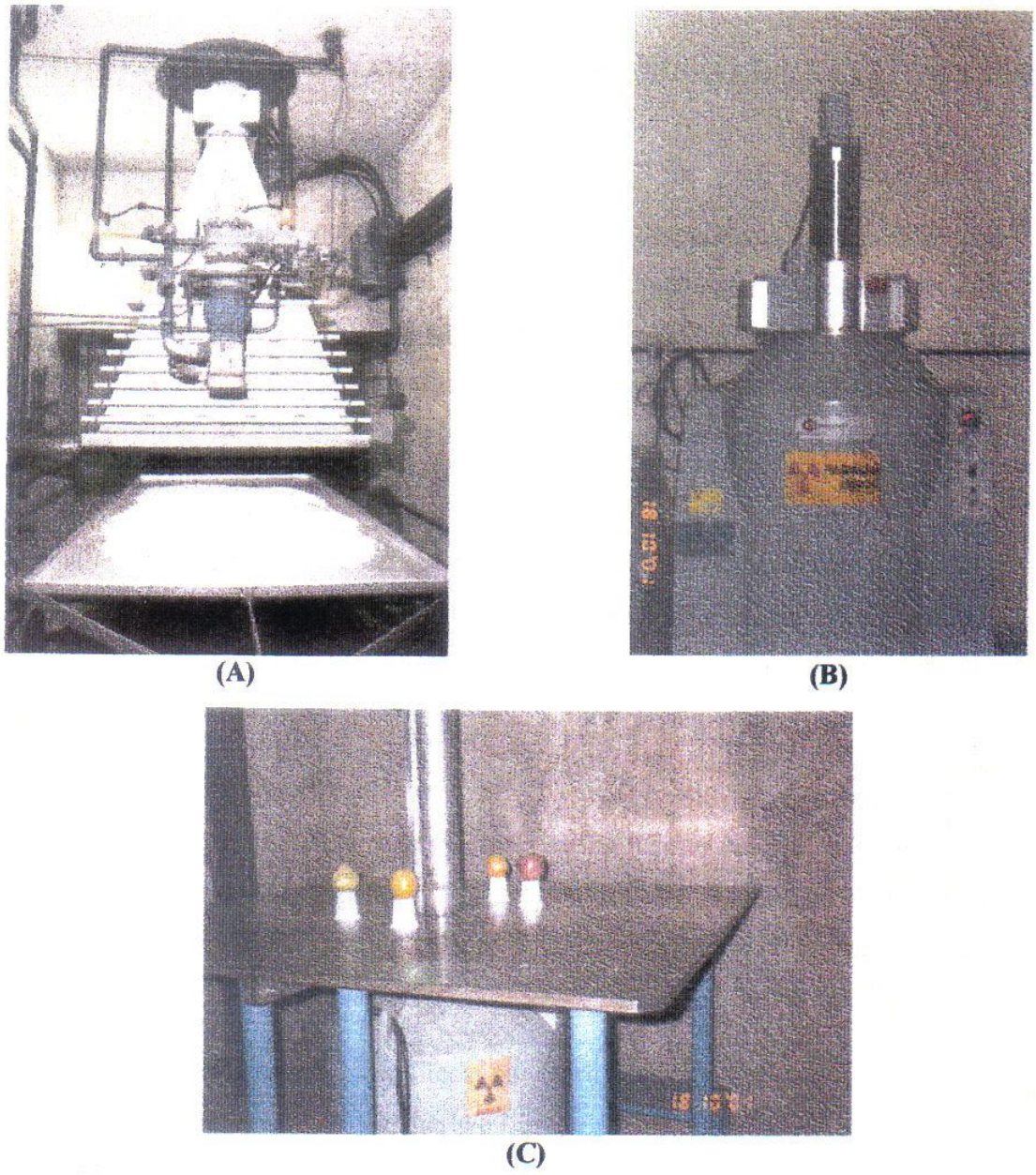


Figura 2- Fontes de radiação ionizante do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo. Acelerador de elétrons (A), gamma cell (^{60}Co) (B) e fonte panorâmica ^{60}Co (C).

POLÍMEROS HEMOCOMPATÍVEIS: REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Introdução

O ser humano alcançou nos últimos dois séculos um notável avanço científico e tecnológico na medicina, guiado pela interdisciplinaridade entre as ciências da natureza e a matemática. A evolução que se destaca não se refere somente ao avanço nos equipamentos de diagnóstico mas também nos procedimentos terapêuticos baseados no desenvolvimento de fármacos resultantes da biologia molecular e da síntese dos polímeros biocompatíveis,

Os polímeros biocompatíveis são caracterizados por não induzirem qualquer reação imunológica ou tóxica indesejáveis, não apresentam riscos de transmissão de patologias infecto-contagiosas nem causam a degradação proteica quando utilizados em contacto com o organismo biológico. '"[2]

Diversos tipos de polímeros biocompatíveis, especialmente os de caráter anfifílico continuam sendo pesquisado e cada vez mais são utilizados em procedimentos para a reconstrução e recomposição tecidual atendendo o requisito de biofimcionabilidade para o qual foram projetados, melhorando significativamente as condições de vida do ser humano.

A utilização de polímeros hidrofílicos na fabricação de lentes de contacto para utilização em oftalmologia por Witcherle e Lim na década de 60 representou o primeiro grande passo para a utilização de macromoléculas denominadas hidrogéis na medicina. Os hidrogéis encontram numerosas aplicações nas áreas médicas e farmacêuticas no projeto de sistemas "inteligentes" para a liberação controlada de fármacos ou na engenharia de tecidos biológicos.[4,10]

O aperfeiçoamento da técnica de circulação extracorpórea e a criação das primeiras próteses valvares mitrais e aórticas no final da década de 50 e meados da década de 60 motivam o interesse da comunidade científica para o desenvolvimento de polímeros

compatíveis com o sangue dado às dificuldades na época de se obter materiais resistentes e pouco trombogênicos para a confecção das válvulas cardíacas.[11,15]

Um mecanismo biológico natural tem limitado grandemente o desenvolvimento de polímeros compatíveis com o sangue, também denominados de polímeros hemocompatíveis ou antitrombogênicos: a cascata da coagulação sanguínea.

2.2- **A Cascata de Coagulação Sanguínea**

O sangue é um fluído heterogéneo de elevada complexidade onde elementos celulares como as hemácias, leucócitos e plaquetas respondem pelo transporte de oxigénio, para os tecidos, integridade do sistema imunológico humano e a cascata da coagulação, respectivamente.[16]

A coagulação sanguínea pode ocorrer através de duas vias básicas: Intrínseca (em que os elementos necessários à coagulação já estão presentes no sangue) e a Extrínseca (na qual existe a necessidade de um elemento externo ao sangue para que se processe). Ambas as vias, intrínseca e extrínseca confluem para uma via final comum.

A via extrínseca é iniciada com a liberação de tromboplastina tecidual após uma lesão do tecido biológico. Nesta via a formação do ativador extrínseco se dá quando o fator III (lipoproteína) é liberado pêlos tecidos que estão em torno do vaso sanguíneo, de modo que a função proteica deste fator ativa o fator VII na presença de cálcio e o fator X ativa o fator V que vai agir com a fração lipídica do fator III.

A via intrínseca é iniciada pela exposição do sangue a uma superfície negativamente carregada. A formação do ativador intrínseco se dá quando o fator XII (fator de Hageman) é ativado no momento em que entra em contato com as bordas da lesão vascular. Uma vez ativado o fator XII dá origem a uma reação em cascata que consiste na ativação do fator XI na presença do cálcio.

Na via intrínseca, a calicreína deflagra a ativação dos fatores XII, XI e IX, em cascata, ou seja, um fator ativa o seguinte, numa sequência ordenada. O fator IX, em presença

de cálcio e o fator VIII (anti-hemofílico) ativam o fator X, iniciando a via final comum. O fator V (ativado pelo fator X) reagirá com os fosfolipídeos liberados pelas plaquetas, originando desta forma o ativador intrínseco.

Na via comum, a protrombina é ativada pelo fator X ativado (tenha o processo se iniciado pela via extrínseca ou pela intrínseca), formando-se trombina. A trombina não somente converte o fibrinogênio em fibrina, mas também ativa o fator XIII, responsável pela polimerização da fibrina. A polimerização da fibrina é fruto da reação catalisada pelo fator VIII ativado, que se comporta como uma amidase.

A fibrina polimerizada é insolúvel, e forma um retículo que aprisiona células do sangue, formando um coágulo ou trombo, cujo objetivo original seria o fechamento de uma descontinuidade na parede do vaso. Quando o sistema é ativado dentro do vaso (ou na superfície de um material sintético implantado), o coágulo formado pode obstruir o ou ser levado pelo fluxo sanguíneo comprometendo seriamente a saúde do paciente.

O coágulo formado é reabsorvido simultaneamente com a cicatrização da parede do vaso sanguíneo cerca de 24-48 horas após o início da coagulação em um mecanismo conhecido como fibrinólise. Neste caso, a substância responsável pela reabsorção do coágulo é a fibrinolisina, substância esta ativada pelo fator XIII.

Ao transformar a trombina (a substância mais coagulante presente no sangue humano), no anticoagulante trombomodulina, o endotélio cria um complexo capaz de ativar o sistema proteína S-proteína C. A proteína S atua estimulando a ação do inibidor do ativador de plasminogênio, liberando deste modo o plasminogênio que irá atuar sobre a fibrina, desfazendo o coágulo sanguíneo. A proteína C é um cofator necessário para sua atuação.

A antitrombina III é ativada pela heparina e representa a principal defesa anticoagulante. A trombomodulina, produzida pelo endotélio, ativa o sistema proteína C/proteína S, segunda linha de defesa antitrombo. Caso essa defesa seja vencida, entra em ação o sistema fibrinolítico, capaz de lisar o trombo e restabelecer o fluxo nos vasos

ocluídos por coágulos sanguíneos. Para uma melhor compreensão, a cascata de coagulação do sangue é representada esquematicamente na Figura l.

2.3- Modelos que Explicam a Hemocompatibilidade de Superfícies Sintéticas

Dentre todos os critérios exigidos para um material sintético ser considerado biocompatível a compatibilidade com o sangue parece ser uma barreira intransponível que limita grandemente a aplicação dos polímeros sintéticos na área cardiovascular. De um modo geral um polímero é considerado hemocompatível ou antitrombogênico se não houver ativação da cascata de coagulação intrínseca do sangue bem como ausência de plaquetas e leucócitos ativados aderidos em sua superfície.[17,18]

Nos últimos 50 anos uma vasta literatura foi publicada relativamente à síntese de polímeros compatíveis com o sangue sendo atingido progressos significativos no desenvolvimento de materiais para a área cardiovascular.[19,22] Entretanto, do ponto de vista teórico; o conhecimento acerca do mecanismo pelo qual uma superfície sintética interage com o sangue e seus elementos contínua sendo apenas qualitativo.

A interação de uma superfície polimérica com o sangue envolve uma fenomenologia complexa onde fenómenos de interface como a difusão de água e ions, topologia superficial, microdomínios hidrofílicos/hidrofóbicos e composição química de superfície podem influenciar as interações entre a superfície sintética e o tecido biológico.[23,28]

Dado o sucesso da termodinâmica de superfícies em explicar os fenómenos de bioadesão em superfícies sintéticas a energia livre superficial de polímeros tem se apresentado como um modelo mais quantitativo e conveniente para a previsão da compatibilidade com o sangue de uma superfície polimérica.[29,38]

O caráter atemporal da termodinâmica é o grande rival do modelo termodinâmico uma vez que a área cardiovascular exige a utilização de próteses implantáveis por um período de tempo relativamente longo.

2.4- Métodos de Obtenção de Polímeros Compatíveis com o Sangue

De uma maneira geral, a obtenção de polímeros hemocompatíveis pode ser efetuada através da síntese de materiais cujas interações com os componentes do sangue são minimizadas ou; síntese de polímeros capazes de inibir algum dos processos que ativam a cascata de coagulação.

A minimização das interações da superfície polimérica com o sangue pode ser atingida através da modificação da superfície de polímeros convencionais pela técnica de enxertia para a obtenção de hidrogéis com as propriedades mecânicas mais adequadas para aplicação na área cardiovascular. Neste caso, o elevado conteúdo de água superficial reduz a energia livre de superfície do material sintético tornando-a próxima à do tecido biológico além de fornecer uma estrutura difusa que impediria a desnaturação das proteínas eventualmente adsorvidas na superfície sintética.

Um progresso significativo foi alcançado em cerca de 30 anos de pesquisas acerca da obtenção de superfícies poliméricas com boa hemocompatibilidade envolvendo a síntese de copolímeros de enxerto cuja superfície apresenta um elevado conteúdo de água quando implantada no organismo biológico. As rotas sintéticas mais promissoras envolvem a síntese de hidrogéis derivados dos monômeros N,N'-dimetilacrilamida (DMAm), metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) e N-vinil-2-pirrolidona (VP) diretamente enxertados nas superfícies de polímeros hidrofóbicos como o polietileno (PE), poli(propileno) (PP), silicone, poli(uretanas) entre outros ou mesmo copolimerizados entre si.[39,51]

A sintese de copolímeros de enxerto tipo hidrogéis requer técnicas sintéticas que permitam a obtenção de materiais de elevada pureza uma vez que a finalidade última do material resultante é o implante em organismos vivos. Sendo assim, a copolimerização por enxertia iniciada por radiações ionizantes como raios gama e elétrons acelerados são apontados na literatura como as rotas sintéticas mais promissoras para a obtenção de polímeros compatíveis com o sangue relativamente às metodologias convencionais. A radiação ionizante envolve a formação de radicais livres diretamente na superfície do

polímero hidrofóbico e ao mesmo tempo inicia a copolimerização radicalar do monômero hidrofílico sem a necessidade da adição de catalisadores ou aquecimento do sistema reacional.[52,54] Por outro lado, alguns inconvenientes da técnica tais como a utilização de fontes não convencionais de energia no processo de síntese que encarecem significativamente o processo e reações secundárias de reticulação e degradação limitam a utilização da técnica da copolimerização por enxertia.

Com relação à obtenção de superfícies poliméricas capazes de inibir algum dos processos que produzem a cascata da coagulação sanguínea destacam-se os trabalhos envolvendo a síntese de polímeros biofuncionalizados. Polímeros biofuncionalizados podem ser preparados através da técnica de imobilização de um composto bioativo que inibe alguns dos processos da cascata de coagulação do sangue tais como a adsorção de fibrinogênio ou a adesão e ativação das plaquetas do sangue.

A funcionalização de superfícies poliméricas através da copolimerização por enxertia para a imobilização de heparina, proteínas e derivados do ácido acetil salicílico tem permitido a obtenção de polímeros sintéticos que tendem a prevenir a formação de trombos em implantes cardiovasculares.[55,60] O copolímero de enxerto pode ser ativado para a imobilização de compostos bioativos através de uma rota que permita a máxima manutenção da integridade do componente biológico em uma rota similar ao processo de imobilização de enzimas em superfícies sintéticas.[61,63]

Embora a utilização de copolímeros de enxerto tipo hidrogéis permita a obtenção de polímeros sintéticos cuja compatibilidade com o sangue é bastante promissora, as dificuldades do controle da arquitetura molecular do material bem como os processos de obtenção altamente específicos limitam a disseminação da técnica a nível industrial.

2.5- **Macromoléculas Dendriméricas**

A síntese de polímeros dendriticamente estruturados na década de 80 vem abrir um novo horizonte no campo de biomateriais.[64,69] Propriedades como monodispersão, topologia que mimetiza a estrutura de proteínas, lipossomas e micelas regulares bem como sua atuação como endo/exo receptores fazem dos dendrímeros sistemas macromoleculares promissores para aplicações em farmácia e medicina.

Os polímeros denominados dendrímeros surgem como consequência da evolução nos processos de síntese de macromoléculas ocorrida durante os séculos XIX e XX. A síntese de polímeros envolvia inicialmente processos de polimerização radicalar de natureza estatística levando à obtenção de materiais polidispersos com muito pouco controle da distribuição da massa molecular e microestrutura da macromolécula obtida.

Durante as últimas três décadas do século XX a síntese macromolecular evoluiu para processos de polimerização mais controlados envolvendo as técnicas de polimerização iônica, processos de proteção/desproteção tipo Merrified e a chamada reação em cadeia via polimerase. Tais técnicas levaram à obtenção de sistemas cuja microestrutura da macromolécula poderia ser precisamente definida.

Os géis reticulados constituem a segunda classe mais importante de sistemas poliméricos obtidos a partir de monômeros polifuncionais ou precursores oligoméricos. Um grande esforço foi realizado no século XX para uma melhor compreensão do processo de formação de redes tridimensionais macromoleculares culminando com o desenvolvimento da teoria da percolação.[79,81]

Desta maneira, os sistemas dendriméricos surgem como uma consequência do controle preciso do processo de síntese o que promove uma elevada densidade de grupos funcionais na superfície macromolecular. A elevada densidade de grupos funcionais e a isomolecularidade fazem dos dendrímeros sistemas atraentes para a imobilização de biomoléculas com atividade fibrinolítica.

2.6- A terapia trombolítica

O tratamento efetivo do infarto agudo do miocárdio se iniciou na década de 70, após o advento da cinecoronografía e das cirurgias da ponte de safena. O estudo de pacientes na fase aguda do infarto veio comprovar que a trombose era a causa fundamental da oclusão coronariana.

A descoberta de agentes trombolíticos como a estreptoquinase (Sk) e o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) associado aos problemas logísticos de uma cirurgia de emergência, levou vários investigadores a utilizar tais fármacos para fazer a lise do trombo estabelecendo-se então na década de 80 a conduta médica ideal para o tratamento trombolítico por via intravenosa.[83,,86]

Entretanto, algumas desvantagens da terapia trombolítica parece estar associadas a fatores como risco de hemorragia intracraniana (principalmente em pacientes idosos),hipotensão, recidiva da isquemia e principalmente baixo fator de reperfusão coronária (fluxo TIMI 3).[87,88]

Concomitantemente ao desenvolvimento da terapia trombolítica, uma via paralela para obter reperfusão com técnicas baseadas em catéter chamava a atenção pela possibilidade de se obter um elevado fator de reperfusão além de se aplicar a pacientes onde a trombólise não era indicada: a angioplastia coronariana transluminal percutânea (ACTP).[90]

No entanto, apesar da comprovação da superioridade da ACTP relativamente à terapia trombolítica, notadamente nos pacientes de alto risco e idosos, isquemia recorrente, reinfarto, a necessidade de equipe treinada para a prática do procedimento cirúrgico e hospital com equipamento adequado constitue os fatores limitantes da ACTP.[91]

A utilização de *stents* em casos de infarto agudo do miocárdio vem colaborar significativamente para o sucesso da técnica ACTP, levando a uma diminuição significativa das taxas de mortalidade hospitalar, reinfarto, isquemia recurrente e

elevado fator do fluxo coronário TIMI 3.[92,93] A Figura 2 ilustra um stent comumente utilizado na área cardiovascular bem como seu princípio de funcionamento.

Urna vez que stents são fabricados a partir de materiais sintéticos não hemocompatíveis surge a necessidade de se passivar sua superfície a fim de se inibir a formação de trambos, um fator de risco significativo para o paciente, mesmo quando existe a administração de anticoagulantes.

Atualmente, são apontadas na literatura perspectivas de aprimoramento dos stents onde o surgimento de novos dispositivos que permitem abordar a quase totalidade das lesões desde os vasos de pequeno calibre (2-2,5 mm) até lesões longas beneficiará a grande população de infartados.[94,95]

2.7 **Referências Bibliográficas**

1- WILLIAMS, D.F. Biomaterals and biocompatibility: An introduction. In: ***Fundamental aspecis of biocompatibility.*** Florida, CRC Press, 1990, v. I, p.2.

2- WILLIAMS, D.F. Review tissue-biomaterial interactions. ***J.Mater.ScL,*** 22:3421-45, 1987.

3- WITCHERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic géis for biological use. ***Nature,* 185:** 117-8, 1960.

4- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S. Synthetic hydrogels for biomedical applications. In: Andrade J.D. (Ed.) ***Hydrogels for medicai and related applications.*** Washington, ACS Symposium Series, No 31, 1976. pp. 1-36.

5- PEPPAS, N.A. ***Hydrogels in medicine.*** Boca Raton, Flórida, 1986.

6- PARK, K. ***Controlled release: Challenges and strategies.*** Washington, American Chemical Society, 1997.

7- PEPPAS, N.A., SAHLIN, J.J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materiais: areview. *Biomaterials*, 17: 1553-61, 1996.

8- RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S. Synthetic hydrogels for biomedical applications. In: ANDRADE, J.D. (Ed.) ***Hydrogels for medicai and related applications.*** Washington, ACS Symposium Series, v. 3, American Chemical Society, 1976;

PP- 1-33.

9- PEPPAS, N.A; LANGER, R. New challenges in biomaterials. **Science 263:** 1715-1720, 1998.

10-KIKUCHI, A.; OKANO, T. Temperature-responsive polymers as on-off switches for intelligent biointerfaces. In: OKANO, T. (Ed.) ***Biorelated polymers and géis.*** Boston, MA, Academic Press, 1998. pp. 1-28.

11-LELLEHEI, C.W.; GOTT, V.L.; De WALL, R.A.; VARCO, R.L. Surgical correction of puré mitral insufficiency by anuloplasty under direct vision. ***Lancei,*** 77: 446-9, 1957.

12-MALOWNEY, R.C.; PATON, B.C. A silastic monocusp prosthesis. / ***Cardiovasc Surg, 6:*** 441-6, 1965.

13-BRAUNWALD, N.S.; COOPER, T.; MORROW, A.G. Experimental replacement of the mitral valve with flexible polyurethane form prosthesis. ***Tr Am Soe Artif IntOrg,*** 6:312-8, 1960.

14- MIRKOVITCH, V.; AKUTSU, T.; SEIDEL, W.; KOLFF, W.J. Study of thrombosis on plastics placed inside the heart resulting in a mitral valve with chordae tendineae. **Tr Am Soe Art Int** Org, 7: 345-9, 1961.

15-BRAUNWALD, N.S.; COOPER, T.; MORROW, A.G. Complete replacement of the mitral valve. Sucessful clinicai application of a flexible polyurethane prosthesis. / ***Thorac Cardiov Surg,*** **40:** 1-11, 1960.

16-SOBEL B.E., COLLEN D., GROSSBARD E.B. Tissue plasminogen activator in thrombolytic therapy. New York, Mareei Dekker, 1987. Pp.1-5.

17-FORBES, C.D.; PRENTICE, C.R.M. Thrombus formation and artificial surfaces. ***Brith.Med.Bull.*** 34(2): 201-207, 1978.

18-GEBELEIN, C.G. Medicai applications of polymers. In: TESS, R.W.; POEHLEIN, G.W. (Ed.) ***Applied Polymer Science.*** Washington, American Chemical Society Symposium Series 285, 1985. pp. 535-56.

19-PISKIN, E.; HOFFMAN, A.S. ***Polymeric biomaterials.*** Boston, Martinus Nijhoff Publishers, 1986.

20-SUZUKI, M.; TAMADA, Y.; IWATA, H.; IKADA, Y. Polymer surface modification to attain blood compatibility of hydrophobic polymer. In: MITALL, K.L. (Ed.) ***Physicochemical aspects of polymer surfaces.*** New York, Plenum Publishing, 1983. v.2, pp. 923-41.

21-IKADA, Y.; SUZUKI, M.; TAMADA, Y. Polymer surfaces possessing minimal interaction with blood components. In: SHALABY, S.W.; HOFFMAN, A.S.; RATNER, B.D.; HORBETT, T.A. (Ed.) ***Polymers as biomaterials.*** New York, Plenum Press, 1984. pp. 135-47.

22-RATNER, B.D. Biomedical applications of synthetic polymers. In: ALLEN, G.; BEVINGTON, J. (Eds.) ***Comprehensive polymer science.*** New York, Pergamon Press, 1989. v. 7, pp. 210-47.

23-NORDE, W.; LYKLEMA, J. Why proteins prefer interfaces. ***J.Biomater.Sci.Polym.Edn.*** 2(3): 183-202, 1991.

24-OKANO, T.; NISHIYAMA, S.; SHINOHARA, L; AKAIKE, T.; SAKURAI, Y. Interaction between plasma protein and microphase separated structure of copolymers. ***Polym.J.*** 10(2): 223-8, 1978.

25-BEUGELING, T. The interaction of polymer surfaces with blood. ***J.Polym.Scl:Polym.Symp.*** **66:** 419-28, 1979.

26-JOSEFOWICZ, M.; JOSEFONVICZ, J. Antithrombogenic polymers. *Pur. AppLChem.* 56(10): 1335-44, 1984.

27-RATNER, B.D.; JOHNSTON, A.B.; LENK, TJ. Biomaterial surfaces. ***J.Biomed.Mater.Res.:Appl.Biomater.*** 21(A-1): 59-90, 1987.

28-IKADA, Y.; SUZUKI, M.; TAMADA, Y. Polymer surfaces possessing minimal interaction with blood components. In: SHALABY, S.W.; HOFFMAN, A.S.; RATNER, B.D.; HORBETT, T.A . (Eds) ***Polymers as biomaterials.*** New York, Plenum Press, 1984. pp. 135-47.

29-GRINNELL, F.; MILAM, M.; SRERE, P.A. Studies on cell adhesion. II. Adhesion of cells to surfaces of diverse chemical composition and inhibition of adhesion by sufhydryl binding reagents. ***Arch.Biochem.Biophys.*** **153:** 193-8, 1972.

30-GERSON, D.F. Cell surface energy, contact angles and phase partition. Lymphocytic cell lines in biphasic aqueous mixtures. ***Biochim.Biophys.Acta*** **602:** 269-80, 1980.

31-LYMAN, D.J.; MUIR, W.M.; LEE, U. The effect of chemical structure and surface properties of polymers on coagulation of blood. I. Surface free energy effects. ***Trans.Amer.Soc.Artif.Organs*** **11:** 301-6, 1965.

32-NYILAS, E.; MORTON, W.A.; CUMMING, R.D.; LEDERMAN, D.M.; CHIU, T.H.; BAIER, R.E. Effects of polymer surface molecular structure and force-field characteristics on blood interfacial phenomena. ***J.Biomed.Mater.Res.Symp.*** (8): 51-68, 1977.

33-BAIER, R.E. Surface properties influencing biological adhesion. In: Manly, R.S. (Ed.) ***Adhesion in biological systems.*** New York, Academic Press, 1970. pp.15-48.

34-BAIER, R.E.; MEYER, A.E.; NATIELLA, J.R.; NATIELLA, R.R.; CÁRTER, J.M. Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results. ***J.Biomed.Mater.Res.*** **18:** 337-55, 1984.

35-VALK van der, P.; PELT van der, H.J.; BUSSCHER, H.J.; JONG, H.P.; WILDEVUUR, C.R.H.; ARENDS, J. Interaction of fíbroblasts and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading. ***J.Biomed.Mater.Res.*** 17: 807-17, 1983.

36-SCHAKENRAAD, J.M.; BUSSCHER, H.J.; WILDEVUUR, C.R.H.; ARENDS, J. The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serurn proteins. ***J.Biomed.Mater.Res.*** **20:** 773-84, 1986.

37-LYMAN, D.J.; HILL, D.W.; STIRK, R.K.; ADAMSON, C.; MOONEY, B.R. The interaction of tissue cells with polymer surfaces. ***Trans.Am.Soc.Artif.Intern. Organs*** **18:** 19-23, 1972.

38-DE QUEIROZ, A.A.A.; Barrak, E.R.; Castro, S.C. Themodynamic analysis of the surface of biomaterials. *J.Molec.Struct. (Theochem)* 394: 271-279, 1997.

39-HOFFMAN, A. Principies governing biomolecule interactions at foreign interfaces. ***J.Biomed.Mater.Res.Symp.*** (5): 77-83, 1974.

40-RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; HANSON, S.R.; HARKER, L.A.; WHIFFEN, J.D. Blood-compatibility-water-content relationships for radiation-grafted hydrogels. ***J.Polym.Sci.:Polym.Symp.*** **66:** 363-75, 1979.

41-HOFFAMN, A .S. Applications of synthetic polymeric biomaterials in medicine and biotechnology. In: MARTUSCELLI, E.; MARCHETTA, C.; NICOLAIS, L. (Eds.) ***Future trenas in polymer science and technology.*** New York, Technomic Publishing, 1987. pp. 193-214.

42-IKADA, Y.; IWATA, H.; HORII, F.; MATSUNAGA, T.; TANIGUSCHI, M.; SUZUKI, M.; TAKI, W.; YAMAGATA, S.; YONEKAWAS, Y.; HANDA, H. Blood compatibility of hydrophilic polymers. ***J.Biomed.Mater.Res.*** **15:** 697-718,1981.

43-HOFFMAN, A.S.; COHN, R.; HANSON, S.R.; HARKER, L.A.; HORBETT, T.A.; RATNER, B.D.; REYNOLDS, L.O. Application of radiation-grafted hydrogels as blood-contacting biomaterials. ***Radiat.Phys.Chem.*** 22(1/2): 267-83, 1983.

44- RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; HANSON, S.R.; HARKER, L.A.;WHIFFEN, J.D. Blood-compatibility-water-content relationships for radiation-grafted hydrogels. ***J.Polym.Sci.Polym.Symp.*** **66:** 363-75, 1979.

45-OTSUHATA, K.; RAZZAK, M.T.; CASTANARES, R.L.; TABATA, Y.; OHASHI, F.; TAKEUSCHI, A. Effect of surface texture of grafted fílms on antithrombogenicity. ***Radiat.Phys.Chem.*** 25(4-6): 537-48, 1985.

46-DE QUEIROZ, A.A.A. ***Obtenção de copolímeros de enxerto via radiação ionizante, caracterização e estudo de suas propriedades hemocompatíveis.*** SP, 1993. (Tese de doutoramento, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo).

47-JÚLIO, C.A .; DE QUEIROZ, A .A .A .; HIGA, O .Z.; MARQUES, E.F.; MAIZATO, M.J.S. Blood compatibility of tubular polymeric materiais studied by biological surface interactions. ***Braz.J.Med.Biol.Res.*** 27: 2565-68, 1994.

48-DE QUEIROZ, A.A.A.; CASTRO, S.C.; HIGA, O.Z. Adsorption of plasma proteins to DMAA hydrogels obtained by ionizing radiation and its relationship with blood compatibility. ***J.Biomater.Sci.:Polym.Edn.*** 8(5): 335-347, 1997.

49-DE QUEIROZ, A.A.A.; GALLARDO, A .; SAN ROMÁN, J. Vinylpyrrolidone-N,N'-dimethylacrylamide water-soluble copolymers: síntesis, physical-chemical properties and proteic interactions. ***Biomaterals*** **21:** 1631-43, 2000.

50-ABRAHAM, G.A.; DE QUEIROZ, A.A.A.; SAN ROMÁN, J. Hydrophilic hybrid IPNs of segmented polyurethanes and copolymers of vinylpyrrolidone for applications in medicine. ***Biomaterials*** 22: 1971-85,2001.

51- DE QUEIROZ, A.A.A.; FERRAZ, H.G.; ABRAHAM, G.A.; FERNÁNDEZ, M. M.; BRAVO, A.L.; SAN ROMÁN, J. Development of new hydroactive dressings based on chitosan membranes: characterization and *in vivo* behavior. ***J.Biomed.Mater.Res.***\ 147-154, 2002.

52-METZ, D.J. Graft copolymers- a new technology? *Nucleonics* 16 (4): 73-7, 1958.

53-INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. ***Radiation technology in biotechnology and biomedicine.*** Washington, IAEA, 12-15 December, 1988.

54-STANNET, V.T. Radiation grafting: state-of-the-art. ***Radiat.Phys.Chem.*** 35 (1-3): 82-7, 1990.

55-CHAWLA, A.S.; CHANG, T.M. Non-thrombogenic polymeric membranes prepared by radiation grafting of heparin. ***ACS Polym.Prepr.*** **14:** 379-385, 1973.

56-GARNETT, J.L.; JANKIEWICZ, S.V.; LEVOT, R.; SANGSTER, D.F. Insolubilization of biologically active mateials with novel radiation graft copolymers. ***Radiat.Phys.Chem.*** 25(4-6): 509-16, 1985.

57-DE QUEIROZ, A.A.A.; GALLARDO, A.; SAN ROMÁN, J.; HIGA, O.Z. Hemocompatible properties of polymeric derivative of paracetamol. ***J.Biomater.Sd.Polym.Edn.*** 7(6): 523-30, 1995.

58-DE QUEIROZ, A.A.A.; BARRAK, E.R.; GIL, H.A .C.; HIGA, O .Z. Surface studies of albumin immobilized onto PE and PVC films. ***J.Biomater.Sci.: Polym.Edn.*** 8(9): 667-81, 1997.

59-BULAI, A.; DE QUEIROZ, A.A.A.; GALLARDO, A.; SAN ROMÁN, J. Microstructural análisis of p-acryloyloxy-acetanilide and N,N-dimethylacrylamide copolymers of biomedical interest by **NMR.** ***Polymer*** **40:** 4953-60, 1999.

60-ABRAHAM, G.A.; DE QUEIROZ, A.A.A.; SAN Román, J. Immobilization of a nonsteroidal antiinflammatory drug onto commercial segmented polyurethane surface to improve haemocompatibility properties. ***Biomaterials* 23:** 1625-38, 2002.

61-DE QUEIROZ, A.A.A.; VÍTOLO, M.; DE OLIVEIRA, R.C.; HIGA, O.Z. Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. ***Radiat.Phys.Chem.*** 47(6): 873-880, 1996.

62-DE QUEIROZ, A.A.A.; VARGAS, R.R.; HIGA, O.Z.; BARRAK, E.R.; BECHARA, E.J.H.; WLASDISLAW, B.; MARZORATI, L. Graft copolymers with immobilized peroxidase for organic synthesis. ***Radiat.Phys.Chem.*** 55: 345-52, 1999.

63-DE QUEIROZ, A.A.A.; VARGAS, R.R.; HIGA, O.Z.; RIBEIRO, R.R.; VÍTOLO, M. Lactam-amide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization. ***J.Appl.Polym.Sd.* 84:** 767-77, 2002.

64-DVORNIC, P.R.; TOMALIA, D.A . Starbust® dendrimers: a conceptual approach to nanoscopic chemistry and architecture. ***MacromoLSymp.* 88:** 123-148, 1994.

65-TOMALIA, D,A.; BAKER, H.; DEWALD, J.R.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. A new class of polymers: starbust dendritic macromolecules. ***Polym.J.(Tokyo)\l:*** 117-32, 1985.

66-TOMALIA, D.A. Starbust dendrimers: molecular levei control of size, shape, surface chemistry, topology and flexibility from atoms to macroscopic matter. ***Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* 29:** 138-75, 1990.

67-NEWKOME, G.R. Cascade molecules: a new approach to micelles. ***J.Org.Chem.* 50:** 2003-4, 1985.

68-TOMALIA, D.A. The importance of branch junction symmetry in the development of topological shell molecules. ***J.Am.Chem.Soc.* 109:** 1601-3, 1987.

69-TOMALIA, D.A.; MAJOROS, I. Dendrimeric supramolecular and supramolecular assemblies. In: CIFERRI, A. (Ed.) ***Supramolecular polymers.*** New York, Mareei Dekker, 2000.

70-ESFAND, R.; TOMALIA, D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. ***Drug Discov.Today*** 6(8): 427-36, 2001.

71-TWYMAN, L.J.; The synthesis of water-soluble dendrimers and their application as possible drug delivery systems. ***Tetrahedron Lett.*** **40:** 1743-46, 1999.

72- ESFAND, R. Synthesis, complexation and pharmaceutical applications of tetra-directional cascade dendrimers. ***Pharm.Sci.*** 2: 1-3, 1996.

73-FRÉCHET, J.M.J. Designing dendrimers for drug delivery. ***Phar.ScLTechnol. Today*** **2:** 393-401, 2000.

74-HUDDE, T. Activated polyamidoamine dendrimers, a nonviral vector for gene-transfer to the cornial endothelium. ***Gene Ther.*** **6:** 939-43, 1999.

75-SINGH, P. Starbust dendrimers: enhanced performance and flexibility for immunoassays. ***Clin.Chem.*** **40:** 1845-49, 1994.

76- SINGH, P. Terminal groups in starburst dendrimers: activation and reactions with proteins. ***Bioconjugate Chem.*** **9:** 54-63, 1998.

77-ROBERTS, J.C. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. ***J.Biomed.Mater.Res.*** **30:** 53-65, 1996.

78-MALIK, N. **Dendrimer-platinate: a novel approach to câncer chemotherapy.** ***Anti-cancer Drugs*** **10:** 767-76, 1999.

79-STOCKMAYER, W.H. ***J.Chem.Phys.*** 17:1301-05, 1949.

80-DE GENNES, P.G.; ***J.Phys.(París)*** 37:L1, 1976.

81-STAUFFER,D.J. ***J.Chem.Soc.FaradayTrans.*** *2* 72: 1354-58, 1976.

82-The GUSTO investigators. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. ***N.EngLJ.Med.*** **329:** 673-82, 1993.

83-The TIMI Study Group, Comparision of invasive and conservative strategies after treatment with intravenous tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Results of the thrombolysis in myocardial infarction. (TIMI) Phase II Trial. ***N.EngLJ.Med.*** **320:** 475-84, 1989.

84-GISSI (Grupo italiano per Io studio delia streptochinasi nelle'infarto miocárdico). Effectiveness of intravenous thrombolysytic treatment in acute myocardial infarction: ***Lancei* 1:** 397-402, 1986.

85-JULIAN, D.; BRAUNSWALD, E. ***Choice of thrombolytíc agent.*** Philadelphia, WB Saunders, 1994. ***N.EngU.Med.* 329:** 673-82, 1993.

86- Late study group. Late assessment of thrombolytic effícacy (LATE) study with alteplase 6-24 h of onset of acute myocardial infarction. ***Lancei* 342:** 756-66, 1993.

87-PARISI, A.F.; FOLLAND, E.D.; HARTIGAN, P. A comparison of angioplasty with the medicai therapy in me treatment of single vessel coronary artery disease. ***N.EngU.Med.* 326:** 6-10, 1992.

88-WEAVER, W.D.; SIMES, R.J. Comparision of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolitic therapy for acute myocardial infarction. *J ama* 278: 2093-98, 1997.

89- STONE, G.W.; BRODIE, B. Prospective, multicenter study of the safety and feasibility of primary stenting in acute myocardial infarction. In hospital and 30 day results of PAMI stent pilot trial. ***JACC*1:** 23-30, 1998.

90-GARCIA-CANTU, E.; GUERIN, F. Stent implantation in acute myocardial infarction. ***A.J.Cardiol*** 77: 451-54, 1996.

91-OSTERNE, E.C.V.; JÚNIOR, P.N.F.; SCHNEIDER, C. Ponto de vista-Angioplastia primária x tratamento fibrinolítico. ***RECOC*** 5(2): 42-6, 1998.

92- STONE, G.H.; BRODIE, B.R.; GRIFFIN, J.J. Prospective multicenter study of the safety and feasibility of primary stenting in acute myocardial infarction: in-hospital and 30-day results of the PAMI stent pilot trial. ***J.Am.ColLCardiol.* 31:** 23-30, 1998.

93-RENTROP, K.P.; BLANKE, H.; KARSCH, K.R. Initial experience with transluminal recanalization of the recently occluded infarct-related coronary artery in acute myocardial infarction- comparison with conventionally treated patients. ***Clin.Cardioi*** 2: 92-105, 1979.

94-SCHRODER, R.; BIAMINO, G.; LEITNER, E-R.V. Intravenous short-term infusion of streptokinase in acute myocardial infarction. ***Circulation61:*** 536-48, 1983.

95-The International Study group. In-hospital mortality and clinicai course of 20,891 patients with suspected acute myocardial infarction randomized between alteplase and streptokinase with or without heparin. ***Lancei* 336:** 71-5, 1990.

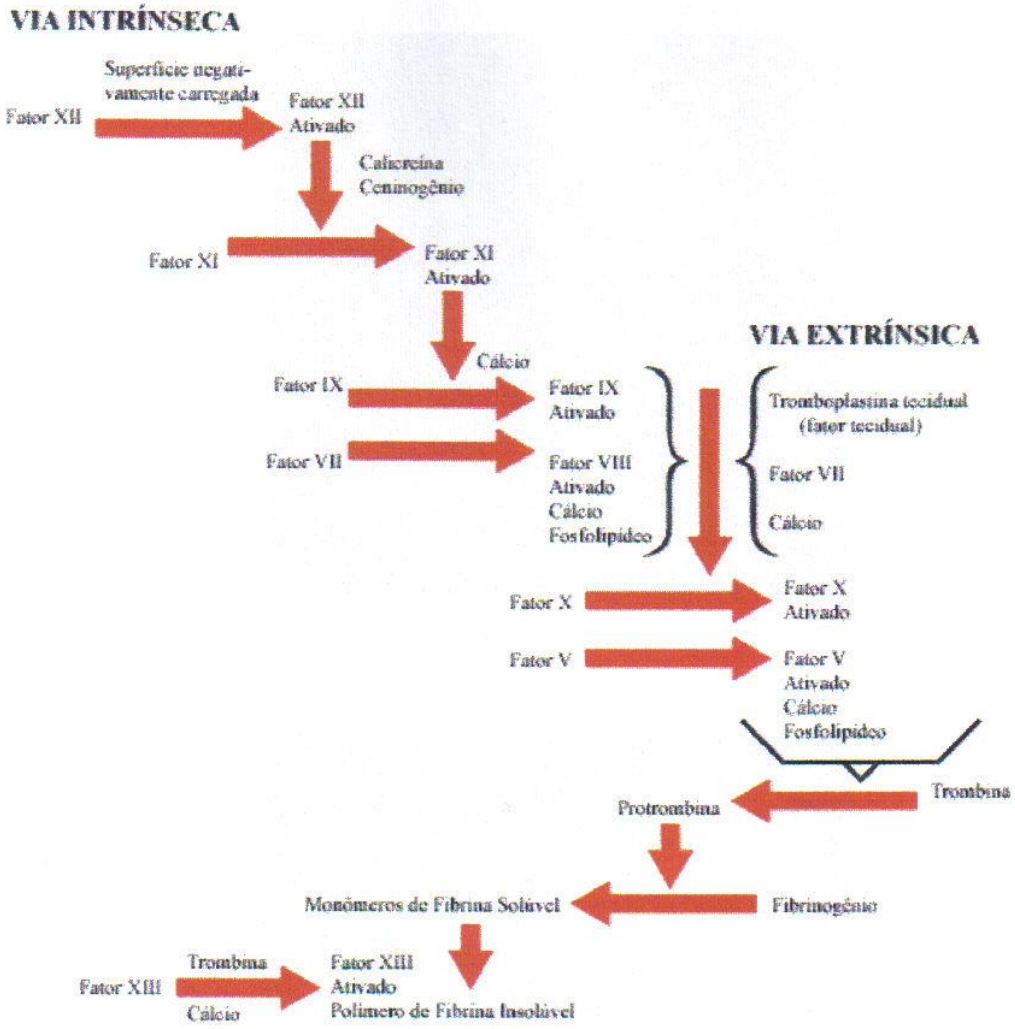
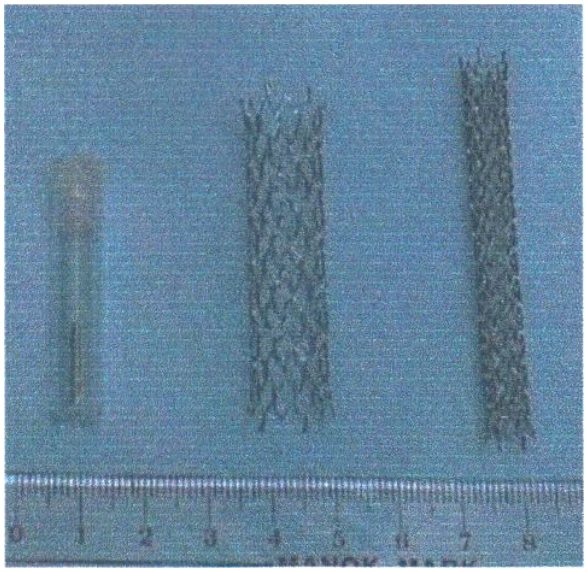
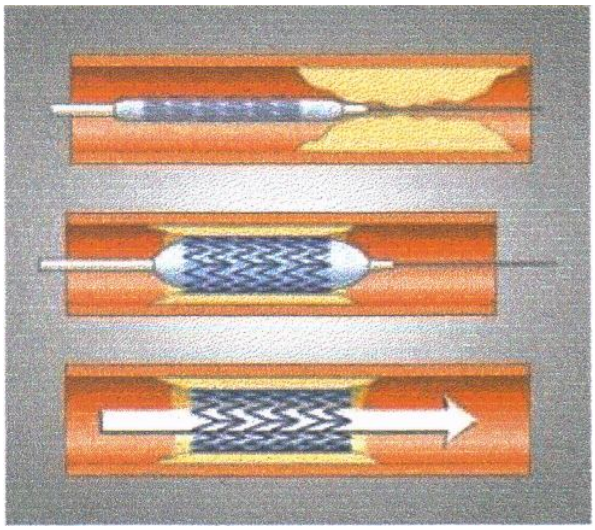


Figura 1- Representação esquemática do processo de coagulação do sangue.



(A)



(B)

Figura 2-Stent comumente utilizado na área cardiovascular (A) e seu princípio de funcionamento (B).

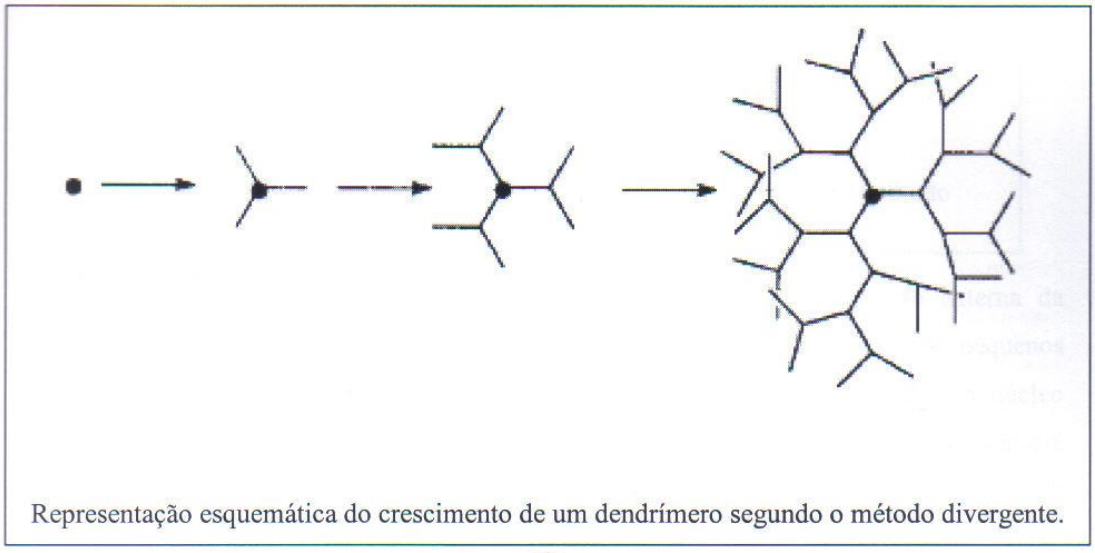
3
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLIGLICERÓIS DENDRÍTICOS

3.1- Introdução

A síntese de macromoléculas com estrutura dendrítica envolve uma reação de policondensacão controlada que utiliza uma estratégia sintética repetitiva. Desta maneira é possível um controle do peso molecular e do tamanho da macromolécula, o que produz polímeros isomoleculares.

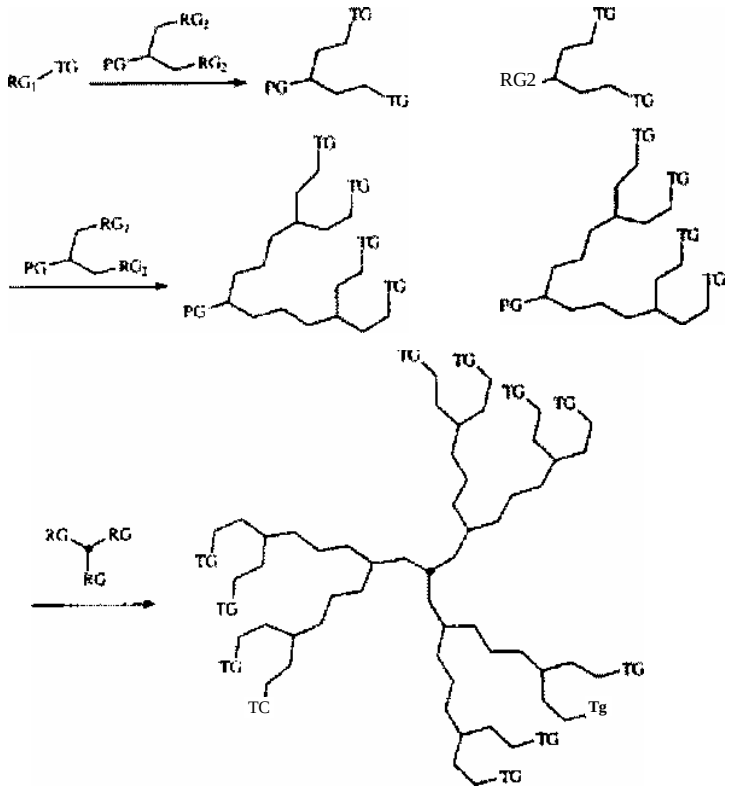
Os dendrímeros podem ser sintetizados a partir de duas metodologias a saber: a divergente ou convergente. Ambos os métodos fornecem estruturas altamente simétricas, hiper-ramificação, elevado grau de funcionalização terminal e monodispersão.[1,2]

O método divergente envolve o crescimento a partir de um núcleo central, onde as ramificações são justapostas através de etapas sintéticas repetitivas. Este método é caracterizado por reacões que ocorrem por um aumento do número de sítios reativos, como se o dendrímero estivesse sendo construído "de dentro para fora". O procedimento geral é ilustrado abaixo:



Representação esquemática do crescimento de um dendrímero segundo o método divergente.

Embora seja comumente utilizada para a obtenção de grandes quantidades de dendrímeros, o método de síntese divergente apresenta como principais inconvenientes as reações incompletas dos grupos terminais que introduzem defeitos na macromolécula. Para impedir a formação de defeitos, normalmente se utilizam grandes quantidades de precursores, o que dificulta a purificação do produto final.



Representação esquemática da síntese de um dendrímero pelo método convergente.

No método convergente a síntese principia pelo que gerará a superfície externa da macromolécula. O princípio básico do método envolve a construção de pequenos fragmentos denominados dendrons que sofrem policondensação e constituem o núcleo central e que evoluem para a formação final do dendrímero. O método convergente é ilustrado acima. O monômero de partida contém um grupo reativo (RG1) de um lado da

subunidade estrutural e um grupo terminal (TG) na outra extremidade formando na geração final, a camada externa do dendrímero. Esse fragmento pode, então, reagir com grupos reativos (RG2) da unidade de repetição, que também contêm sítios protegidos (PG). Depois da conversão para um novo grupo reativo (RGi) a síntese pode ser continuada por reação com uma segunda unidade de repetição. A repetição do ciclo de desproteção/reação leva à construção de grandes dendrons. A reação dos dendrons desprotegidos com grupos reativos (RG) de um núcleo terminal, constitui o dendrímero final.

Embora a formação de defeitos no dendrímero seja minimizada na rota sintética convergente e a purificação do produto final seja mais fácil relativamente à rota sintética divergente, o impedimento estético causado pêlos grupos volumosos na periferia do dendrímero impede a obtenção de sistemas de elevadas gerações.

3.2- Materiais e Métodos

3.2.1- Síntese do poliglicerol com estrutura dendrítica

Neste trabalho é descrita a obtenção do poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD) a partir da polimerização por abertura de anel do 2,3-epoxi-l-propanol (glicidol) utilizando-se a síntese divergente e um núcleo oligomérico de poliglicerol. A escolha do glicidol se deve à sua elevada reatividade em condições brandas de polimerização (baixa temperatura e pressão) e a propriedade de gerar poliéteres com elevada densidade de hidroxilas na superfície da macromolécula.

Inicialmente, um núcleo de poliglicerol (PGL) oligomérico foi preparado a partir da reação de eterificação da glicerina a 230 °C utilizando-se Na2CÜ3 (0.34% m/m) em atmosfera de nitrogénio e 50 mmHg de pressão. A água reacional foi destilada em um equipamento Dean-Stark.

O poliglicerol (PGL) obtido foi purificado destilando-se a glicerina não reagida sob pressão reduzida (o ponto de ebulição da glicerina a 10 mmHg é de 160,8 °C). Após 23 horas de reação o rendimento do processo foi de 70,8%.

Após transferência do poliglicerol (PGL) para um reator tipo tanque agitado (CSTR) em aço inox 316 NL provido de um agitador tipo âncora (400 rpm), o sistema foi mantido sob vácuo a 100 °C por 24 horas para remoção da umidade residual (<0,01% m/m, avaliada por Karl Fischer). O sistema reacional foi alimentado lentamente (vazão 0,1 mL.min^{-1}) com glicidol (50 mL) parcialmente desprotonado com metilato de potássio (3,7 M, Fluka). A temperatura do sistema reacional foi mantida em 90 °C durante 12 horas de processo. Após conversão total, o poliglicerol dendrítico (PGLD) foi dissolvido em metanol e neutralizado após filtração em coluna trocadora de íons tipo catiônica. Após purificação por diálise em membranas de acetato de celulose para remoção de poliglicerol não reagido. O PGLD obtido foi seco em seguida sob vácuo por 15 h a 80 °C (10 mmHg). O rendimento do processo para obtenção do PGLD foi de 95%.

3.2.2- Controle da Reação de polimerização

A reação de polimerização foi acompanhada através de medidas do índice de refração do sistema reacional utilizando-se um laser de HeNe (X = 632,8 nm, potência 10 mW). O princípio básico do método baseia-se na variação do índice de refração do sistema reacional com o avanço da reação de polimerização.

Quando a luz laser incide no sistema reacional onde se processa a reação de síntese do dendrímero, a relação entre a fração de luz refletida e a transmitida é dada pela lei de Snell:[3]

$$\eta \frac{\operatorname{sen} i}{\operatorname{sen} r} \qquad \textbf{(1)}$$

sendo η, i, r o índice de refração do meio e os ângulos de incidência e refração, respectivamente.

O experimento para monitoração do índice de refração em função do tempo é esquematizado na Figura 1. À medida que ocorre a formação do dendrímero o índice de refração do meio reacional varia proporcionalmente à posição (Y) da luz laser no anteparo.

O índice de refração *(η)* do sistema reacional é relacionado ao ângulo de refração (r)

$$r = \text{sen}^{-1}\left(\frac{4-\eta^2}{3\eta^2}\right)^{1/2} \qquad \textbf{(2)}$$

por:

Do triângulo DCE na Figura l, pode ser demonstrado que:

$$\frac{\theta}{2} + (180^o - r) + (i - r) = 180^o \qquad \textbf{(3)}$$

θ = 4r-2i.

Da Figura l, observa-se que:

$$\theta = \frac{Y}{X} \qquad \textbf{(4)}$$

Uma vez que X não varia significativamente durante o experimento, tem-se que Y é proporcional a tan 6. Portanto, o deslocamento no feixe de laser a ser medido durante o

$$Y\alpha \tan\theta\left[4\,\text{sen}^{-1}\left(\frac{4-\eta^2}{3\eta^2}\right)^{1/2} - 2i\right] \qquad \textbf{(5)}$$

experimento é dado por:

A expressão (5) demonstra que a deflexão na luz laser será proporcional ao índice de refração do meio.

A reação para a obtenção do dendrímero de poliglicerol pode ser considerada um sistema ternário formado por glicidol *(X1),* glicerina (X2) e o poliglicerol (X3). Portanto, o índice de refração *(η)* do sistema é dado por:

η = X1 η 1 +X2 η 2+ X3 η 3 (6)

sendo que *X1, X2* e *X3* representam as frações molares do glicidol, glicerina e dendrímero, respectivamente.

Considerando que a reação de formação do dendrímero é do tipo A—»B, o índice de refração (r|) de um dado sistema reacional pode ser escrito como:

$$\eta = \eta_A[A] + \eta_B[B] \quad (7)$$

sendo $\eta_A[A]$ e $\eta_B[B]$ as contribuições das espécies A e B participantes do sistema reacional. Portanto, a contribuição de A para o índice de refração do sistema reacional diminui enquanto que a contribuição de B para η do sistema aumenta em função do tempo.

Considerando a reação polimerização do glicidol como sendo de primeira ordem (ou pseudo-primeira ordem), reescreve-se a equação (7) como:[4,,6]

$$\eta = \eta_A.[A]_{t=0}\, e^{-kt} + (1 - e^{-kt})\, \eta_B.[A]_{t=0} \quad (8)$$

sendo $\eta_A.[A]_t$=o definido como o índice de refração (η) no tempo t e $\eta_B.[A]_t$=o representa η em t = co.

Assumindo conversão total na reação de polimerização, a equação (8) pode ser reescrita como:

$$\eta = \eta_{t=0}\, e^{-kt} + \eta_{t=\infty}(1 - e^{-kt}) \quad (9)$$

ou

$$(\eta - \eta_{t=\infty}) = (\eta_{t=0} - \eta_{t=\infty}).\, e^{-kt} \quad (10)$$

O porcentual de conversão para a obtenção do dendrímero pode ser escrito como:

$$\%\text{Conversão} = \left(1 - \frac{[M]}{[M]_o}\right).100 \qquad (11)$$

sendo [M] e $[M]_0$ a concentração de glicidol no tempo t e t = O, respectivamente.

Portanto, combinando as equações (10) e (11) o porcentual de conversão de monômero a polímero pode ser calculado através da expressão:

$$\%\text{Conversão} = \left(1 - \frac{\eta - \eta_{t=\infty}}{\eta_{t=0} - \eta_{t=\infty}}\right).100 \qquad (12)$$

A equação (12) permite o controle da reação de obtenção do dendrímero em tempo real, bastando para tanto, a medida da deflexão do feixe de laser em função do tempo.

3.2.3- Caracterização físico-química do dendrímero obtido

A estrutura dendrítica do poliglicerol foi caracterizada utilizando-se técnicas reológicas e espectroscópicas 1H-NMR, ^{13}C-NMR).

A ressonância magnética nuclear de próton (^{1}H-NMR) e carbono (^{13}C-NMR) foi efetuada em um espectrômetro Bruker 500 MHz utilizando-se como solvente o dimetilsulfóxido deuterado (^{d}DMSO).

As características reológicas do PGLD foram determinadas em um viscosímetro de placas rotatórias (reômetro Reologica Streesstech, duas placas de 20 mm) a 100 °C.

A temperatura de transição vítrea (T_g) do PGLD foi determinada utilizando-se a calorimetria exploratória diferencial em um equipamento Perkin-Elmer DSC 7 em atmosfera de nitrogénio (40 mmHg) e velocidade de aquecimento de 5 K.min^{-1}. O intervalo de temperaturas explorado foi de -110 °C a 80 °C. A amostra foi aquecida de -110 °C até

80 °C e em seguida resfriada rapidamente até -110 °C. Atingido o equilíbrio térmico, a amostra foi submetida a novo aquecimento nas mesmas condições e novamente resfriadas até -110 °C. Uma última corrida foi então efetuada, até a temperatura de 80 °C, e registrada. O peso molecular e a polidispersividade do PGD foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC). Na análise por GPC, dimetilformamida com 0,2 % LiBr (m/m) foi utilizado como eluente (fluxo 1,0 mL.min"[1], pressão 550 psi). Poli(etileno glicol) (PEG) de pesos moleculares 194, 960, 4.250, 18.600, 64.700 e 450.000 g/mol foram utilizados para construção da curva de calibração. O sistema analítico consistiu de um cromatógrafo HPLC 510 da Waters equipado com detector 2414 (índice de refração). Foram utilizadas colunas PLgel acoplada em série (10.000 Á+1000 Â + 100 Á, tamanho de partícula de 5(jm). O volume de injeção da amostra foi de 20 *JiL*. A aquisição e tratamento dos dados cromato gráficos foram efetuados com software S W da Waters Breeze 3.3.

O índice de hidroxila (NOH) do poliglicerol dendrítico (PGLD) foi determinado após acetilação do polímero (0,5-0,6 g) com 10 niL de uma solução de anidrido acético/piridina (1:9). Após refluxo por 30 minutos a solução resultante foi titulada com NaOH 1,0 M utilizando-se fenolftaleína como indicador. O NOH foi calculado de acordo com:[8]

$$N_{OH} = \frac{(V_2 - V_1)x56,11}{m} \quad mgKOH.g^{-1}$$

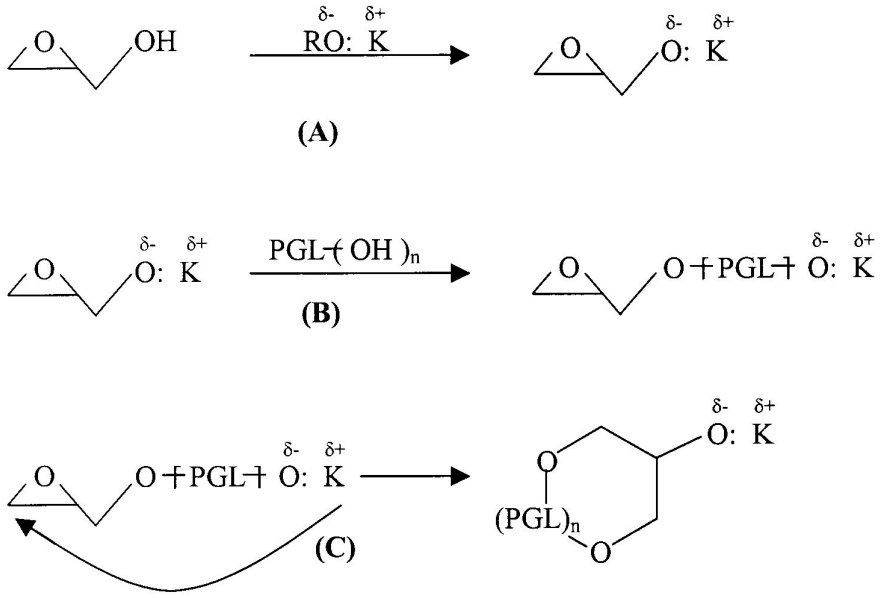
sendo Vi o volume de NaOH utilizado na titulação de um branco, V2 o volume de NaOH utilizado na titulação da amostra e m a massa de PGLD empregada.

3.3- Resultados e Discussão

É bem conhecido na literatura que polióis tendem a sofrer eterificação na presença de catalisadores como NaOH, Na2COs, CaO e elevadas temperaturas originando poliéteres. O processo de eterificação em meio alcalino não é seletivo exigindo portanto, um longo tempo reacional e atmosfera inerte para inibir-se a formação de acroleína.

A Figura 2 mostra o percentual de conversão da glicerina em poliglicerol oligomérico em função do tempo. Percebe-se que uma massa molecular limite de 450 g.mol"[1], equivalente ao

hexaglicerol foi obtido após 23 horas de reação.Após reação de policondensação, o poliglicerol (PGL) foi caracterizado por espectroscopia vibracional. A Figura 3 apresenta o espectro no infravermelho (FTIR) do PGL sintetizado.Observa-se uma significativa alteração na região de 1300-1000 cm" do espectro vibracional como consequência da reação de eterificação da glicerina.A segunda etapa do processo reacional envolve a obtenção de um alcoóxido como iniciador do processo. Neste caso, um alcoóxido é obtido pela reação de metalação do glicidol de acordo com a



Mecanismo de desprotonação do glicidol (A), propagação (B) e ciclização (C).

reação:

A reação de abertura de anel leva à formação de um alcoóxido como sítio ativo que propaga-se anionicamente. A reação de ciclização é indesejável uma vez que tende a formar compostos de baixo peso molecular além de levar à obtenção de materiais altamente polidispersos no peso molecular. A reação de ciclização do precursor oligomérico pode ser inibida adotando como variáveis de controle a parcial desprotonação (-10%), baixa concentração e a lenta adição do glicidol durante o processo de polimerização.A Figura 4 ilustra o percentual de conversão em função do tempo para a reação de obtenção do poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD). A análise dos resultados obtidos indica que a polimerização segue uma cinética de primeira ordem clássica.

O peso molecular médio e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros de maior importância para a determinação e explicação do comportamento físico destes sistemas macromoleculares .Dendrímeros de peso molecular muito baixo geralmente não apresentam as propriedades mecânicas desejáveis para a área médica enquanto que os de peso molecular muito elevado são muito pouco solúveis e geralmente, não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas.A cromatografia de permeação em gel (GPC), uma técnica que tem sido destacada como fundamental para a ciência macromolecular, é uma técnica de separação introduzida por Moore em 1964 para a determinação da distribuição de pesos moleculares de um polímero.[9]

A Figura 6 mostra a análise por GPC de um poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD) obtido após 12 horas de processo a 90 °C. O dendrímero mostra uma distribuição de peso molecular monomodal e um baixo índice de dispersão no peso molecular (M_n/M_w=l,05).O controle do peso molecular bem como a polidispersividade de dendrímeros utilizando como iniciadores alcoóxidos polifuncionais geralmente é problemático devido a uma forte tendência em se formar agregados devido a associação de grupos terminais, mesmo quando se utilizam solventes polares. Conseqüentemente, o controle do peso molecular é significativamente limitado e uma distribuição multimodal no peso molecular da macromolécula é observado. Considerando um baixo grau de desprotonação, a velocidade de polimerização do glicidol poderia ser descrita por:[11]

$$\frac{d[Gl]}{dt} = k[RO:^-][ROH][Gl] \qquad (19)$$

sendo [RO:~], [ROH] e [Gl] as concentrações do alcoóxido, poliglicerol e glicidol, respectivamente.

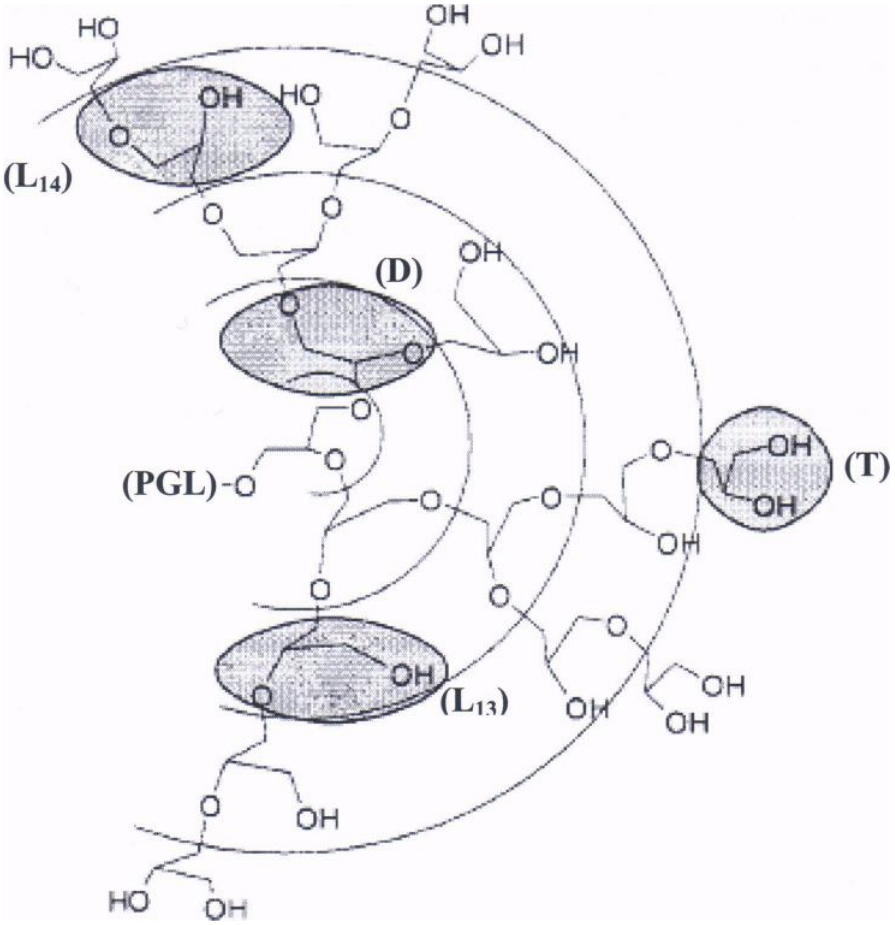
Portanto, a equação (19) mostra que a velocidade de polimerização é controlada pelas concentrações do glicidol, alcoóxido e grupos hidroxila. Estudos da literatura demonstram que um controle da razão concentração do epóxido/concentração de um poliol não permite um controle preciso do peso molecular bem como do índice de polidispersão do polímero.

A obtenção de um poliglicerol de estrutura dendrítica monodisperso neste trabalho vem demonstrar que a parcial desprotonação de um poliglicerol utilizado como iniciador parece ser

uma rota sintética mais adequada para a síntese de poliglicerói dendríticos. Neste caso, um provável equilíbrio dinâmico entre alcoóxidos e grupos hidroxilas parece garantir a iniciação simultânea de todos os grupos alcoóxidos presentes no sistema reacional.Teoricamente seria de se esperar que a distribuição de pesos moleculares em uma polimerização aniônica seguisse uma distribuição de Poisson gerando portanto, sistemas monodispersos.

Substituindo os dados obtidos para o PGLD obtido neste trabalho a saber: M«20.000 g.mol"[1], M_c« 550 g.mol"[1], *M_m»59g.mo\~[J]*, M_t«16 g.mol"[1], n_c=12, n_m=2, obtém-se um número de gerações (G) para o PGLD aproximadamente igual a 5,0.

A utilização do poliglicerol (PGL) como núcleo de crescimento no processo de síntese divergente gera a estrutura dendrítica com uma elevada densidade de grupos hidroxila na periferia da macromolécula como ilustrado abaixo:



Estrutura esquemática do poliglicerol com estrutura dendrítica.. LH, Lia, D e T significam ligações lineares, estruturas dendríticas e grupos terminais, respectivamente.

A ressonância magnética nuclear representa uma importante ferramenta para a caracterização de estruturas dendríticas uma vez que a análise detalhada do espectro fornece informações acerca do grau de polimerização bem como da extensão da ramificação. A Figura 7 (A) ilustra o espectro de ^{13}C-RMN para o poliglicerol de estrutura dendrítica sintetizado neste trabalho. Quatro unidades estruturais podem ser distinguidas na estrutura dendrítica a saber: (a) Se a propagação ocorreu através de hidroxilas secundárias uma unidade linear do tipo 1,3 é formada (Li3), (b) Se hidroxilas primárias sofrem propagação, uma correspondente unidade linear 1,4 (Li4) é formada, (c) Se ambas as hidroxilas reagem com o monômero, uma unidade dendrítica (D) é formada e a cadeia polimérica e ligada a hidroxilas secundárias e, (c) Se o monômero sofre alguma desativação por troca de próton, uma unidade terminal (T) com duas hidroxilas é formada. A Tabela l indica as atribuições efetuadas ao espectro ^{13}C-NMR do dendrímero obtido neste trabalho. Os dados obtidos podem ser utilizados na determinação do grau de ramificação (GR) da macromolécula. O grau de ramificação é urna medida que indica a tendência das ramificações criadas durante a etapa de propagação em gerar estruturas dendríticas. Para estruturas lineares o grau de ramificação (GR) é igual a zero (GR=0), para uma reação de policondensação ao acaso GR=0,5 e finalmente para a formação de uma estrutura dendrítica, GR=1. O grau de ramificação pode ser calculado a partir das intensidades dos picos no espectro de C-NMR através da equação:

$$G_R = \frac{2D}{2D + L_{13} + L_{14}} \quad (31)$$

sendo GR o grau de ramificação e D, L13 e L14 representam as contribuições das frações dendríticas e lineares presentes no polímero, respectivamente.

O valor obtido neste trabalho, GR = 0,80 indica que a lenta adição do alcoóxido promoveu a formação da estrutura dendrítica.

O espectro H-NMR do PGLD (Figura 7-B) é menos informativo que o espectro de carbono mas pode-se notar claramente a incorporação do glicidol. Os sinais dos grupos metil e metileno a 0,9 e 1,4 ppm respectivamente são devidos ao glicidol. Os quatro prótons metilênicos e um próton relativo ao grupo metino do PGLD aparecem como uma larga ressonância entre 3,3 e 3,9 ppm. Os prótons relativos ao grupo OH geram um sinal a 4,8 ppm.

Uma macromolécula apresenta uma estrutura microscópica não linear onde dependendo da temperatura, diferentes estruturas podem coexistir em equilíbrio sendo que, no estado líquido ou fundido, as cadeias macromoleculares são caracterizadas pelo alto grau de liberdade.

Quando a massa viscosa e quente de um polímero fundido é deixada resfriar sem a interferência de forças externas, pode haver a formação de estruturas com certo grau de ordenação tridimensional, denominados cristalitos. Tais estruturas permanecem imersas em uma matriz amorfa que confere ao polímero um determinado grau de cristalinidade. Na ausência de forças externas, os cristalitos tendem a se formar ao acaso, não havendo uma direção preferencial ao longo da qual os cristalitos se disponham.

Um polímero pode existir em três estados físicos: vítreo, altamente elástico e fluído viscoso. É importante ressaltar que a passagem de um estado físico a outro não ocorre em uma temperatura definida mas em um certo intervalo de temperaturas onde existe uma variação gradual nas propriedades termodinâmicas do material. Neste caso os valores médios da temperatura na região de transição são denominados de temperatura de transição.[14]
A transição do estado do estado vítreo para o estado altamente elástico é denominada de temperatura de transição vítrea (T_g) e comumente se associa a este estado a estrutura de um líquido congelado. A temperatura de T_g é comumente associada a uma transição de fase de segunda ordem uma vez que os potenciais termodinâmicos são contínuos mas a primeira e segunda derivada são caracterizadas por exibirem uma variação brusca com a temperatura ou seja:

$$\frac{\partial^2 G}{\partial P^2} = \left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T ; \frac{\partial^2 G}{\partial P \partial T} = \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P ; \frac{\partial^2 G}{\partial T^2} = \frac{c_p}{T} \qquad (33)$$

A temperatura de transição vítrea pode ser medida experimentalmente pela calorimetria exploratória diferencial (DSC), uma técnica que tem sido amplamente utilizada na obtenção de informações relativas ao estado sólido das substâncias macromoleulares.[15] Neste caso; na transição de fase correspondente à temperatura vítrea (T_g) a técnica DSC exibirá uma resposta endotérmica correspondente a uma variação na capacidade calorífica do material. .

Embora exista uma certa controvérsia com relação ao equilíbrio de fases em um sistema macromolecular, existe um consenso no meio científico de que a T_g de um material polimérico está diretamente relacionado às interações intermoleculares de longo ou curto

alcance bem como interações intramoleculares na cadeia da macromolécula.[16]

A natureza da estrutura dendrítica com relação a existência de grupos funcionais polares ou apoiares na periferia da macromolécula exerce uma influência significativa nas propriedades macroscópicas do polímero destacando-se a temperatura de transição vítrea e seu comportamento reológico.

A Figura 8 mostra a curva DSC para o poliglicerol com estrutura dendrítica sintetizado neste trabalho. A baixa temperatura de transição vítrea observada (Tg=-20,2 °C) indica que o PGLD sintetizado é adequado para o revestimento de superfícies devido à sua elevada flexibilidade à temperatura ambiente, característica desejável para o revestimento de dispositivos cardiovasculares.

O comportamento reológico do PGLD é mostrado na Figura 9. Como pode ser observado, a macromolécula não apresenta pseudoplasticidade comportando-se como um fluído newtoniano. A dependência da viscosidade em função da tensão de cisalhamento pode ser associada a uma possível interação por ligação de hidrogénio na macromolécula. Como pode ser observado a mesma dependência é observada entre o número de hidroxila e a tensão de cisalhamento.

Tabela l- Análise do espectro de ^{3}C-NMR para o PGLD sintetizado neste trabalho. Solvente: ^{d}DMSO, temperatura: 25 °C.

Região da Molécula	Grupo funcional	Deslocamento (ppm)	Integral relativa
Li3	CH_2OH CH_2 CH	62,9 71,2 81,6	0,85
D	CH CH_2 CH_2	80,2 73,0 72,4	6,31
LI 4	CH_2 CHOH	74,0 70,9	2,12

T	CH_2OH CHOH CH_2	64,5 71,3 72,4	4,31

3.4- Referências Bibliográficas

1. NEWKOME G.R., MOOREFIELD C.N., VOGTLE F. ***Dendrimers and dendrons: concepts, synthesis, applications.*** New York, Wiley-VCH, 2001.
2. TOMALIAD.A. Dendrimer molecules. *ScLAm.* 272: 62-6, 1995.
3. KELLER, F.J.; GETTYS, W.E.; SKOVE, MJ. ***Physics*** New York, McGraw ffill, 1993. p. 412.
4. LI, Q.; WANG, D.; ELISSEEFF, J.H. Heterogeneous-phase reaction of glycidyl methacrylate and chondroitin sulfate: mechanism of ring-opening-transesterifi-cation competition. ***Macromolecules*** **36:** 2556-62, 2003.
5. NOLL, E.D. ***Phys.Teach.*** **11:** 307-, 1973.
6. SPENCER, B.; ZARE, R.N. ***J.Chem.Ed.*** **65:** 835, 1988. pp. 304-7.
7. ***The United States Pharmacopeia.*** Rockville (USA), USP Convention, 1985. NF XXIedition. pp. 1200-01.
8. SOLOMON, D.H. ***The chemistry of organic film formers.*** New York, John Wiley, 1967. pp. 90-93.
9. MOORE, J.C. ***J.Polym.Sci.A*** 2: 835, 1964.
10. COWIE, J.M.G. ***Polymers: chemistry & physics ofmodern materiais.*** New York, Chapman & Hall, 1991. pp. 210-3.
11. KNISCHKA, R.; LUTZ, P.J.; SUNDER, A.; MULHAUPT, R.M.; FREY, H. Functional poly(ethylene oxide) multiarm star polymers: core-first synthesis using hyperbranched polyglycerol initiators. ***Macromolecules*** 33: 315-20, 2000.
12. SANDLER, S.R.; KARO, W.; BONESTEEL, J.; PEARCE, E.M. ***Polymer synthesis and characterízation.*** New York, Academic Press, 1998. p.143.
13. TOMALIA D.A., NAYLOR A.M., GODDARD W.A. Starbust dendrimers: molecular levei control of size, shape, surface chemistry, topology and flexibility from atoms to macroscopic matter. ***Angew.Chem.Int.Ed.*** **29:** 138-75, 1990.

14. TAGER, A. ***Physical chemistry ofpolymers.*** Moscow, Mir Publishers, 1972. p. 130-34.

15. McNAUGHTON, J.L.; MORTMER, C.T. ***Calorimetria diferencial de barrido.*** New York, Perkin Elmer, 1975.

16. IBAR, J.P. Do we need a new theory in polymer physics? ***J.M.S. Rev.Macromol.Chem.Phys.*** C37(3): 389-458, 1997.

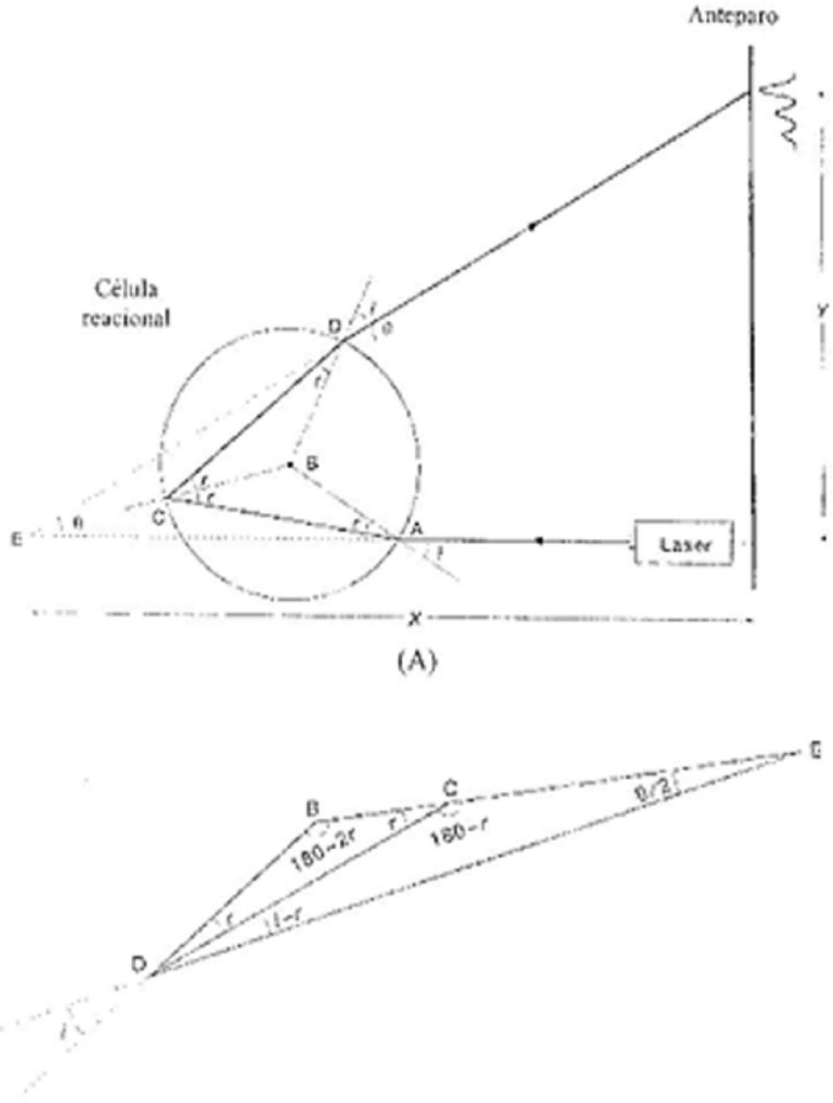


Figura 1- (A)-Trajetória do laser através da célula reacional. Os ângulos de refração incidência são definidos por r e i, respectivamente. (B)- Elucidação das relaç geométricas na célula reacional.

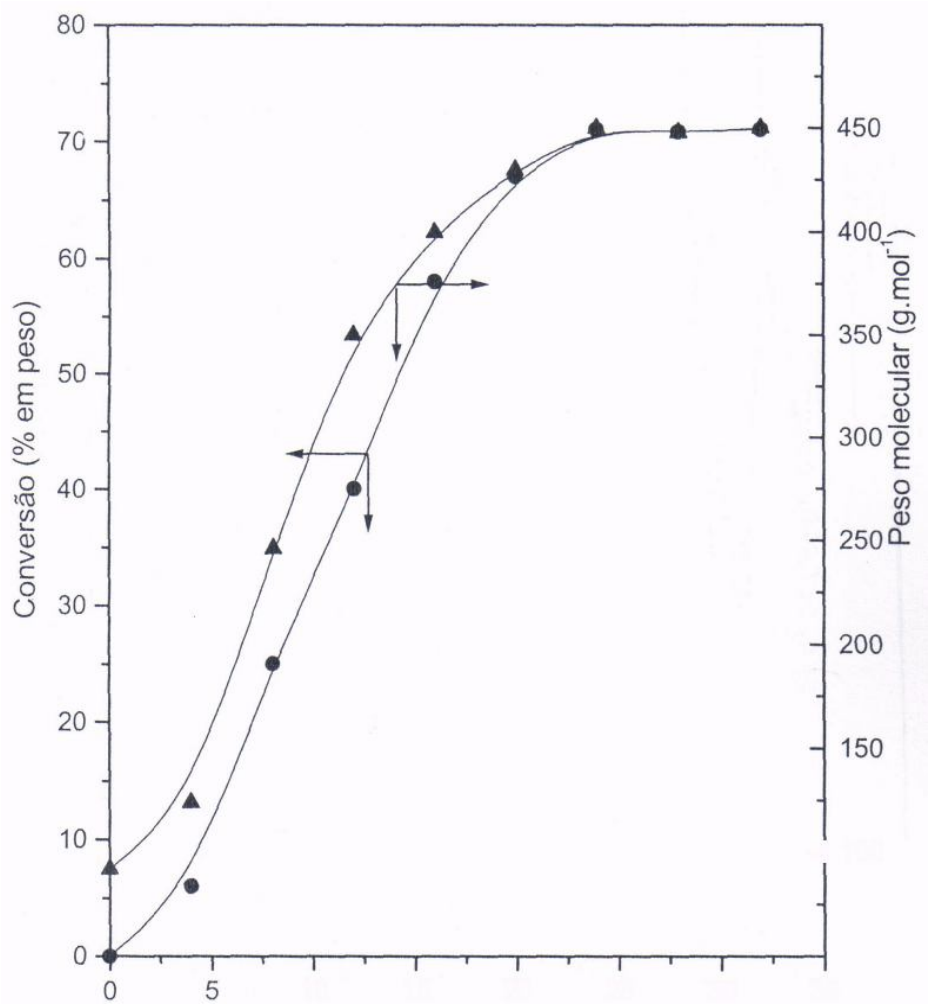


Figura 2- Percentual de conversão de glicerol em poliglicerol e sua influencia no peso molecular.

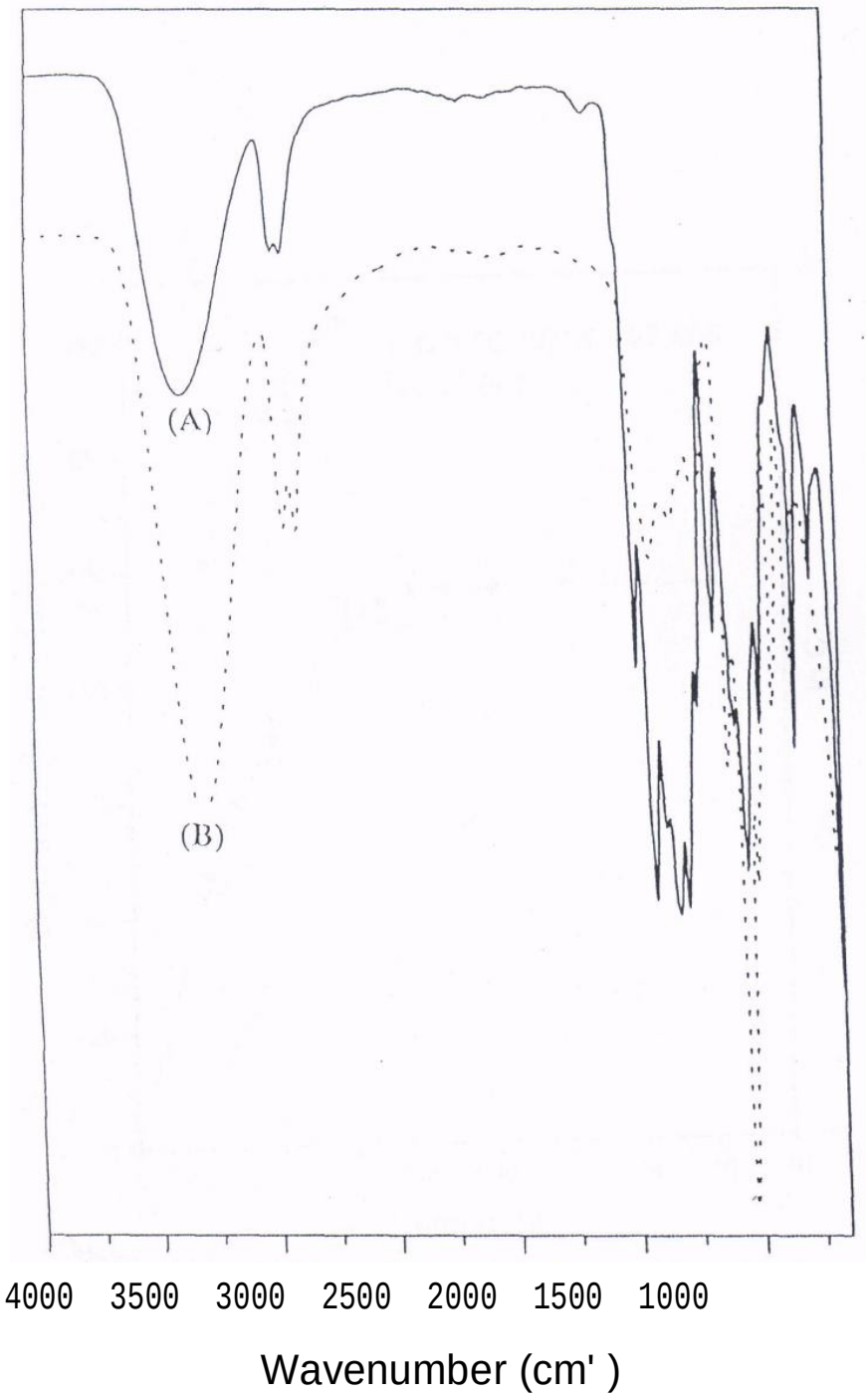


Figura 3- Espectro vibracional (FTIR) do glicerol (A) e do poliglicerol (B). Espectro obtido em pastilhas KBr à temperatura ambiente.

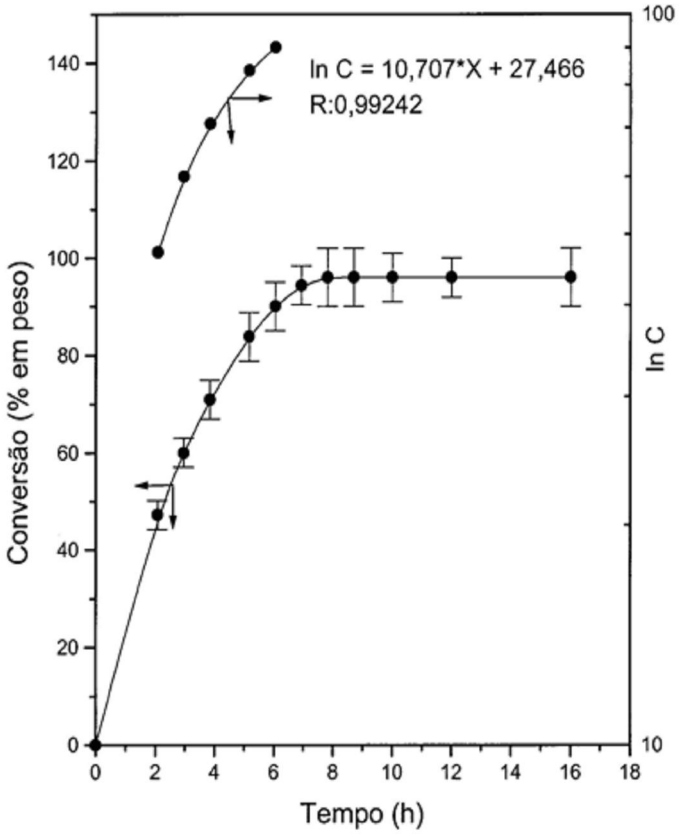


Figura 4- Cinética de polimerização do PGL para obtenção do PGLD. Temperatura: 90 °C.

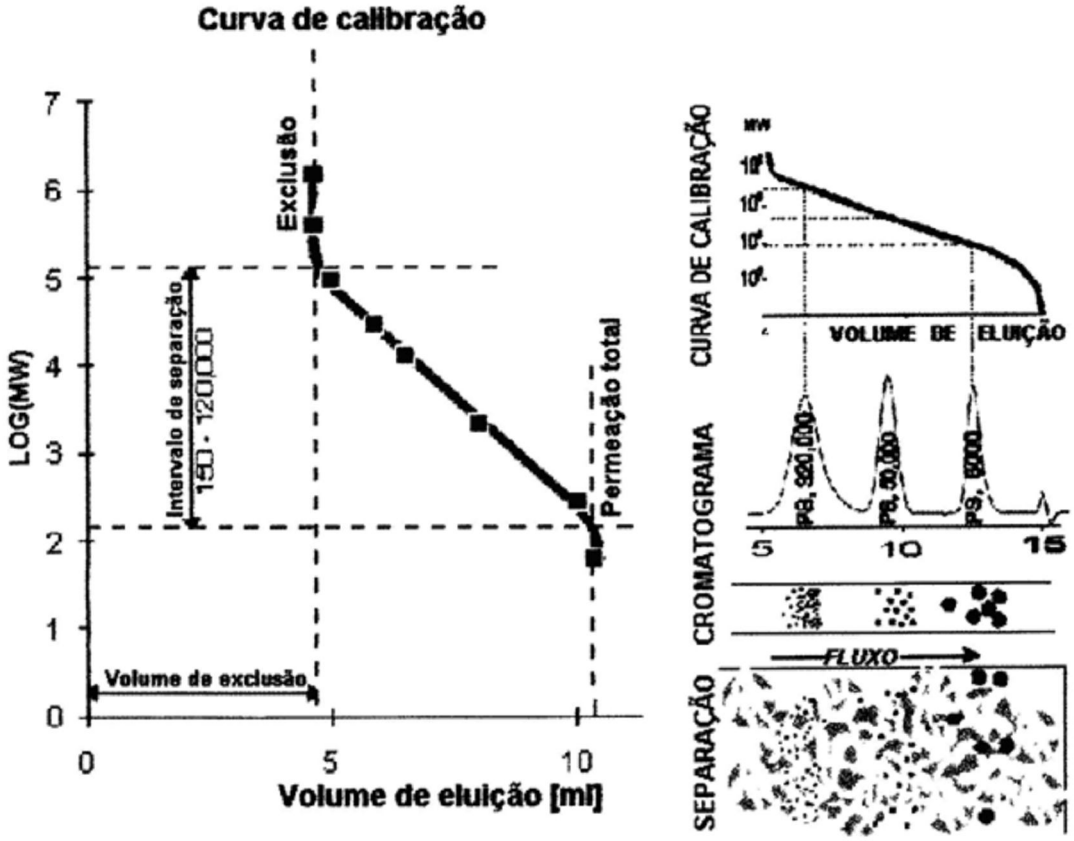
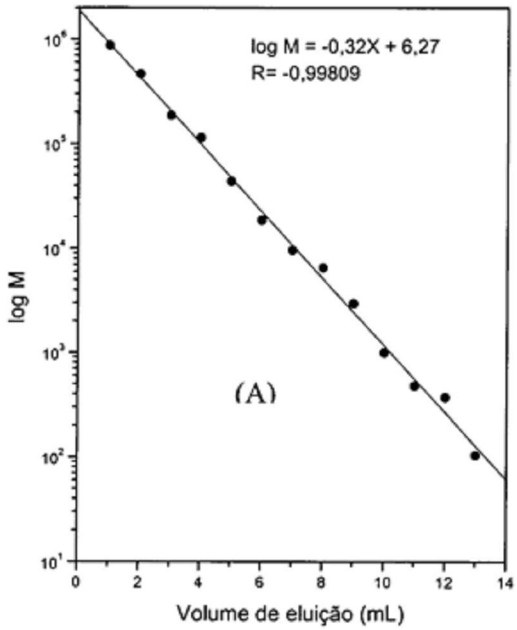


Figura 5 – Fundamentos da cromatografia de permeação em gel (GPC).



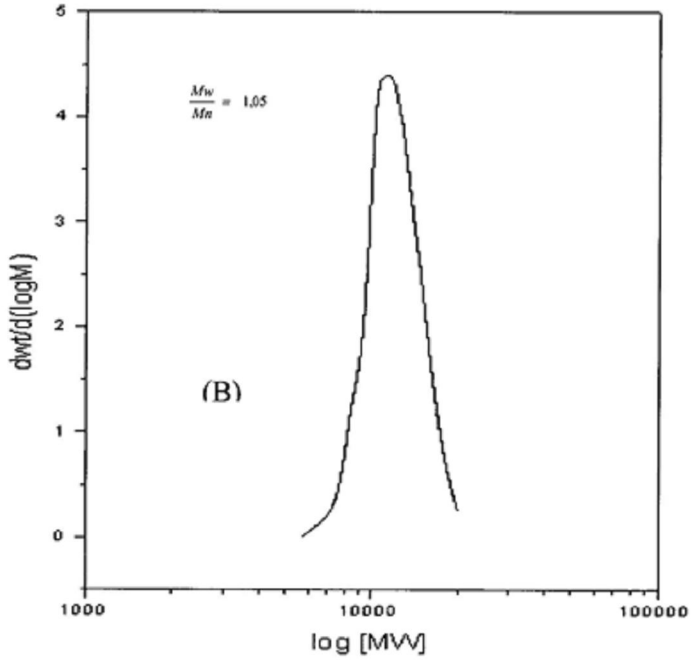


Figura 6- Curva de calibração (A) e análise por GPC do PGLD (B) obtido após 12 horas de

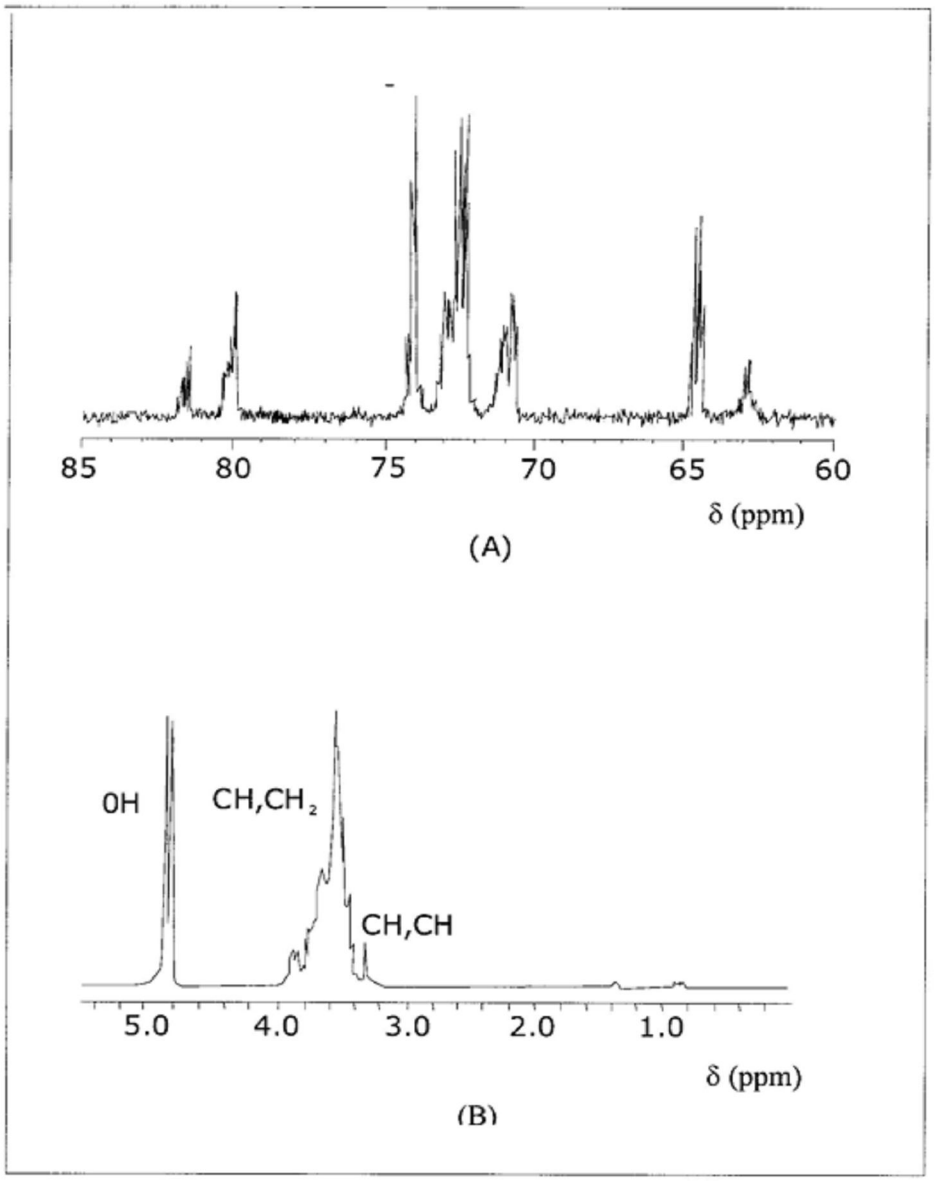


Figura 7- Espectro ^{13}C-NMR (A) e ^{1}H-NMR (B) do PGLD sintetizado neste trabalho. Solvente : ^{d}DMSO, temperatura: 25 °C.

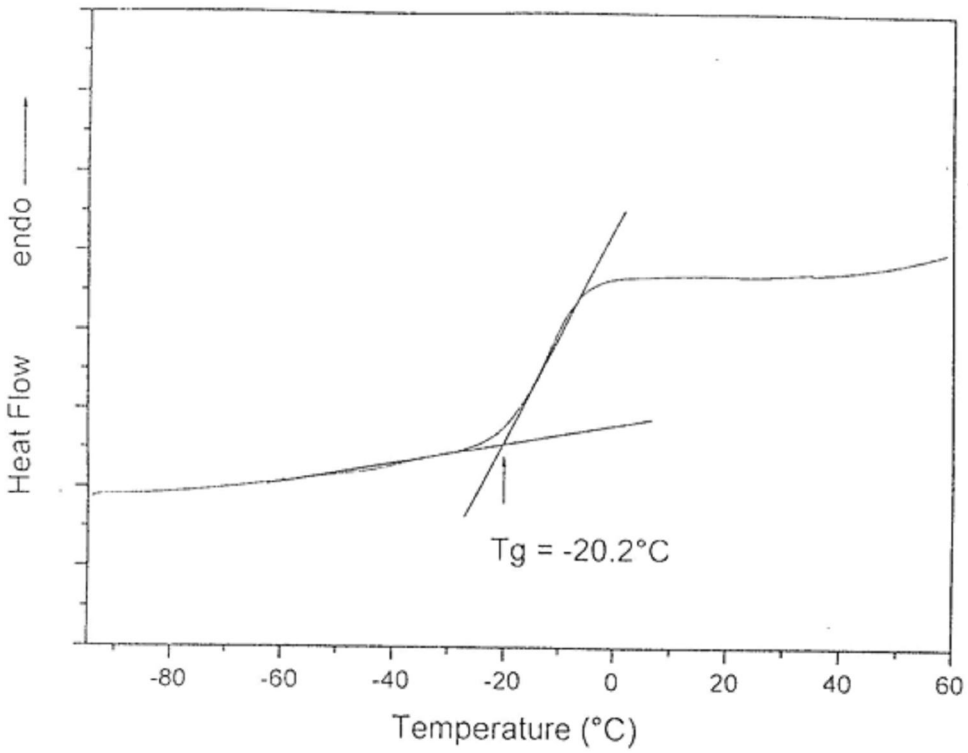


Figura 8- Análise calorimétrica (DSC) do PGLD sintetizado neste trabalho para determinação da temperatura de transição vítrea do polímero .

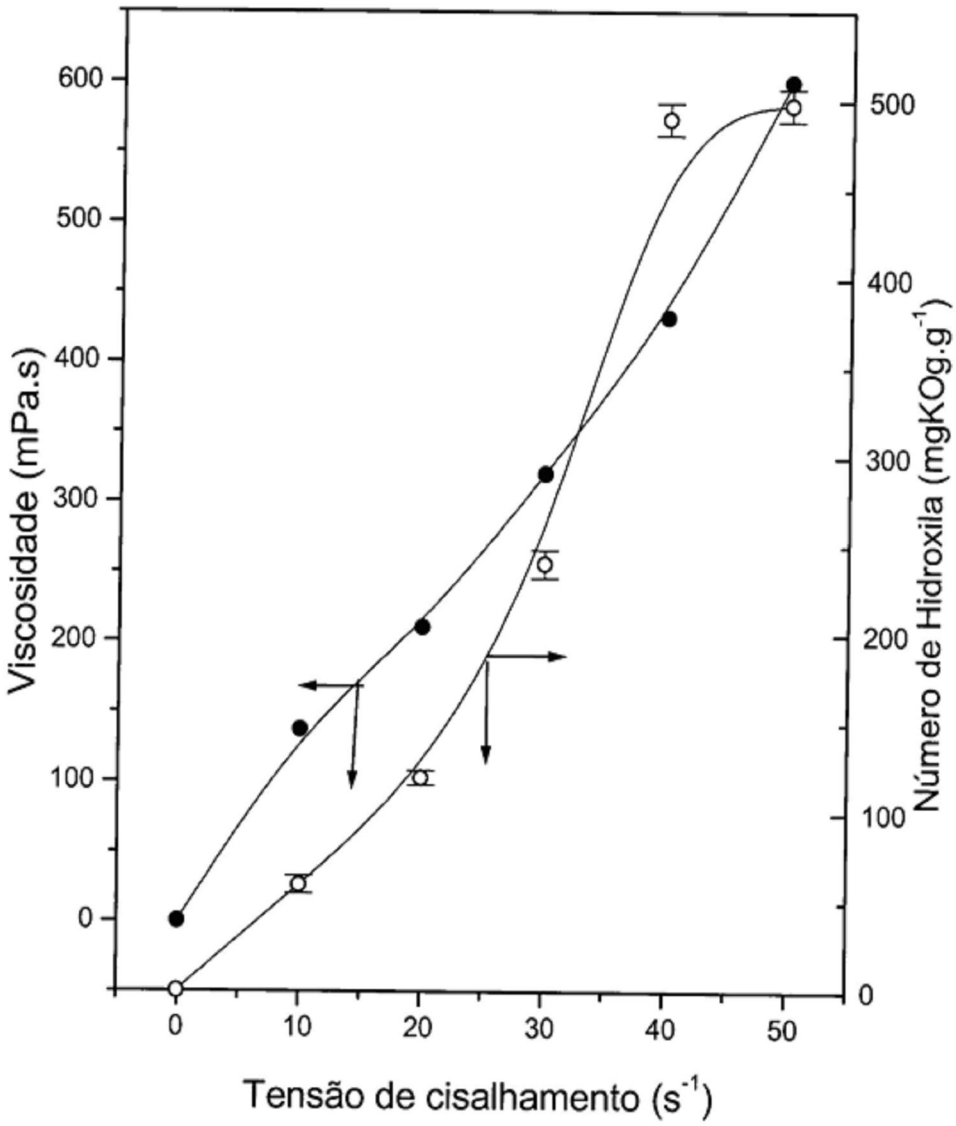


Figura 9- Comportamento reológico do polímero PGLD.

4
OBTENÇÃO DE REVESTIMENTOS DENDRÍTICOS COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

4.1- Introdução

Nossos trabalhos anteriores demonstraram que, devido à sua energia livre de superfície (y_c = 30-32 dinas.cm"[1]) e hidrofobicidade (ângulo de contato 6«90°), o polietileno apresenta significativa trombogenicidade quando colocado em contato com o sangue humano.[1,2]

Várias técnicas surgiram na literatura com o objetivo de modificar a superfície do .polietileno objetivando a obtenção de materiais hidrofílicos destacando-se a copolimerização por enxertia induzida pela radiação ionizante e o tratamento por plasma.[3]

Embora o tratamento superficial com plasma esteja mais próximo da realidade industrial relativamente ao uso da radiação ionizante, um controle preciso da microestrutura e as reações secundárias na matriz polimérica restringem consideravelmente a técnica quando o objetivo é se projetar superfícies poliméricas biocompatíveis.

A utilização de superfícies poliméricas projetadas ao nível nano tecnológico é de fundamental importância quando se requer da superfície um caráter mimetizante dos sistemas biológicos neste caso, a baixa energia livre de superfície e, ao mesmo tempo, a hemocampatibilidade, uma propriedade específica da biocompatibilidade.

As propriedades fisico-químicas dos dendrímeros como estrutura globular, baixo índice de polidispersão no peso molecular, elevada densidade de grupos reativos em sua superfície e uma temperatura de transição vítrea projetada coloca as macromoléculas dendríticas em um horizonte altamente promissor e atraente para as a medicina e a biotecnologia químico-farmacêutica.

atualmente a tendência na área de biomateriais uma vez que não se tem conseguido nas últimas décadas um controle preciso a nível microestrutural das propriedades de superfície e massa (bulk) ao mesmo tempo.

A estrutura globular de macromoléculas dendríticas é atrativa no campo de revestimentos específicos para a área de biomateriais uma vez que tais estruturas mimetizam a topologia das proteínas, normalmente presentes no fluído biológico.

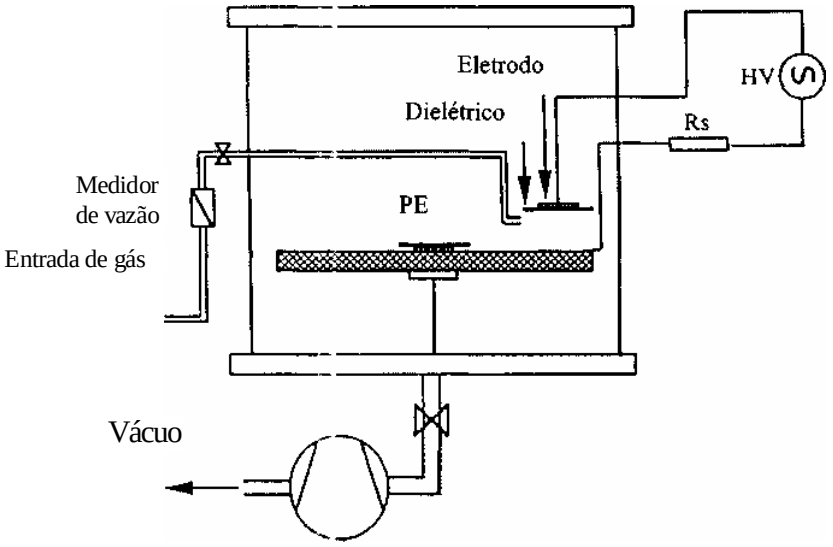
A utilização de rotas de síntese relativamente simplificadas para a obtenção de macromoléculas com estrutura dendrítica tem aberto um vasto campo dentro da bioengenharia no que concerne a obtenção de revestimentos estruturados ao nível de mono/multicamadas para aplicações em farmácia e medicina, destacando-se a obtenção de filmes finos para a obtenção de biosensores, sistemas de liberação controlada de fármacos, membranas para o tratamento de queimaduras, revestimentos com propriedades antimicrobianas e várias outras aplicações de interesse da biomedicina.[4,,9]

A elevada densidade local de grupos -OH existente na superfície do dendrímero PGLD sintetizado neste trabalho pode ser utilizada para a imobilização covalente da macromolécula dendrítica na superfície do polietileno de baixa densidade (PE) garantindo, desta maneira, um revestimento permanente na superfície da poliolefina *e* ao mesmo tempo, promovendo uma densidade de grupos funcionais que podem ser ativados para a imobilização de compostos bioativos quanto à hemocompatibilidade.

4.2- Materiais e Métodos

4.2.1- Funcionalização da poliolefina e revestimento com o PGLD

A fim de garantir uma boa adesão, tubos de polietileno de baixa densidade ((j>$i_n$temo= 3,0 mm <|>externo- 4 mm e 5 cm de comprimento) sofreram amonólise a fim de se introduzir grupos NÜ2 na superfície polimérica. A amonólise foi efetuada em um reator tubular de vidro de acordo com o esquema abaixo:



Esquema do reator de plasma a pressão atmosférica utilizado neste trabalho.

A pressão do reator foi ajustada através de um fluxo de Ar e NHa (20% em volume). As amostras de filmes de PE foram inicialmente colocadas na pré-câmara sendo transferidas para a região entre os eletrodos quando a pressão do sistema atingiu 8. l O"^{2} mbar. A mistura Ar/NHs foi injetada na câmara de plasma sob pressão de 1.10"^{6} mbar. Um pulso de radiofreqüência a 13,56 MHz foi aplicado aos eletrodos por 30 minutos a 20 °C. Após a exposição ao plasma os filmes permaneceram sob vácuo por 15 minutos para remoção do não reagido.

Após a reação de amonólise superficial, os tubos de PE foram colocados em contato com o dendrímero para acoplamento via reação de cianação catalisada por l-ciano-4-dimetilamino piridinium tetrafluoroborato (436 mM)/trietilamina (0,2M) a O °C e 30 minutos de reação.[10,11] A obtenção do revestimento de PGLD na superfície poliolefínica foi acompanhada pela técnica de Espectroscopia Eletrônica para Análise Química (ESCA). Esta técnica, também chamada de espectroscopia fotoeletrônica (XPS) é de fundamental importância para a caracterização da superfície de biomateriais quando se pretende obter informações sobre a composição química da superfície polimérica ao nível de 10-60 Â.[12]

O princípio da técnica é o efeito fotoelétrico, ou seja; ao ser bombardeada por fótons de raios-X monocromáticos (AlKa ou MgKa) um átomo superficial elimina um elétron orbital com uma energia cinética dada por:

$$E_L = hv - E_k \qquad (1)$$

sendo h a constante de Planck, v a frequência da radiação incidente, EL a energia de ligação do elétron e Ek sua energia cinética.

A medida da energia cinética permite o cálculo da energia de ligação e, consequentemente, o átomo na superfície polimérica é identificado. Neste trabalho foi utilizado um espectrômetro ESCA-36 da McPherson utilizando-se a linha AlKa dos raios-X emitidos. A pressão da câmara foi mantida em IO^{-8} Torr, sendo utilizado a energia de 284,6 eV correspondente ao Cl s para calibração do equipamento.

4.2.2- Imobilização da Estreptoquinase na superfície polimérica

Após reação de cianação do revestimento de PGLD, estreptoquinase foi imobilizada covalentemente na superfície dendrítica. Tubos de PE revestidos com o PGLD ativado foram colocados em contato com uma solução de estreptoquinase (Sk) em tampão PBS, pH 7,4 a uma concentração de 1,0 $mg.mL^{-1}$ a 4 °C por 8 horas. O acoplamento da estreptoquinase nas superfícies dendríticas foi seguido pelo método de Bradford.[1]

Após a reação de acoplamento da proteína (Sk) os tubos de PGLD-Sk-c-PE foram liofilizados para manutenção da atividade do componente biológico. O esquema do revestimento da poliolefina com o PGLD, da ativação química e do acoplamento da proteína é apresentado na Figura l.

4.3- Resultados e Discussão

O polietileno é um dos polímeros mais amplamente utilizado na área médica devido à sua excelente propriedade mecânica, fácil processabilidade e baixo custo. Entretanto, a hidrofobicidade bem como a propriedade de interagir desfavoravelmente com o sangue promovendo a adesão e ativação plaquetária limita enormemente a utilização desta poliolefina na biomedicina.

A boa adesão do revestimento de PGLD na superfície do PE requer uma elevada força interfacial via ligação química do dendrímero com a superfície da poliolefina. O tratamento superficial por plasma introduz grupos químicos ativos ($-NH_2$) na superfície do PE que permite o acoplamento covalente na superfície sintética; promovendo a obtenção de um revestimento suficientemente estável para as aplicações biomédicas.

A Figura 2 mostra o espectro XPS relativo aos picos de Cls e Ols após o revestimento da poliolefina com o PGLD. Observa-se uma intensificação no pico correspondente ao Ols, característico da introdução da estrutura dendrítica na superfície poliolefinica.

A homogeneidade do revestimento de PGLD foi estimado quantitativamente considerando a razão dos picos O l s/C l s, a partir dos espectros XPS. A Figura 3 mostra os valores da razão O l s/C l s em função do tempo para o acoplamento do dendrímero PGLD na superfície de PE. Pode-se observar o aumento na razão O l s/C l s, tendendo a um nivelamento em um determinado período de tempo. A saturação poderia significar que a distribuição do revestimento na superfície do PE aumenta em função do tempo. O patamar observado poderia ser um indício da distribuição homogénea do dendrímero PGLD na superfície sintética.

A Figura 4 mostra que no acoplamento da estreptoquinase na superfície de tubos de PE, o rendimento aumentou com a concentração da proteína em solução. Esta observação poderia ser associada ao processo incorporação da proteína na estrutura dendrítica que por possuir uma elevada densidade de grupos funcionais contribuem para o elevado percentual de acoplamento da proteína no revestimento dendrítico. A saturação observada pode indicar efeitos de impedimento estérico e difusionais da proteína na superfície dendrítica que limitariam o acoplamento da proteína na superfície sintética, conforme indicado pela queda acentuada na eficiência de acoplamento da proteína (Sk) em função de sua concentração em solução.

4.4- Referências Bibliográficas

1. DE QUEIROZ A.A.A., CASTRO S.C., fflGA O.Z. Adsorption of plasma proteins to DMAA hydrogels obtained by ionizing radiation and its relationship with blood compatibility. ***J.Biomaier.SciPolym.Edn.*** 8(5): 335-47, 1997.
2. DE QUEIROZ A.A.A., BARRAK E.R., GIL H.A.C., fflGA O.Z. Surface studies of albumin immobilízed onto PE and PVC fílms. ***J.Biomater.ScLPotym.Edn.*** 8(9): 667-81, 1997.
3. ABRAHAM G.A., DE QUEIROZ A.A.A. Métodos físicos, químicos, mecânicos y biológicos empleados en Ia modificación superficial de polímeros para aplicaciones industriales. ***Ver.Plast.Mod.*** 79(524): 169-78,2000.
4. LÊ BERRE, V.; TRÉVISIOL, E.; DAGKESSAMANSKAIA, A.; SOKOL, S.;CAMINADE, A.M.; MAIORAL, J.P.; MEUNffiR, B.; FRANCOIS, J.Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nudeic Acids Rés.* 31(16): e88.
5. YOON, H.C.; LEE, D.; KIM, H.S. Reversible affmity ínteractions of antibody molecules at fimctionalized dendrimer monolayer: affínity-sensing surface with reusability. ***AnaLChimActa*** **456:** 209-218, 2002.
6. HALKES, S.B.A.; VRASIDAS, L; ROOIJER, GR; van den BERG, AJJ.; LISKAMP, R.M.J.; PffiTERS, RJ. Synthesis and biological activity of polygalloyldendrimers as stable tannic acid mimics. ***Bioorg.Med.Chem.Lett.*** **12:** 1567-70,2002.
7. SNEJDARKOVA, M.; SVOBODOVA, L.; GAJDOS, V.; fflANIK, T. Glucose biosensors based on dendrimer monolayers. ***J.Mater.SciMater.Med.*** **12:** 1079-82, 2001.
8. TAM, J.P.; LU, Y.A .; YANG, J.L. Antimicrobial dendrimeric peptides. ***Eur.J.Biochem.*** **269:** 923-932, 2002.
9. SINGH, P. Starbust dendrimers : a novel matrix for multifunctional reagents in immunoassays. ***Clin.Chem.*** 42: 1567-69, 1996.

10. RATNER B.D., Chilkoti A., Castner D.G. Contemporary methods for characterizing complex biomaterial surfaces. ***Clinicai Mater.*** **11:** 25-36, 1992.
11. KOHN J, WILCHEK M. l-Cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate as a cyanylating agent for the covalent attachment of ligand to polysaccharíde resins. *FEBSLetters* 154(1): 209-210, 1983.
12. DE QUEIROZ A.A.A., VARGAS R.R., HIGA O.Z., RIBEIRO R.R., VÍTOLO M. Lactam-amide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization. ***J.Appl.Polym.ScL*** 84: 767-77, 2002.
13. BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principie of protein-dye binding. ***AnaLBiochem.*** 72: 248-54, 1976.

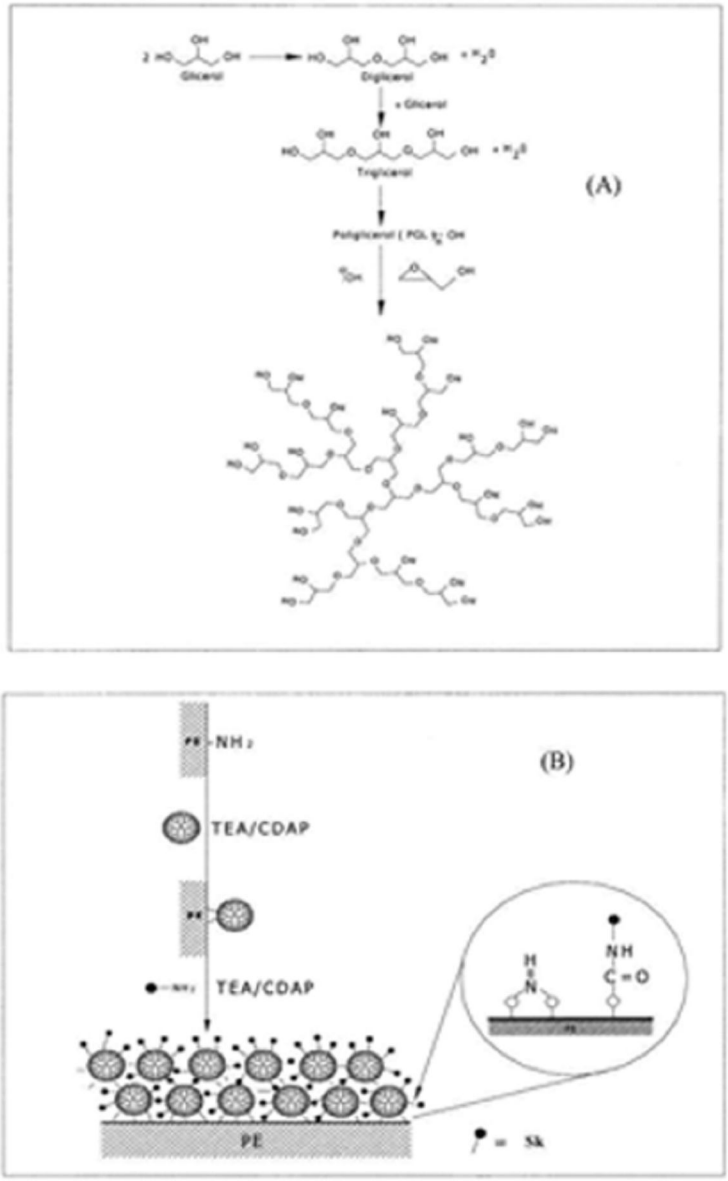


Figura 1- Esquema da reação de obtenção do PGLD (A) e acoplamento do bioconjuga
PGLD-Sk na superfície de poliolefina.

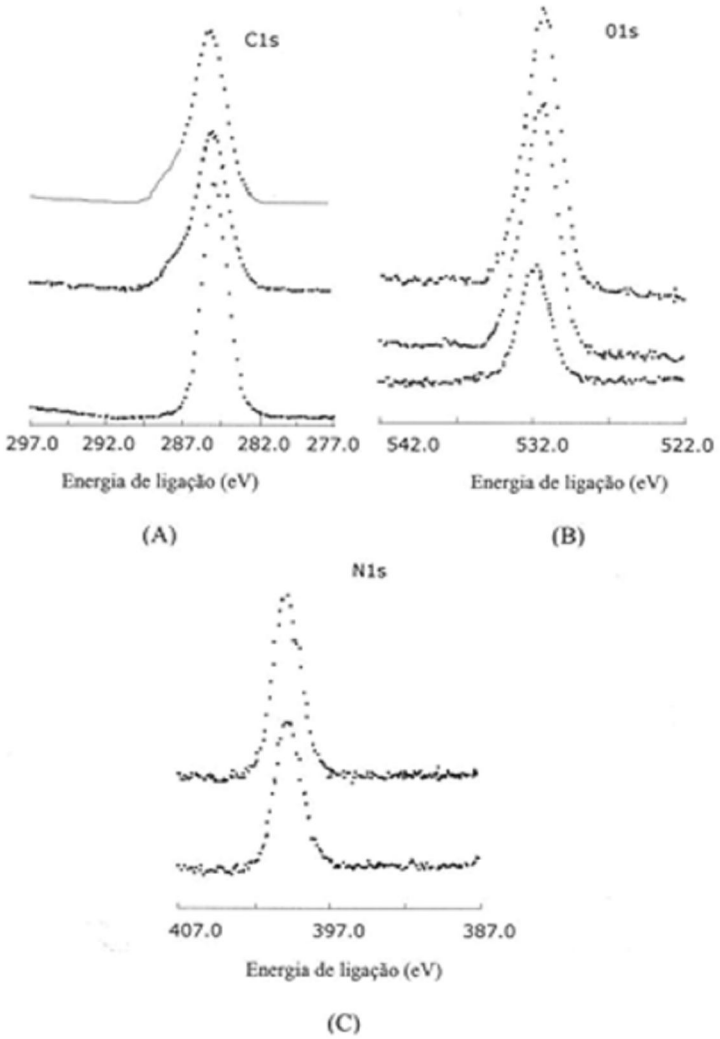


Figura 2- Espectros C1s, O1s e N1s para os tubos de PE revestidos com o poliglicerol de estrutura dendrítica: polietileno não revestido (A) e após revestimento com o PGLD (B,C).

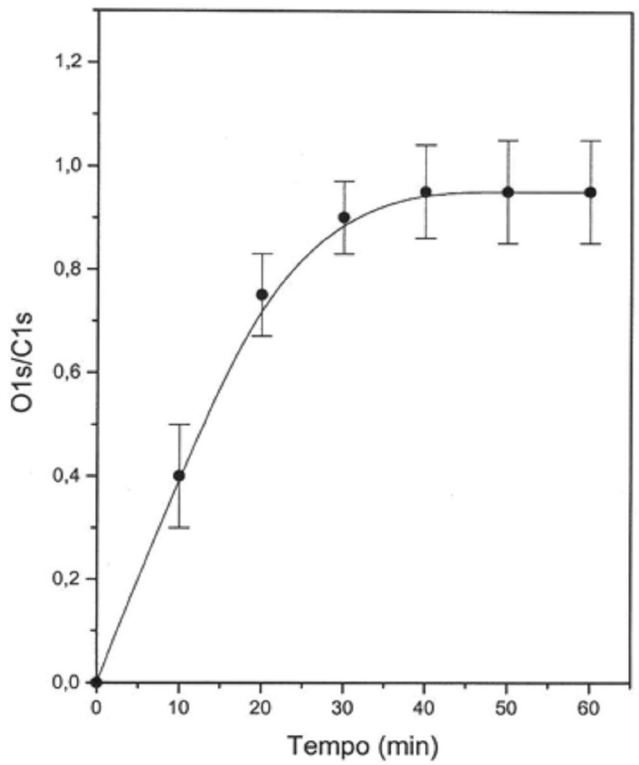


Figura 3- Evolução da razão O1s/C1s durante o revestimento de tubos de PE com o PGLD em função do tempo. Os resultados representam uma média de 3 medidas.

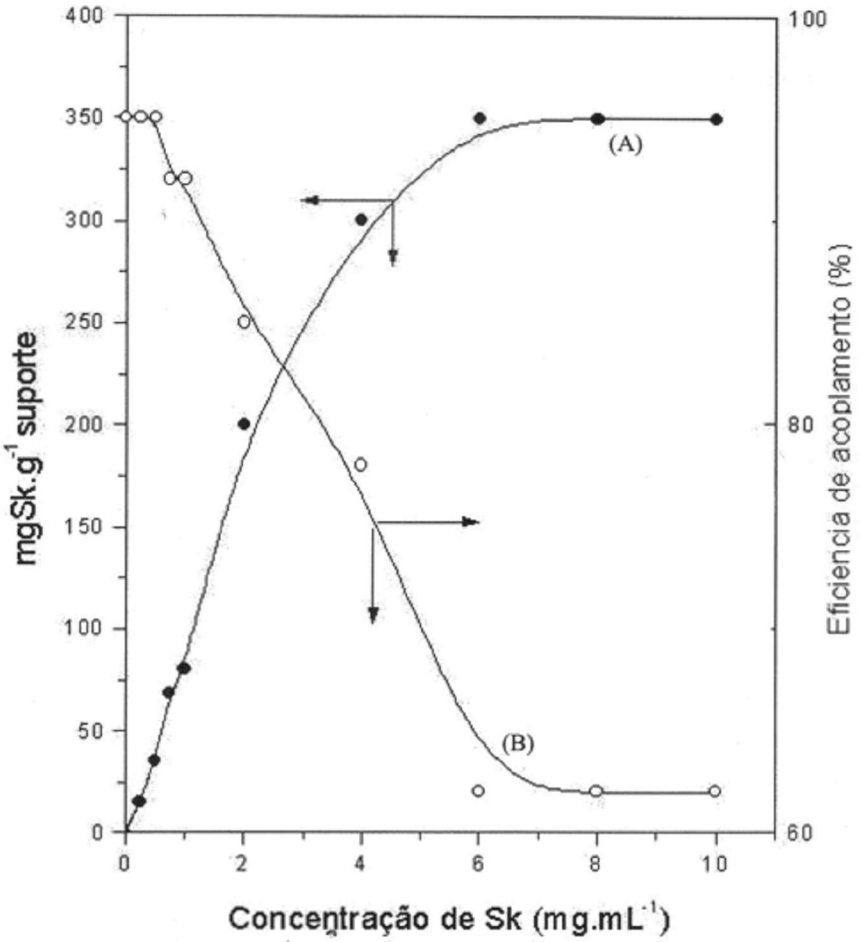


Figura 4- Quantidade de estreptoquinase imobilizada sobre PGLD-c-PE (A) e eficiência no acoplamento (B) em função da concentração de proteína.

PROPRIEDADES HEMOCOMPATÍVEIS *IN VITROIEX VIVO* DO SISTEMA PGLD-Sk

5.1- Introdução

O organismo humano tem um modelo de funcionamento que pode ser afetado por agressões de diversas naturezas. Qualquer situação, não identificada pelo organismo como normal ou fisiológica, pode despertar um conjunto de reações relacionadas aos mecanismos de defesa ou de compensação. O agente que desencadeia a reação é considerado o "agente agressor" e a reação do organismo à sua presença, é a resposta ao agente agressor.

A introdução no sistema biológico de um polímero sintético é identificado pelo organismo humano como um agente agressor, e como tal, suscita uma série de reações que leva a alterações significativas no equilíbrio fisiológico do organismo constituindo um agente agressor complexo e multifatorial.

As alterações induzidas pelo uso de materiais sintéticos na área cardiovascular são de natureza hemodinâmica, física, e química. A introdução de stents por exemplo, é uma condição anormal, em que o sangue está, continuamente, em contato com superfícies estranhas, não endoteliais. O aparecimento de um conjunto de alterações no sistema hemodinâmico é, provavelmente, devido a uma resposta ou reação inflamatória, desencadeada pela ativação dos sistemas do complemento e da coagulação, da cascata fibrinolítica bem como dos sistemas das cininas ou calicreina. Essa ativação dos sistemas humorais específicos, ocorre imediatamente após a introdução do dispositivo sintético e tem relação com a duração do implante.

No caso especificamente da área cardiovascular, o sangue pode circular através de tubos ou câmaras de material plástico sintético, rígido, apenas razoavelmente biocompatível aos quais faltam, obviamente; um revestimento interno com as propriedades do endotélio vascular.

Durante o contato com a superfície sintética, as células sanguíneas estão sujeitas à ação de diversas forças que diferem das forças que atuam na circulação normal. As hemácias, os leucócitos e as plaquetas podem ser profundamente afetados pelo contato com as superfícies da prótese sintética. Fenómenos como a adesão e agregação plaquetária são desencadeados, deprimindo significativamente a função das células sanguíneas.

As plaquetas desempenham importantes funções nos mecanismos de hemostasia e coagulação. É indispensável a presença de plaquetas na formação do coágulo. O contato do sangue com a superfície sintética pode levar a um processo de adesão e agregação plaquetária que, dependendo da superfície sintética; pode levar à ruptura da membrana com a liberação de diversas substâncias vasoativas no plasma, das quais a principal é o tromboxano A2, que se constitui no mais potente vasoconstritor conhecido. O tromboxano A2 é, em grande parte, responsável pela vasoconstrição que acompanha a circulação extracorpórea. A agregação plaquetária, por sua vez, libera mais difosfato de adenosina que continua a promover agregação plaquetária, num círculo vicioso.

Durante as últimas três décadas houve uma pesquisa intensa no sentido de se melhorar as relações entre o sangue e as superfícies sintéticas quer seja pela modificação química direta da superfície da prótese, revestimento da superfície sintética com anticoagulantes tais como a heparina, ou com camadas lipídicas múltiplas, na tentativa de simular o ambiente endotelial.

Com a evolução dos métodos sintéticos houve um crescimento significativo na utilização de próteses sintéticas na área cardiovascular. Ao mesmo tempo, vários métodos *in vitro* e *ex-vivo* foram desenvolvidos e padronizados nas últimas três décadas para a avaliação da hemocompatibilidade de materiais sintéticos potencialmente biocompatíveis. Neste sentido, destaca-se a norma ISO 10993-4 para a avaliação da hemocompatibilidade de biomaterials.[1]
Os ensaios *in vitro* são habitualmente efetuados como testes de triagem no início da avaliação de biocompatibilidade de materiais sintéticos e sua finalidade é a minimização da experimentação animal.

Os ensaios propostos neste trabalho para a avaliação da hemocompatibilidade das superfícies de polietileno revestido com o sistema poliglicerol dendrítico/estreptoquinase (PGLD-Sk-c-PE) são a adsorção protéica, adesão plaquetária, cinética de formação de trombos, estudo da atividade fibrinolítica e os parâmetros cinéticos da Sk imobilizada na superfície sintética.

5.2- **Materiais e Métodos**

5.2. l- Adsorção proteica

As proteínas albumina de soro humano (HSA) e fibrinogênio humano (Fb) foram marcadas com ^{125}I segundo o método de Hunter-Greenwood modificado por Biscayart.[2-3] Empregou-se 0,5-0,7 mCi (18,5-25,9 MBq) de radioisótopo, 20 ug de proteína em 30 jaL de tampão fosfato (PBS) 0,05 M, pH 7,4. A reação procedeu-se à temperatura ambiente por 5 minutos adicionando-se em seguida 5 μg de metabissulfito de sódio em 5 μL do mesmo tampão PBS 0,05M. A purificação da proteína marcada foi feita por filtração em gel Sephadex G-100 para o BSA e G-250 para o fibrinogênio. Para um cálculo preciso dos coeficientes de distribuição dos picos radioativos (Kp). O coeficiente de distribuição permitiu a comprovação da pureza e identidade do marcado.

O estudo da adsorção de proteínas ocorreu após o contato das superfícies sintéticas com as proteínas marcadas radioisotopicamente em celas de PTFE. As superfícies sintéticas foram incubadas com as proteínas marcadas ($2,0 .1O^5$ $cpm.mL^{-1}$) em solução PBS pH 7,4 equilibradas termicamente a 37 °C. Após incubação por um período de 2 horas a adsorção proteica foi avaliada após lavagem das superfícies sintéticas com PBS pH 7,4 a 37 °C.

A radioatividade das superfícies de PE e PGLD-Sk-PE foi avaliada em um contador gama (Beckman) para a determinação da concentração das proteínas adsorvidas em função do tempo.

5.2.2- ***Adesão plaquetária***

O ensaio de adesão plaquetária foi efetuado após contato da superfície de polietileno revestido com PGLD-Sk com plaquetas marcadas com ^{51}Cr.[4] Sangue humano foi coletado em solução de ACD (citrato de sódio 3,8%) e o plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado após centrifugação a 700g por 5 minutos. Após adição de prostaglandina sódica (PGI^2, $50\mu g.mL^{-1}$) e nova centrifugação do PRP a 900g por 10 minutos as plaquetas foram resuspensas em solução de ACD pH 6,00 (6,85 mM citrato de sódio, 130 mM NaCL, 4 mM KCL e 5,5 mM de glicose). As plaquetas foram peletizadas novamente e em seguida resuspensas em solução de Hepes-Tyrode (136 mM NaCl, 2,7 mM KC1, 0,42 mM NaH_2PO_4, 12 mM $NaHCO_3$, 5,5 mM glicose, 2% BSA e 5 mM ácido 4,2-hidroxietil-l-piperazina etanosulfônico). A concentração de plaquetas foi ajustada para cerca de $2.\ 10^9$ células.mL^{-1} e em seguidas foram marcadas com ^{51}Cr pela adição de $Na2^{51}CrO_4$ ($\mu Ci.mU^{-1}$) e incubação por 40 minutos a 20 °C. As plaquetas marcadas com ^{51}Cr foram lavadas duas vezes com o tampão de Hepes-Tyrode, centrifugadas e resuspensas novamente no tampão. Após ajuste para uma concentração de $2.\ 10^8$ células.mL^{-1}, as plaquetas foram utilizadas no ensaio de adesão plaquetária.

Para o ensaio de adesão plaquetária, tubos de polietileno (PE) e tubos de PE revestidos com PGLD-Sk foram imersos em tampão de Hepes-Tyrode por l hora a 37 °C. Após remoção do tampão, o PRP contendo as plaquetas marcadas com ^{51}Cr foram adicionadas através de uma bomba peristáltica e mantidas em condições de fluxo por até 4 horas. Os tubos foram em seguida lavados com a solução tampão de Hepes-Tyrode contendo solução de $MgCl_2$ l mM. A radioatividade dos tubos foi medida em um contador gama. Os resultados foram expressos como a média de 5 experimentos.

Para observação do processo de adesão e agregação plaquetária nas superfícies das amostras de PE e PGLD-Sk-c-PE, após contato com o PRP os tubos foram desidratados em etanol, secos em atmosfera de CO_2 (ponto crítico) e após revestimento com ouro foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura (SEM Phillips XL 30).

5.2.3- ***Formação de trombos***

A formação de trombos nas superfícies de tubos de PE e PGLD-Sk-c-PE foi estudada utilizando-se a metodologia inicialmente proposta por Imai e Nose.[5] Sangue humano foi coletado em solução de ACD (citrato-dextrose) para impedir a hemólise dos glóbulos vermelhos.

Os tubos poliméricos hidratados em solução PBS pH 7,4 a 37 °C por 15 minutos foram colocados em contato com o sangue previamente preparado com a solução de ACD e em seguida a reação de coagulação foi iniciada pela adição de 20 μL de $CaCl_2$ a 3,8%. Após um determinado intervalo de tempo a reação de formação de trombos foi interrompida pela adição de água destilada. As superfícies testadas foram mantidas por 5 minutos em solução de glutaraldeído a 25% para a fixação dos trombos e em seguida, secos sob vácuo a 25 °C até peso constante.

A quantidade de trombos na superfície foi avaliada gravimetricamente pela equação:

$$\%Trombos = \frac{W_1}{W_g} x100 \quad (1)$$

sendo W_g o peso dos trombos formados no vidro após 60 minutos (referência de coagulação total) e W_t representa o peso dos trombos formados nos tubos poliméricos.

5.2.4- Atividade fibrinolítica da Sk imobilizada

A atividade fibrinolítica do revestimento PGLD-Sk foi avaliada pela capacidade do revestimento em dissolver um coágulo de fibrina marcada isotopicamente com ^{125}I.[6] As amostras de polietileno revestidas com PGLD-Sk e não revestidas foram equilibradas em PBS pH 7,4 por 30 minutos a 37 °C e em seguida incubadas com plasminogênio (0,2 $mg.mL^{-1}$ em PBS) por 4 h a 37 °C. As superfícies foram em seguida imersas em solução de fibrinogênio marcado com ^{125}I onde um coágulo de fibrina foi formado pela adição de 0,8 NIH unidades de trombina bovina. Os tubos poliméricos foram sem seguida transferidos para recipientes contendo solução de PBS pH 7,4 e a radioatividade de cada solução resultante da degradação do coágulo foi medida em um contador gama (Cobra 2000). A

atividade das amostras foi determinada comparando-se a radioatividade do sobrenadante relativamente à radioatividade total presente nos tubos após formação do coágulo de fibrina.

5.2.5- ***Ensaio ex-vivo em cães***

Foram utilizados quatro cães machos *(Canis familiaris),* adultos, sem raça definida, com pesos variando entre 12 a 18 kg. Durante todo o período de experimentação, os cães receberam como fonte nutricional ração comercial balanceada e água *ad libitum.*

Como medicação pré-anestésica foi utilizado injeção intramuscular de maleato de acepromazina e cloridrato de xilazina, nas doses de O.lmg/kg e Img/kg respectivamente. A indução anestésica foi obtida com tiopental sódico, via intravenosa, na dose de lOmg/kg. Como agente de manutenção da anestesia foi utilizado o halotano misturado com oxigénio e vaporizado a 0.5 % (v/v) em sistema semifechado.

A exposição da artéria carótida foi realizada após uma incisão mediana ventral longitudinal, na pele da região cervical, de aproximadamente 10 cm de comprimento.[7] Posteriormente a dissecção do tecido subcutâneo, os músculos esternoióideos foram separados em sua rafe mediana. A exposição da carótida foi completada e os tubos poliméricos de polietileno (revestidos com o sistema PGLD-Sk e não revestidos) foram implantados.

Previamente à sua implantação, os tubos de PE e PEGLD-Sk-c-PE foram hidratados com solução de cloreto de sódio a 0,9% a 37 °C, durante um período de 15 minutos. A bioatividade do revestimento PGLD-Sk quanto à sua hemocompatibilidade também foi efetuada em condições de fluxo sanguíneo após exposição do tubo revestido ao sangue da carótida do animal. A Figura l ilustra o procedimento cirúrgico adotado neste trabalho.

5.3- Resultados e Discussão

5.3.7- *Adsorção Proteica*

O primeiro evento resultante da interação entre uma superfície sintética e o sangue é a adsorção proteica, que pode influenciar nos demais eventos como adesão plaquetária e a formação de trombos.

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

Diversos estudos tem relacionado a absorção preferencial de albumina ao caráter não trombogênico das superfícies sintéticas orgânicas. No caso das superfícies que exibem um caráter essencialmente hemocompatível é fato comprovado experimentalmente que tais superfícies apresentam uma elevada hidrofilicidade.[9]

Neste trabalho o processo de absorção de água pelas superfícies poliolefínicas não revestidas (PE) e revestidas com o dendrímero fibrinolítico (PGLD-Sk-PE) foi avaliado através da espectroscopia no infravermelho (FTIR).[10]

Neste caso, o processo de absorção de água pela superfície sintética pode ser relacionado com o aumento de intensidade nas bandas de absorção correspondente à água através da expressão:[11]

$$\frac{A_t}{A_\infty} = 1 - \frac{8\gamma}{\pi\left[1-\exp(2L\gamma)\right]} \sum_{n=0}^{\infty} \left[\frac{\exp\left(\frac{-D(2n+1)^2\pi^2 t}{4L^2}\right)\left[\frac{(2n+1)\pi}{2L}\exp(-\gamma 2L) + (-1)^n(2\gamma)\right]}{(2n+1)\left(4\gamma^2 + \left(\frac{(2n+1)\pi}{2L}\right)^2\right)} \right] \qquad (2)$$

sendo A_t, A» e L a absorbancia correspondente à massa de água adsorvida no tempo t, absorvância correspondente à massa no equilíbrio e a espessura do polímero, respectivamente.

O termo y representa o decaimento no campo evanescente da radiação IR e D o coeficiente de difusão da água na superfície polimérica. Para y pode-se escrever:

$$\gamma = \frac{2n_2\pi\sqrt{\sin^2\theta - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2}}{\lambda} \qquad (4)$$

sendo ni, n_2, 0 e A, os índices de refração do polímero e do cristal de ATR, ângulo de incidência da radiação IR no cristal (45°) e o comprimento de onda da luz absorvida, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 2, a região de 3400 cm"[1], característica da banda de absorção do grupo OH sofre um significativo aumento de intensidade relativamente ao tempo de exposição da superfície sintética à água.

A Figura 3 mostra o conteúdo de água nas superfícies sintéticas revestidas com o bioconjugado PGLD-Sk-c-PE. Como pode ser observado, o revestimento dendrítico levou a grande um incremento no conteúdo de água do polímero revestido, indicando sua natureza hidrofilica.

5.3.2- Adesão plaquetária

O primeiro evento decorrente da exposição de uma superfície sintética ao sangue é a adsorção de proteínas séricas seguido da adesão plaquetária na forma de monocamadas ou agregados. Estudos indicam que o processo de adesão de plaquetas envolve a interação física ou química dos receptores de membrana desta célula com a superfície do polímero sintético.[12]

A interação entre a superfície sintética e o sangue envolve uma fenomenologia ainda não totalmente esclarecida pela literatura. Entretanto, sabe-se que após exposição ao sangue uma série de eventos dominantemente de adsorção dos elementos presentes no fluído vital iniciam-se na interfase macromolécula-tecido biológico. Desta maneira as propriedades fisico-químicas da macromolécula tais como presença de microdomínios hidrofilico/hidrofóbico, topologia e presença de cristálitos são fatores que podem influenciar nas interações entre a superfície sintética e o sistema cardiovascular.[13]

De uma maneira geral, a série de fatores que determinam a formação de uma interfase por deposição plaquetária sobre a superfície de um biomaterial são influenciadas pela termodinâmica do sistema que através de variações entálpicas e entrópicas dirigem o potencial termodinâmico de Gibbs para o processo de adesão e agregação da célula sanguínea na superfície sintética.[14]

Entretanto, deve-se recordar que o caráter não temporal da termodinâmica impede o estabelecimento de uma avaliação mais criteriosa da dinâmica da interação célula sanguínea/superfície sintética.

A adesão de plaquetas na superfície sintética é mediada pelo fator VII da coagulação sanguínea, podendo ser liberados alguns constituintes do agregado plaquetário dentro do plasma. Estas transformações estão sob o controle das prostaglandinas, íons Ca^{+2}, AMP e ADP. As proteínas específicas e fosfolipídeos da membrana plaquetária são de importância primordial para a aceleração e controle do processo de coagulação. Por sua vez, as plaquetas aderidas sobre a superfície sintética podem ser ativadas levando ao início de um conjunto de reações complexas que conduzem à formação de trombos.

Embora mais de três décadas tenham se passado na tentativa de se estabelecer um mecanismo preciso da interação entre a plaqueta sanguínea e a superfície dos polímeros sintéticos, semelhantemente à física contemporânea, falta uma teoria unificada que seja capaz de prever tanto os processos de adesão quanto os de ativação plaquetária, independente da estrutura da macromolécula sintética em estudo.

A Figura 4 ilustra a adesão de plaquetas nas superfície dos tubos de PE e PEGLD-Sk-PE. Observa-se que a superfície de PE revestida com o conjugado PGLD-Sk apresenta significativamente menos plaquetas aderidas ativadas que as superfícies sintética não revestidas (PE).

A Figura 5 mostra as micrografías SEM para as superfícies de PE e PGLD-Sk-c-PE após exposição ao plasma rico em plaquetas. As superfícies de polietileno revestidas com PGLD-Sk apresentaram poucas plaquetas aderidas comparativamente ao polietileno não revestido, evidenciando uma tendência bastante significativa do revestimento de PGLD-Sk a um comportamento hemocompatível.

Dentre os vários modelos desenvolvidos nos últimos 30 anos para a explicação das

propriedades biocompatíveis de uma superfície sintética, o modelo de Baier que ressalta a importância de superfícies sintéticas com baixa energia livre de superfície (y_c) parece ser o mais adequado do ponto de vista termodinâmico.[15] De acordo com o modelo em questão, superfícies sintéticas com baixa energia livre de superfície após em contato com o sangue poderá exibir propriedades hemocompatíveis. Deste modo, revestimentos de baixa energia livre de superfície poderiam inibir os processos de adesão e ativação das plaquetas sanguíneas.

Uma propriedade da microestrutura do revestimento que está intrinsicamente ligada a y_c é a temperatura de transição vítrea do revestimento:[16,17]

$$\gamma^{0,86}{}_c = \left(0,03RT_g - 1,5\right)\left(n\phi^2 . V_m{}^{-0,71}\right) \qquad (4)$$

sendo n o grau de liberdade do sistema, V_m o volume molar e (|) o parâmetro de interação.

Embora possua algumas limitações, a expressão (4) foi utilizada para o cálculo da tensão crítica de superfície do revestimento de PGLD-Sk. O valor de y_c obtido para o revestimento de PGLD-Sk foi de 18,2 dinas.crrf[1]. Uma vez que o PE apresenta uma energia livre de superfície, y_c, igual a 22 dinas.cm"[1], o revestimento com o sistema PGLD-Sk tende a reduzir a energia livre de superfície provavelmente devido ao seu elevado conteúdo de água. Como já mencionado anteriormente, a baixa energia livre de superfície característica do revestimento poderia favorecer a propriedade de hemocompatibilidade e consequentemente a interação da superfície sintética com as plaquetas do sangue.

A Figura 6 mostra as curvas representando a cinética da formação de trombos nas superfícies da poliolefina revestida com a estrutura dendrítica com atividade fibrinolítica (PGLD-Sk-PE) e, não revestida (PE). Observa-se que a superfície revestida é significativamente menos trombogênica que o polímero não revestido com o PGLD-Sk indicando que a estreptoquinase imobilizada parece permanecer significativamente ativa quanto ao processo de fibrinólise de coágulos formados na superfície dendrítica.

5.3.3- ***Atividade fibrinolítica da Sk imobilizada***

Quando superfície sintética é colocada em contato com o sangue, somente o mecanismo intrínseco desencadeia a coagulação através da fase de contato chamada Fator XII ou fator de Hageman. A ativação do fator XII leva à um conjunto de reações que conduzem à transformação do fibrinogênio em fibrina seguido da formação de trombos na superfície sintética.

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

Qualquer que seja o caminho, a cascata de coagulação leva à formação de trombina que desempenha várias funções. Primeiro a trombina induz a agregação plaquetária. Segundo, a trombina pode ativar o fibrinogênio em reação hidrolítica que leva a fibrinopeptídeos A e B e ao polímero solúvel fibrina. As ligações cruzadas da fibrina solúvel é catalisada pelo fator XIII ativado, formando o coágulo de fibrina insolúvel e outra vez a trombina é envolvida na ativação do fator XIII. Deve-se notar que agregados de plaquetas, hemácias e proteínas plasmáticas são capturadas na malha (rede) de ligações cruzadas da fibrina.[18,,20]

A principal diferença entre os dois mecanismos é que a via intrínseca é mais lenta que a extrínseca. Esta última é acelerada de acordo com a quantidade de fosfolipídeos liberados no tecido lesado pêlos fatores X, VIII e V presentes no sangue.

Diversas aproximações foram adotadas nas recentes décadas para a dissolução de coágulo na superfície de polímeros sintéticos destacando-se o revestimento com heparina, uroquinase (Uk) e ativadores do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA).[21,22]

Os riscos associados ao uso da heparina bem como o custo elevado em relação à utilização da Uk e t-PA fazem da estreptoquinase uma alternativa bastante atraente para o revestimento de próteses cardiovasculares.

Embora a utilização de dispositivos cardiovasculares sintéticos tenha ampliado a segurança e qualidade de vida de muitos pacientes, uma das complicações mais graves quando, por exemplo, da utilização de catéteres implantáveis em oncologia é a trombose seguida de oclusão do catéter. A formação de trombos no catéter com oclusão luminal total ou parcial

ocorre em até 15% dos catéteres utilizados atualmente, o que leva a complicações como edema, dor localizada, infecção e flebite na circulação colateral.

A Figura 7 mostra a atividade fibrinolítica *in vitro* da Sk livre e imobilizada na superfície dendrítica. Pode ser observado que o revestimento de PGLD-Sk na superfície da poliolefina foi efetivo com relação à dissolução do coágulo na superfície revestida sendo obtido a dissolução do coágulo da superfície sintética em cerca de 70 minutos. A estreptoquinase livre dissolveu o coágulo em cerca de 40 minutos.

Estudos da literatura indicam que uma terapia trombolítica que reduza a oclusão luminal em até 30-40% é capaz de restaurar o fluxo sanguíneo.[23] Uma vez que a dinâmica de dissolução do coágulo é um parâmetro importante para os revestimentos fibrinolíticos, a cinética de fibrinólise foi considerada no intervalo de redução da oclusão luminal clinicamente considerada como boa. O tratamento cinético dos dados obtidos são apresentados na Figura 8.

As constantes cinéticas da degradação do coágulo para a estreptoquinase livre (Sk) e imobilizada na superfície dendrítica (PEGLD-Sk-PE) foram iguais a 4,12. l O"[3] min"[1] e 2,30.10" min"[1], respectivamente.

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para a estreptoquinase livre e imobilizada foram determinados através da metodologia desenvolvida por Wohl.[24,25] O princípio da técnica envolve a clivagem de um substrato cromogênico, S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) com liberação da 4-nitroanilina (pNA) após o contato do peptídeo com o complexo estreptoquinase-plasminogênio. A liberação da pNA é monitorada a 405 nm que, por sua vez, é diretamente proporcional a atividade da plasmina. A quantidade de plasmina é diretamente proporcional a concentração de plasminogênio originalmente presente na amostra.

A Figura 9 mostra os resultados obtidos para a estreptoquinase livre e imobilizada na superfície dendrítica em pH e temperatura fisiológicos (7,4; 37 °C). Neste trabalho considerou-se o coeficiente de extinção molar do pNA como sendo equivalente a 10.000 L.morVcm"[1] (IpM pNA = lOmOD^s). Ambas as formas proteicas (imobilizada e não imobilizada) parecem obedecer à uma cinética de Michaelis-Menten.

Aplicando-se o método de linearização de Lineweaver-Burk obtém-se os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para a estreptoquinase solúvel (Sk_{so}i)e $K_{m»apar.}$ e $V_{max»a}$par. para a proteína imobilizada (Ski_{m0}b). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 10 e Tabela 1. Os

valores próximos nos valores de K_m e V_{max} parecem indicar que a interação Sk-substrato não é substancialmente modificada pela imobilização da proteína. Esta característica pode ser devido à estrutura dendrítica que interage favoravelmente com a estrutura proteica.

Tabela l- Valores das constantes cinéticas para a estreptoquinase solúvel ($Sk_{so}i$) solúvel e imobilizada ($Ski_{mo}b$).

Constante cinética	Sk_{sol}	^J^imob
K_m (mM)	18,04	16
VmaxínM.mmVU[1])	914	751

5.3.4- Ensaio ex-vivo em cães

A adequação do revestimento fíbrinolítico sob fluxo saguíneo foi estudado neste trabalho utilizando experimentação animal após implante na artéria carótida de diferentes cães. O fluxo sanguíneo foi monitorado ao longo do experimento através de um detector de fluxo.

A Figura 11 mostra os resultados obtidos após implantes dos tubos em diferentes cães. O fluxo de sangue no tubo de PE foi interrompido completamente após 20 minutos do implante enquanto que para o tubo revestido (PGLD-Sk-PE) o fluxo sanguíneo sofreu uma diminuição não significativa de de 70 para 60 mL.min"[1] após 240 minutos do implante.

A fim de se observar a deposição dos elementos sanguíneos nas superfícies dos tubos após implante em animais, a superfície dos tubos foram analisadas por epi-fiuorescência. O princípio da técnica de epifluorescência baseia-se na incorporação de alaranjado de acridina ao DNA mitocondrial. A localização de plaquetas ou seus agregados é feita então por excitação do corante com luz UV.[26]

Os resultados de epi-fiuorescência são apresentados na Figura 12. Pode ser observado que o número de agregados é significativamente maior nas superfícies não revestidas de PE comparativamente ao tubo de polietileno revestido com o dendrímero fibrinolítico.

5.4- Referências Bibliográficas

1. ***ISSO-10993-4 Guidelinesfor blood/materíal interactions.*** Report of the National Heart, Lung and Blood Institute. Working Group, US Department of Health and Human Services. NIH Publication no 85-2185, revised september 1985.
2. BISCAYART P.L., PALADINI A.C., VITA N., ROGUIN L.P. Preparations of ^{125}I labelled human growth hormone of high quality binding properties endowed with long term stability. ***J.Immunoassay*** 10(1): 37-56, 1989.
3. BARTOLINI **P.** ***Efeitos da radiodação sobre as atívidades biológica, imunológica, de ligação a receptores e propriedades fisico-químicas do harmónio de crescimento humano.*** São Paulo, 1984. (Tese de doutoramento, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN/USP).
4. MOROI M., OKUMA M., JUNG S.M. Platelet adhesion to collagen-coated wells: analysis of this complex process and a comparison with the adhesion to matrigel-coated wells. ***Bioch.Biophys.Acta*** 1137: 1-9, 1992.
5. IMAI Y., NOSE Y. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materiais. ***J.BiomedMater.Res. 6:*** 166-72, 1972.
6. WOODHOUSE K.A., WEITZ J.I., BRASH J.L. Lysis of surface-localized fibrin clots by adsorbed plasminogen in the presence of tissue plasminogen activator. ***Biomaterials*** 17: 75-7, 1996.
7. JÚLIO C.A., DE QUEIROZ A.A.A. Blood compatibility of tubular polymeric materiais studied by biological surface interactions. ***Brazïlian J.Med.BioLRes.*** 27: 2565-68, 1994.
8. OKANO T., YUI N., TANAKA J., SANUI K., OGATA N., KATAOKA K. Characterization of the microestructure of poly(propylene oxide)-segmented polyamide and its suppression of platelet adhesion. ***Pofym.J.*** 16(2): 119-28,

1984.

9. VROMAN L., ADAMS AL., KLINGS M., FISCHER G.C., MUNOZ PC., SOLENSKY R.P. Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces. ***Annais N. 1l.Academ.Scl*** **283:** 65-75, 1977.

10. TRIFONOV A., NIKONOV P., KOLEV D., TSENOV L Na investigation of liquid penetration through solid phase by attenuated total reflection spectroscopy (ATR). ***Phys.Stat.Soli. A*** 27: 135-40, 1975.
11. DE QUEIROZ A.A.A., ABRAHAM G.A., SAN ROMÁN J., PENICHE C. Antimicrobial properties of polyglycerol-chitosan dendrimers. ***Anais do Third International Congress on Biomaterials- Biomat'03.*** La Habana, Cuba, March 25th-28th,2003.p. 10.
12. FORBES C.D., PRENTICE C.R.M. Thrombus formation and artificial surfaces. ***BrítishMed.Bull.*** 34(2): 201-7, 1978.
13. RATNER B.D. Biomedical applications of synthetic polymers. In: ALLEN G., BEVINGTON J. (Editors). ***Comprehensive polymer science.*** New York (EUA), Pergamon Press, 1989. Vol. 7, pp. 201-47.
14. DE QUEIROZ A . A . A . Thermodynamic analysis of the surface of biomaterials. ***J.Molec.Stmcture (Theochem)*** **394:** 271-79, 1997.
15. BAYER R.E. The role of surface energy in thrombogenesis. ***Bull.N.Y.Academ.Med.*** 48(2): 257-72, 1972.
16. HAYES R.A ., The relationship between glass temperature, molar cohesion and polymer structure. ***J.AppLPolym.Sci.*** 5(15): 318-21, 1961.
17. LEE L.H. Relationship between surface wettability and glass temperature of high polymers. ***J.AppLPolym.Sci.*** **12:** 719-30, 1968.
18. BAYER R.E. Key events in blood interactions at nonphysiologic interfaces- A personal primer. ***Artif.Organs*** 2(4): 1978.
19. JOSEFOWICZ M., JOSEFOWICZ J. Antitrombogenic polymers. ***Puré & AppLChem.*** 56(10): 1335-44, 1984.
20. BEUGELING T. The interaction of polymer surfaces with blood. ***J.Polym.ScL:Polym.Symp.*** **66:** 419-28, 1979.

21. WEBER N., WENDEL H.P., ZIERNER G. Hemocompatibility of heparin coated surfaces and the role of selective plasma protein adsorption. ***Biomaterials*** 23(2): 429-39, 2002.

22. PARK Y.J., LIANG J., YANG Z., YANG V.C. Controlled release of clot-dissolving tissue-type plasminogen activator from a poly(L-glutamic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogel. ***J.ControLRelease*** 75: 37-44, 2001.

23. MOSER K.M. *In vivo* testing of synthetic fibrinolytic agents. In: Schor J.M.(Editor) ***Chemical control of fibrynolysis-Thrombolysis.*** New York, Wiley, 1970. pp. 135-150.

24. WHOL R.C., SUMMARIA L., ARZADON L., ROBBINS K.C. Steady state kinetics of activation of human and bovine plasminogens by streptokinase and its equimolar complexes with various activated fornis of human plasminogen. ***J.Biol.Chem.253(5):*** 1402-7, 1978.

25. WHOL R.C., SUMMARIA L., ROBBINS K.C. ***J.Biol.Chem.255(5):*** 2005-13, 1980.

26. ADAMS G.A., FEUERSTEIN LA. Visual fluorescent and radioisotopic evaluation of platelet accumulation and embolization. ***Trans.Amer. Soc.Art.Intern.XXVI:*** 17-23, 1980.

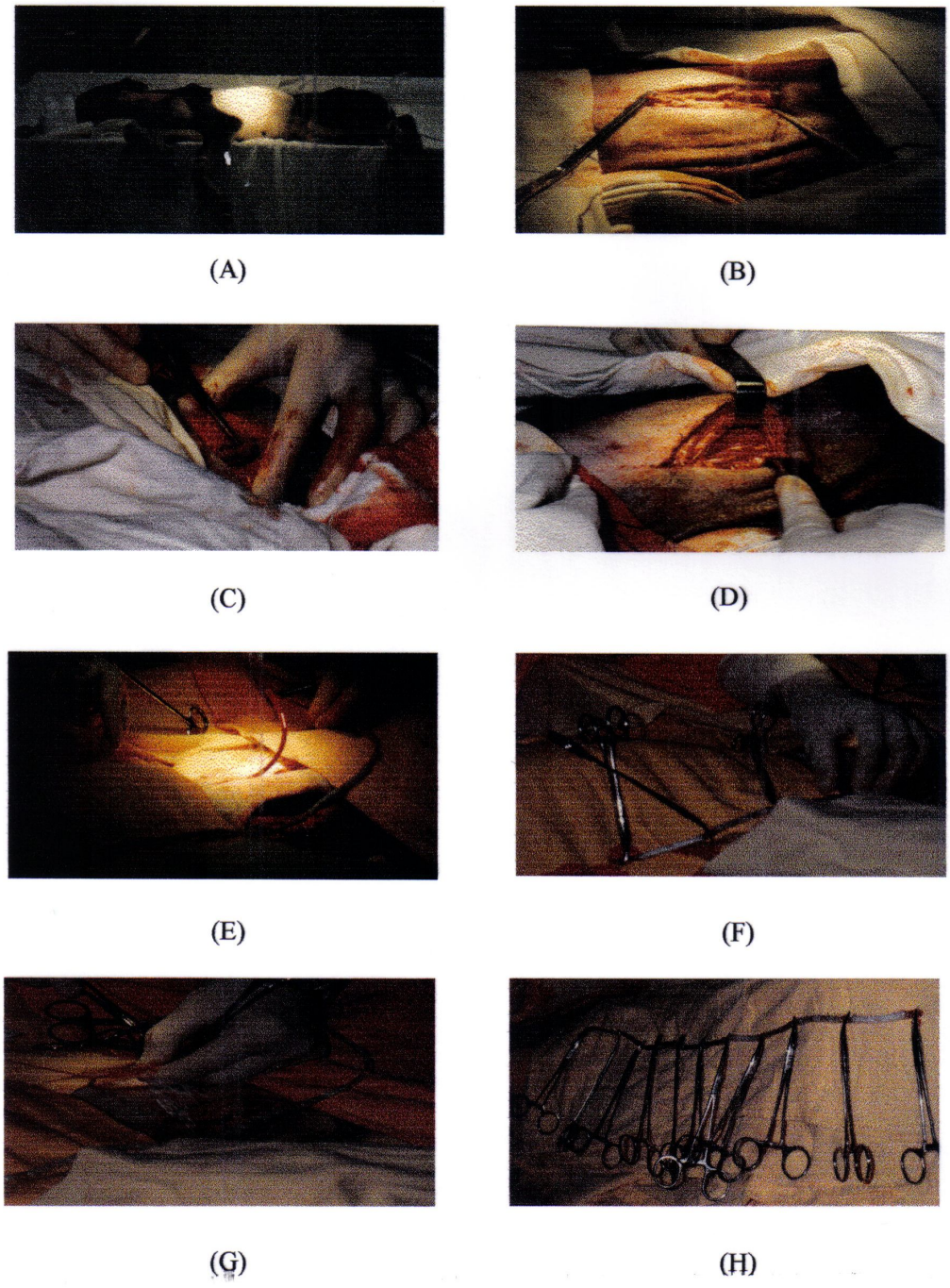


Figura 1 – Procedimento cirúrgico para avaliação da hemocompatibilidade dos tubos de PE e PGLD-Sk-c-PE. Animal utilizado no experimento anestesiado (A), incisão (B), exposição de carótida (C), implante do tubo sintético (D), fluxo de sangue no tubo sintético (E-G) e tubos após a experimentação animal (H).

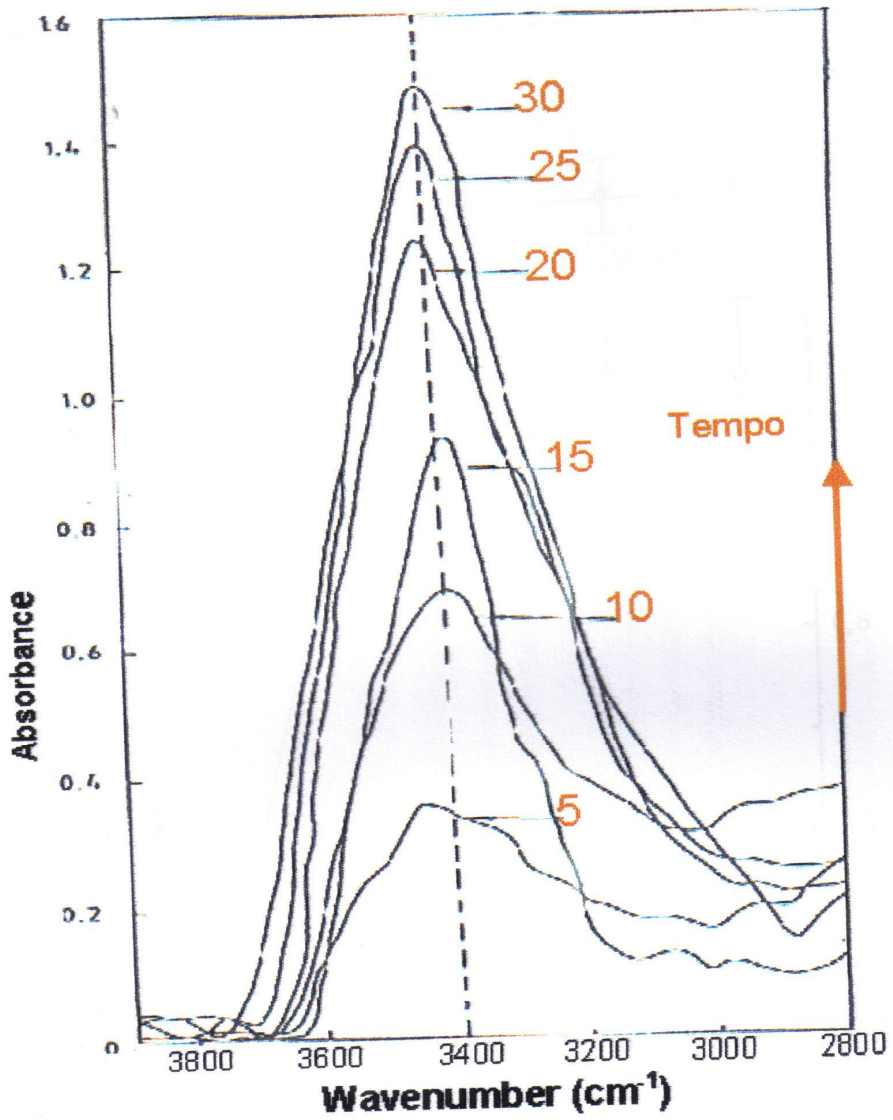
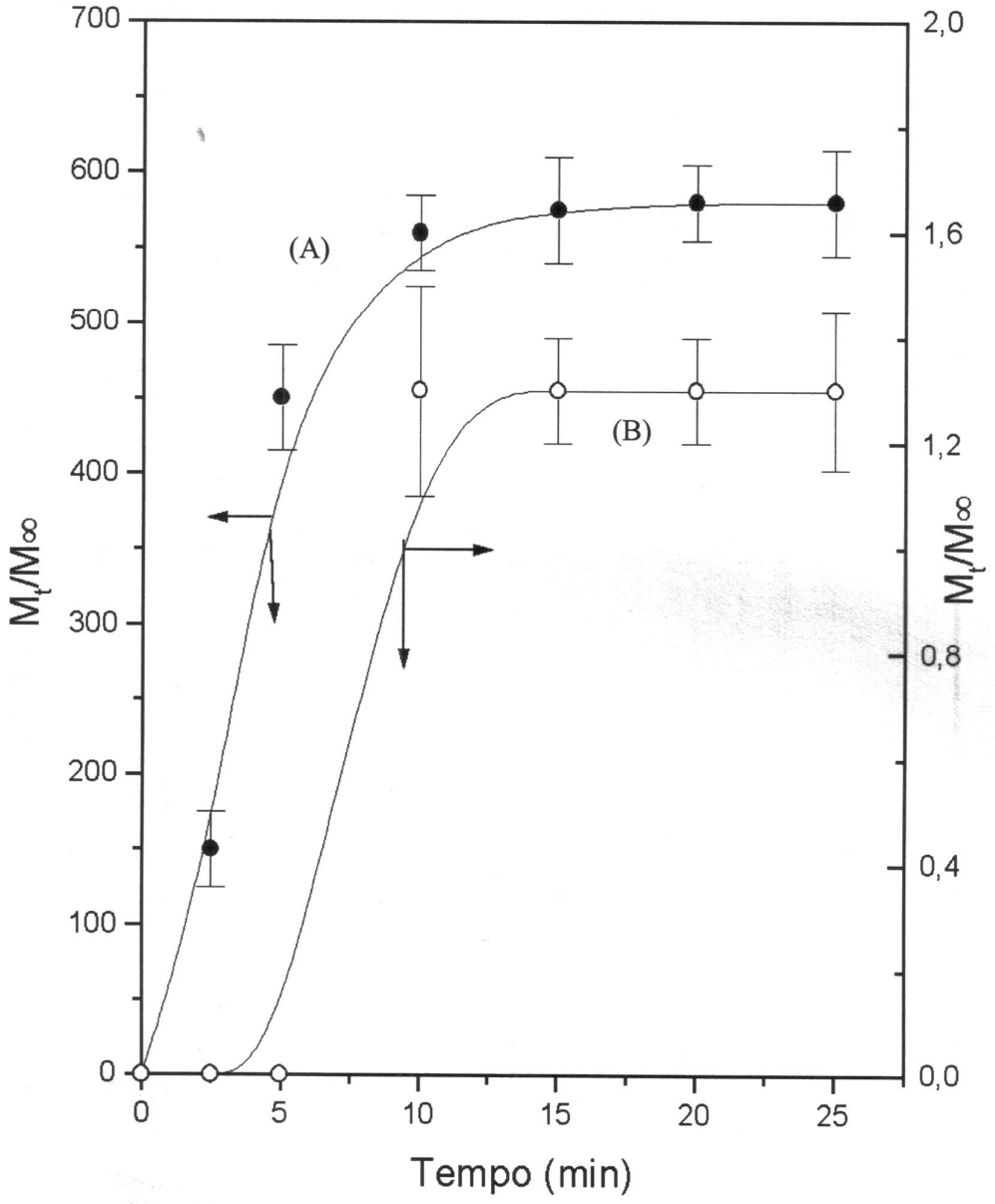


Figura 2- Evolução no espectro vibracional (FTIR/ATR) da superfície de PGLD-Sk-PE durante o processo de sorção de água.



gura 3 - Intumescimento no equilíbrio dos sistemas PE (A) e PGLD-Sk-C-PE (B) em solução tampão PBS pH7,4 a 37°C

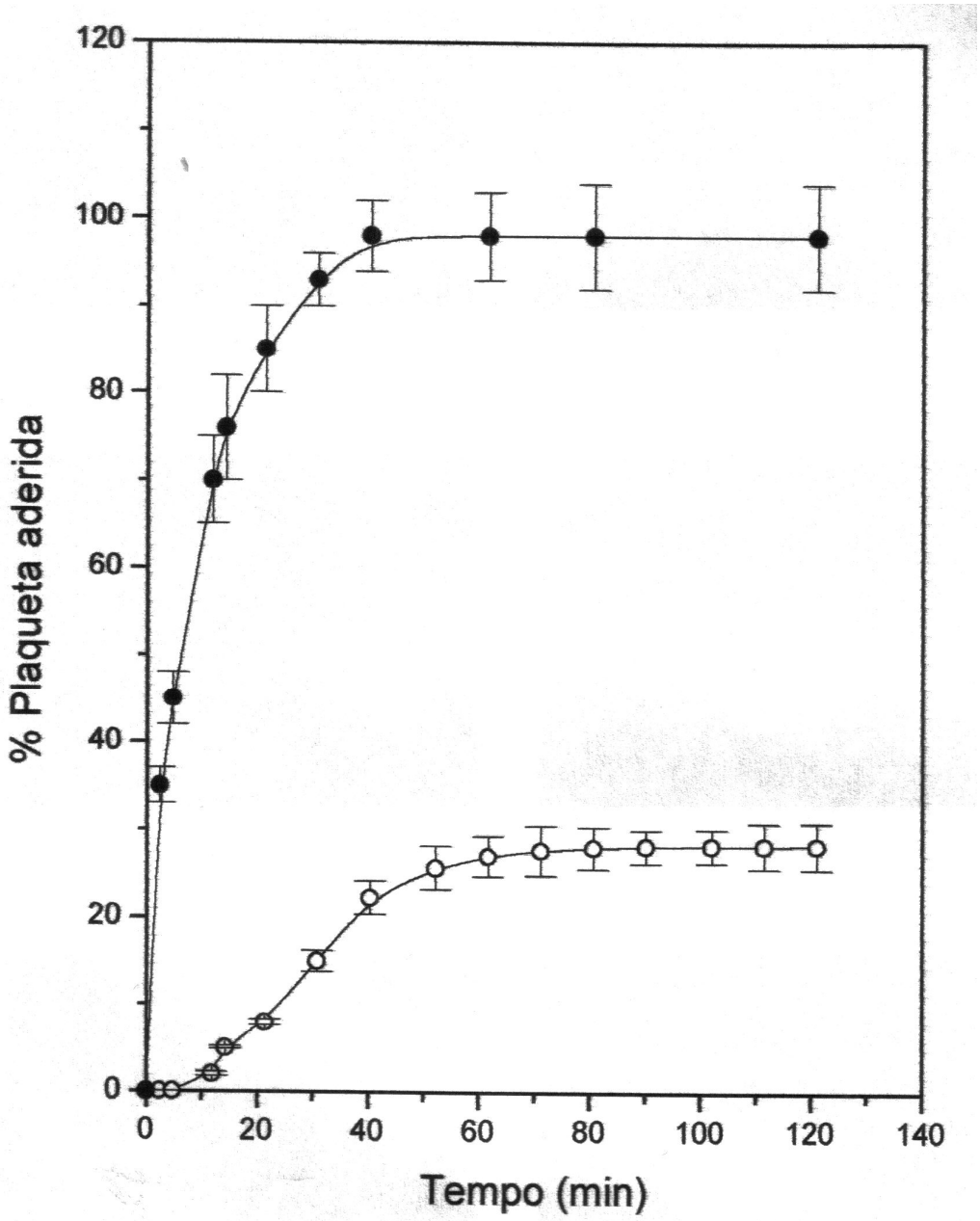
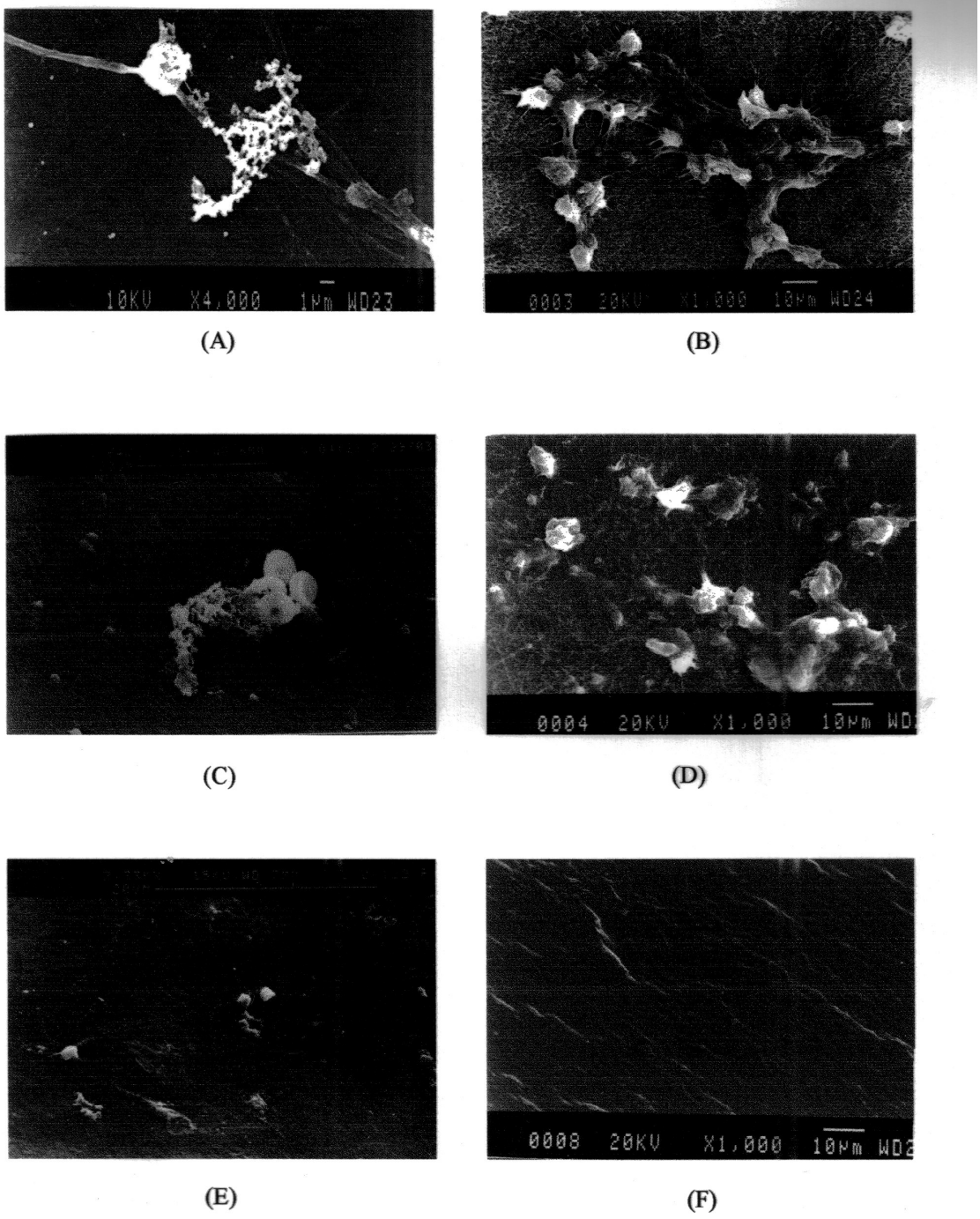


Figura 4 - Porcentual de plaquetas aderidas sobre: PE (•) e PGLD-Sk-PE (○).



(A) (B)

(C) (D)

(E) (F)

Figura 5 – Micrografias SEM para as superfícies de PE (A-D) e PGLD-Sk-c-PE (E-F) após exposição a plasma rico em plaquetas.

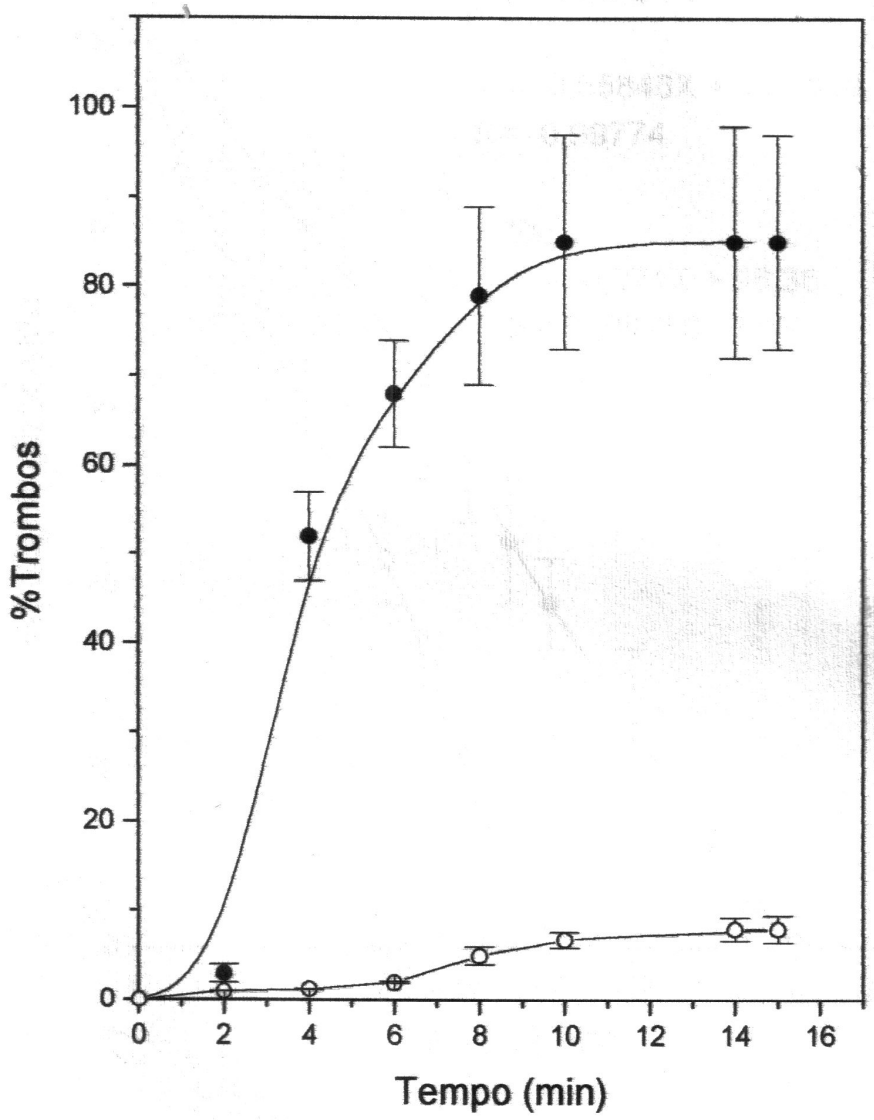


Figura 6 - Cinética da formação de trombos na superficie da poliolefina antes (•) e após (○) o revestimento com o dendrímero fibrinolítico.

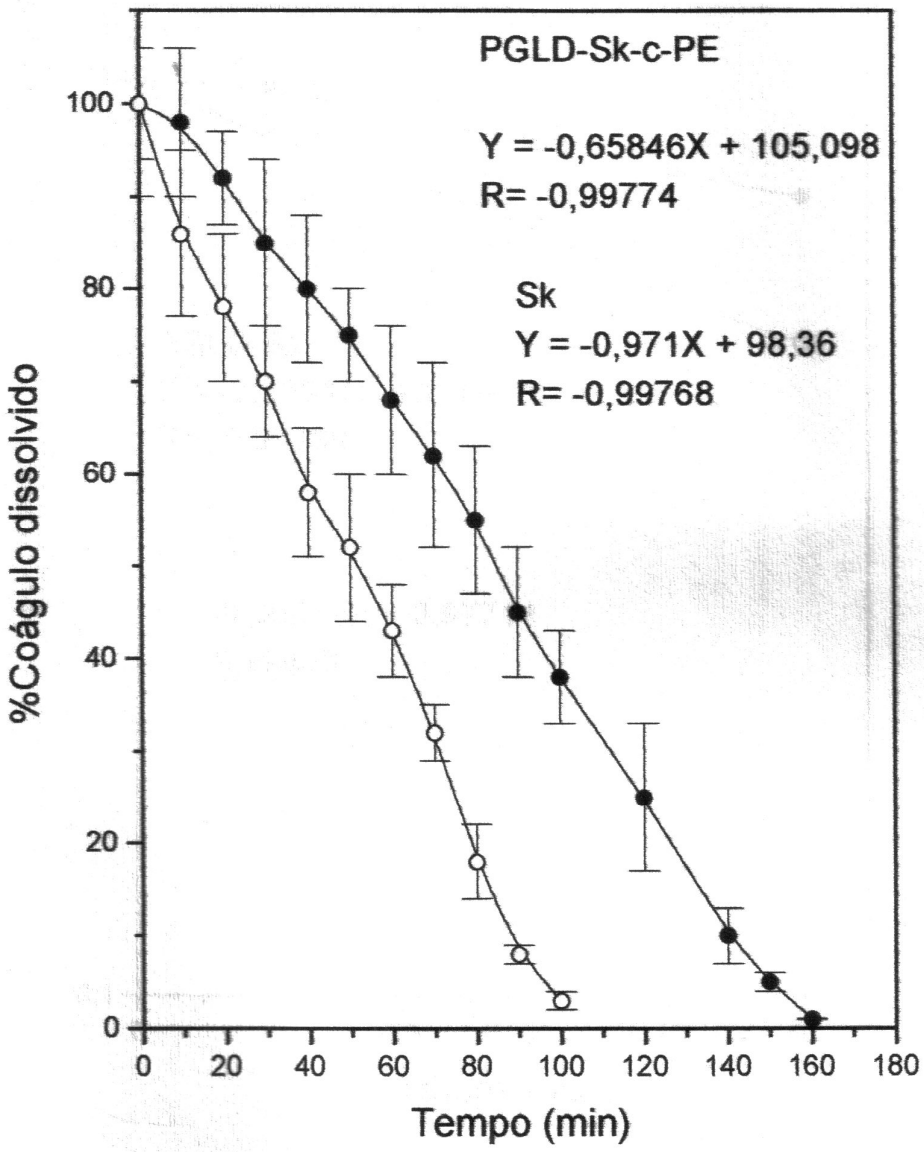


Figura 7 - Capacidade do revestimento da superfície de PGLD-Sk-c-PE (●) em dissolver coágulo sangüíneo. (○) Estreptoquinase pura.

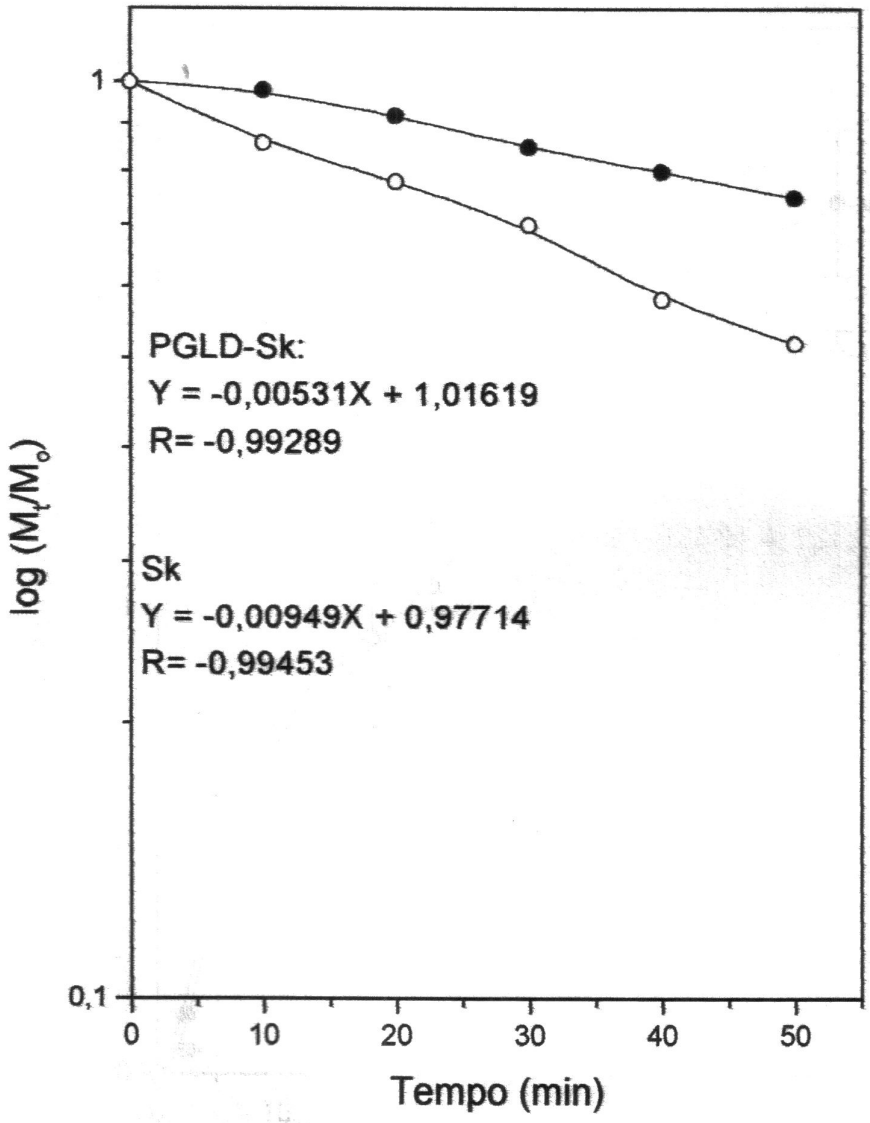


Figura 8- Cinética de degradação do coágulo pela Sk livre (○)e imobilizada (●) na superfície dendrítica.

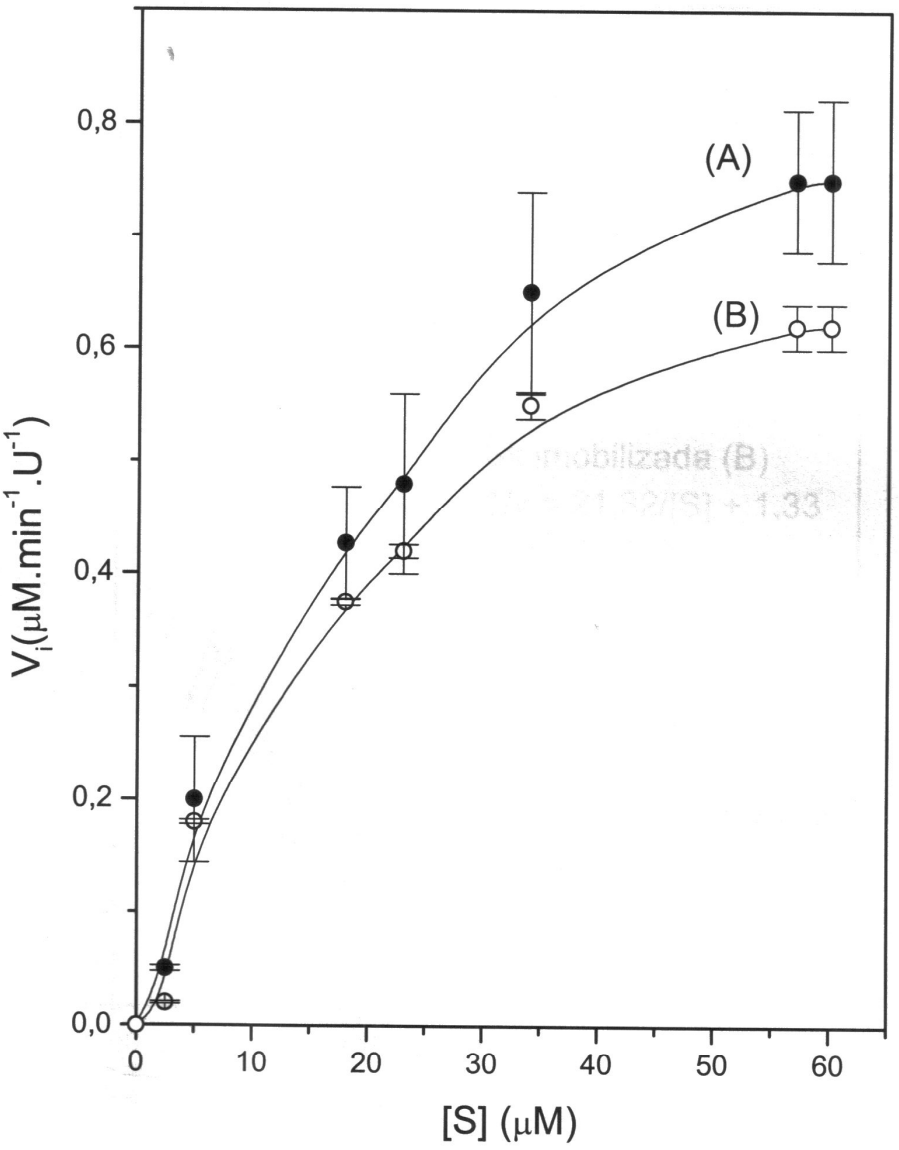


Figura 9 - Variação da atividade da estreptoquinase livre (A) e imobilizada no PGLD (B) em função da concentração do substrato cromogênico S-2251. As velocidades iniciais foram medidas por 5 minutos a 405 nm após incubação a 37 °C.

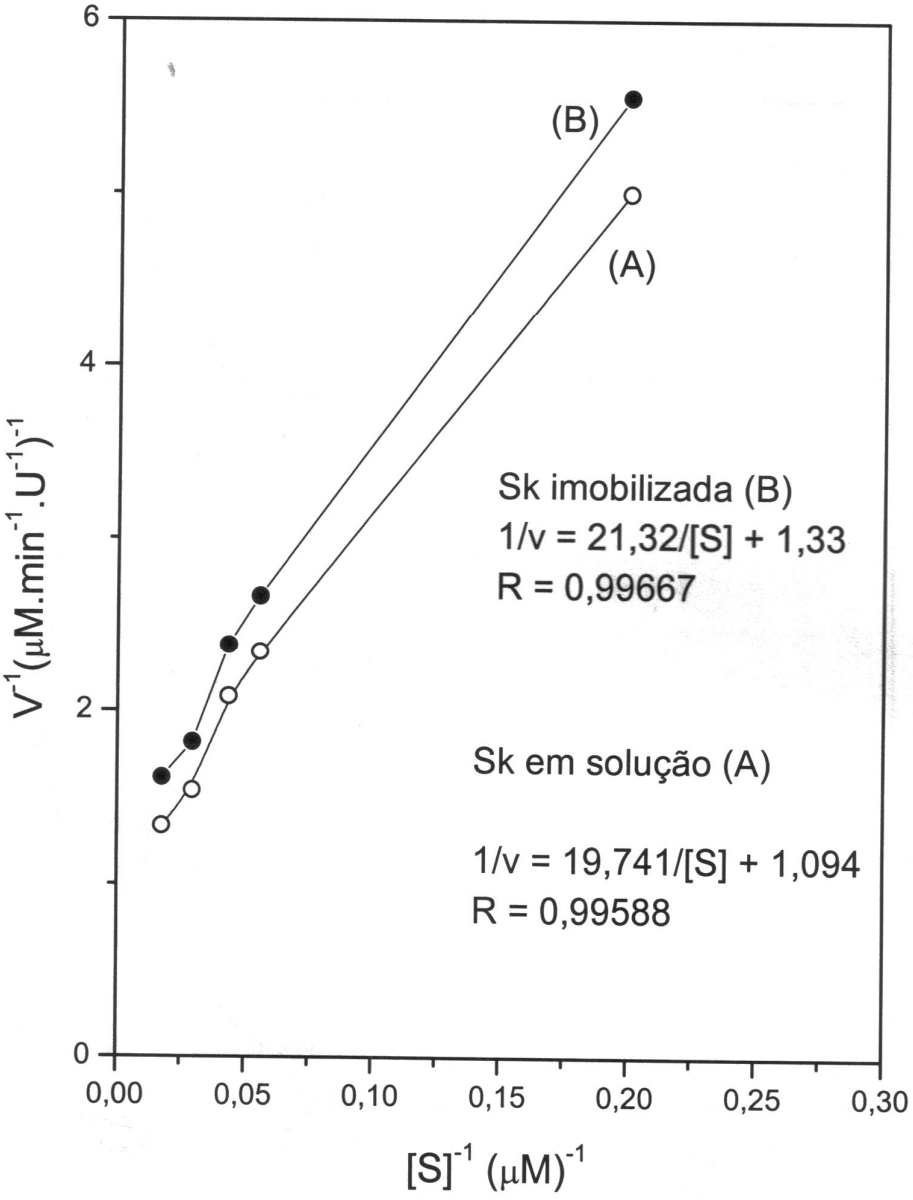


Figura 10- Gráfico de Lineweaver-Burk para Sk livre (A) e Sk imobilizada (B).

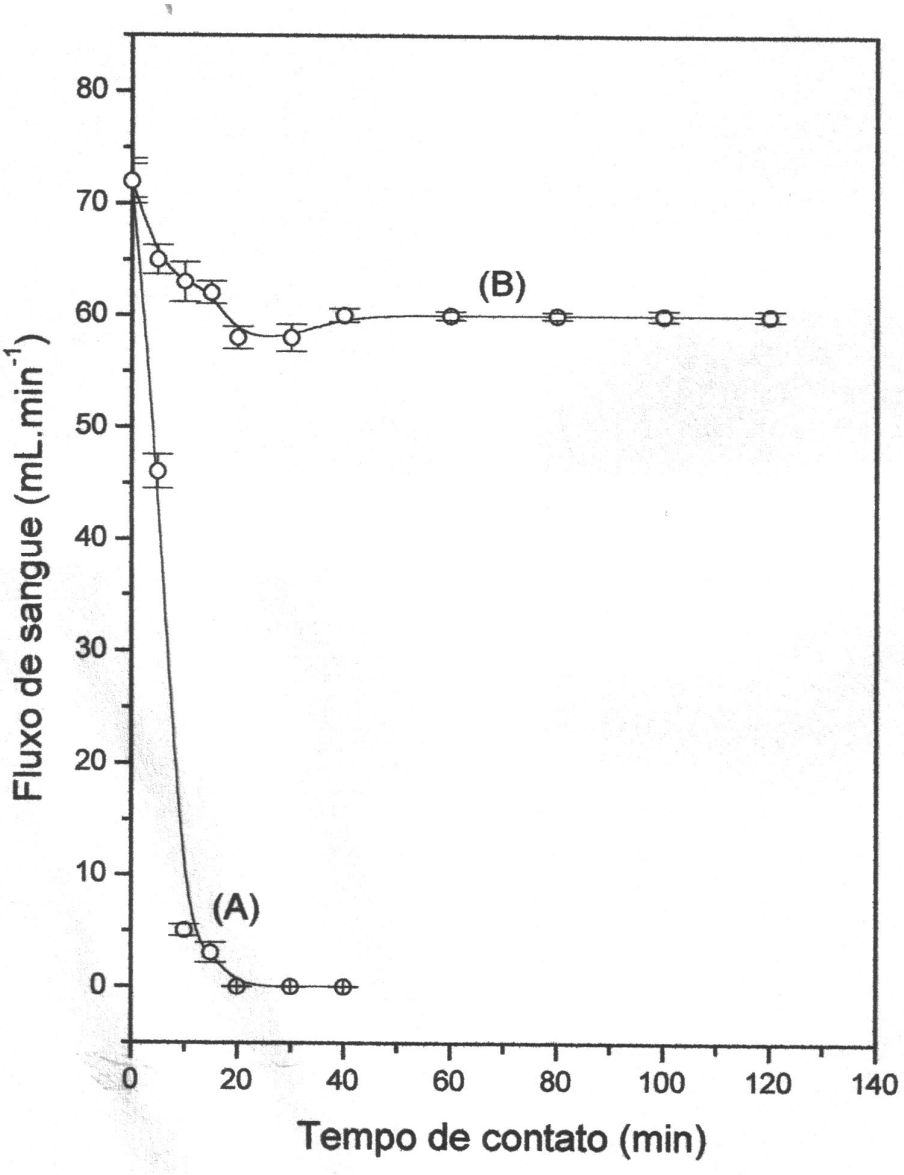


Figura 11- Comparação do fluxo sanguíneo em tubos de polietileno não revestidos (A) e, revestidos com o bioconjugado PGLD-Sk (PGLD-Sk-c-PE) (B). Quantidade de Sk imobilizada: 0,1 mg.mm^{-2}.

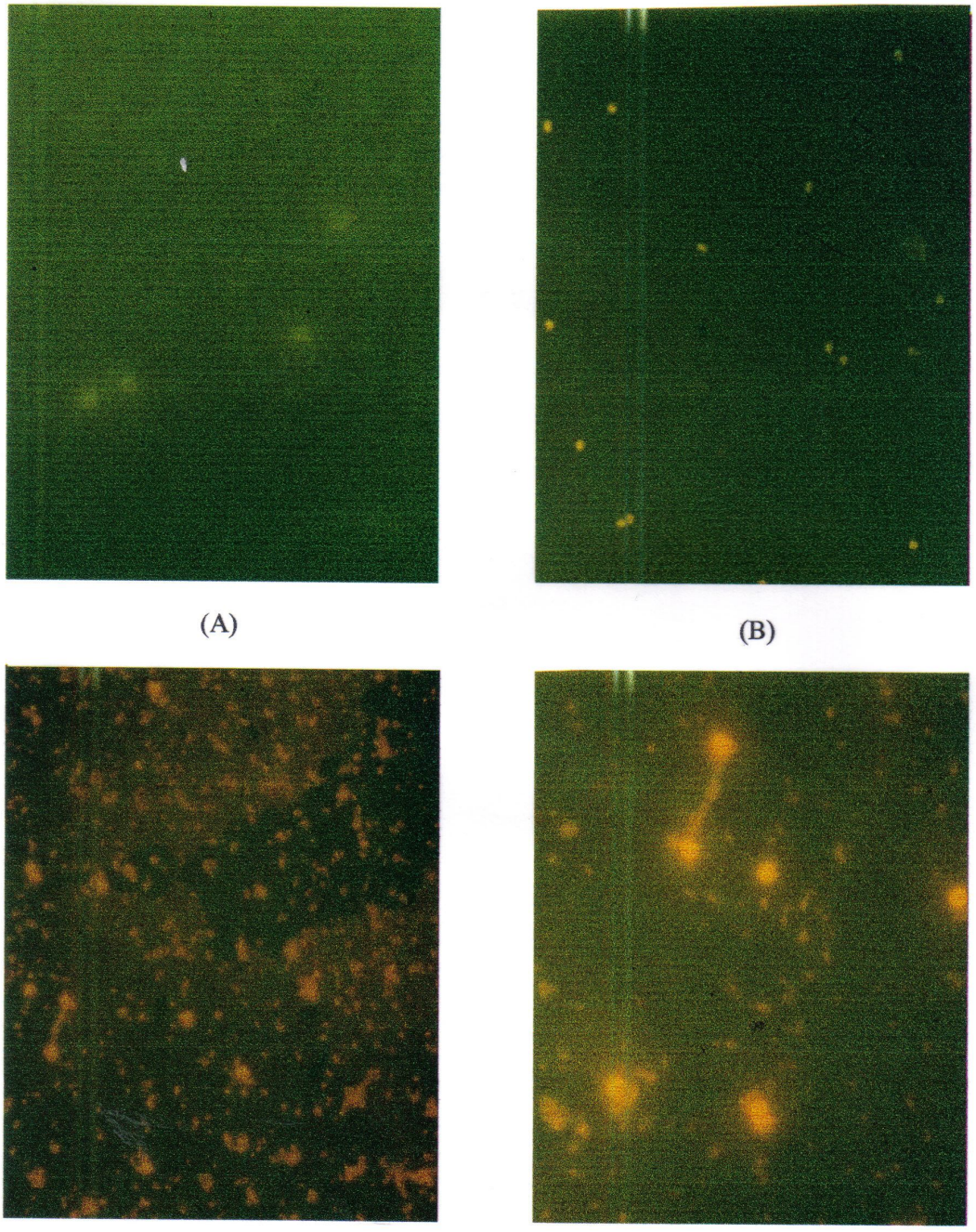


Figura 12 – Micrografias de epi-fluorescência das superfícies de PGLD-Sk-c-PE (A-B) e PE (C-D) após ensaio ex-vivo em cães. Aumento:1000x.

6
CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram um horizonte promissor para a utilização de macromoléculas arborescentes na área cardiovascular. Os resultados deste trabalho indicam que poligliceróis dendríticos isomoleculares podem ser sintetizados em um processo de policondensação onde o núcleo de crescimento da macromolécula é um poliglicerol tipo poliéter.

Como salientamos na introdução deste trabalho, gostaríamos de explorar nossos resultados no sentido de se obter revestimentos flexíveis e com atividade fibrínolítica para ambiciosas aplicações como, por exemplo, o revestimento de *stents* ou catéteres implantáveis a longo prazo. Entretanto, os resultados com relação à hemocompatibilidade dos revestimentos obtidos referem-se apenas aos ensaios fundamentais da experimentação *in vitro* e *ex-vivo* .

Avaliando os ensaios *in vitro* observamos que os resultados são satisfatórios. O revestimento promove a adsorção preferencial de albumina e uma baixa adesão e agregação plaquetária além de uma diminuição significativa quanto ao processo da formação de trombes nas superfícies sintéticas revestidas com o sistema PGLD-Sk.

A interessante descoberta a ser ressaltada é a manutenção da atividade biológica da proteína Sk imobilizada ser muito próxima da estreptoquinase em solução. Estudos recentes sugerem que esta observação pode de fato ser encontrada uma vez que sistemas dendríticos tendem a mimetizar estruturas de proteínas globulares. Evidentemente, esta descoberta é fundamental para o desenvolvimento de biorreatores e outros sistemas com atividade biológica deverão ser testados.

Os estudos da cinética de dissolução de um coágulo induzido artificialmente em uma superfície sintética pelo revestimento PGLD-Sk indicam que a utilização de tais revestimentos na área médica podem garantir a reperfusão a um nível mínimo para manutenção da vida, inibindo o colapso do fluxo sanguíneo no organismo biológico.

Em nosso trabalho os estudos da experimentação *ex-vivo* sugerem que o bioconjugado PGLD-Sk pode gerar revestimentos com uma boa atividade fíbrinolítica. Obviamente os resultados levam em conta apenas uma variável do sistema biológico: o fluxo de sangue através do tubo de uma poliolefma (PE) em cuja superfície estava acoplado covalentemente o bioconjugado PGLD-Sk. Embora o ensaio *ex-vivo* tenha um significado importante para este trabalho, reconhecemos que uma experimentação animal de maior porte deve ser projetada onde volume maior de dados estatísticos relativos à ativação de complementos da cascata de coagulação do sangue bem como o fator de von Willebrand possam ser analisados com o rigor da estatística

Podemos apontar como a principal dificuldade deste trabalho a ativação da superfície da poliolefma no reator de plasma à pressão atmosférica, uma metodologia não clássica no setor industrial. Entretanto, outros métodos de ativação superficiais da poliolefma podem ser adaptados para a obtenção de um revestimento estável a exemplo da descarga corona, amplamente difundida no setor industrial.

Em nosso trabalho obtivemos indícios de que os mecanismos de energia livre superficial e de fibrinólise operam a nível superficial para o revestimento PGLD-Sk. Entretanto, sabemos que a elevada densidade de grupos funcionais na superfície dendrítica perturba de alguma forma a estrutura da proteína Sk. Sabemos apenas que a perturbação parece não ocorrer na região bioativa da proteína. Entender como se dá a interação entre a estrutura dendrítica e a proteína Sk com base em modelos semi-empíricos proverá futuras compreensões que poderão ser úteis à biologia molecular. Aliado aos resultados deste trabalho, a modelagem molecular do sistema PGLD-Sk e sua interação com o plasminogênio são objetos de interessante pesquisa.

Acreditamos que nossa pesquisa poderá trazer uma contribuição significativa para a obtenção de novos materiais para a área cardiovascular. Trabalhos futuros nesta área, dirão da flexibilidade do método de aplicação em outros diferentes tipos de estruturas (metais, misturas poliméricas e cerâmicas). O que fizemos até agora representa apenas um primeiro passo nesta direção.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A aplicação de estruturas macromoleculares arborescentes contendo estreptoquinase imobilizada representa uma vertente interessante quanto ao desenvolvimento de novos biomateriais no presente século. Neste sentido, a química nanoscópica tem demonstrado ser uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de materiais em escala nanométrica.

Aliado à bioquímica e engenharia de materiais, sistemas implantáveis revestidos através da tecnologia convencional com macromoléculas biológicas como a heparina, uroquinase e o ativador tecidual de plasminogênio tem sido oferecido à medicina cardiovascular. Entretanto, a manutenção da integridade do componente biológico e o elevado custo destas técnicas que excluem a população de baixa renda em nosso país são dois desafios que devem ser vencidos.

Espera-se que esta dissertação forneça as ferramentas iniciais para o desenvolvimento de sistemas simples e extremamente versáteis quanto ao seu tipo de aplicação na área cardiovascular. O escopo do presente trabalho e obviamente, também o binómio tempo/instrumentação nos privaram de respostas a um conjunto de perguntas que surgiram após as respectivas análises dos resultados obtidos e que apresentamos aqui como as perspectivas ou sugestões para trabalhos futuros:

> Estudar as possíveis interações entre o dendrímero e a proteína (Sk) utilizando o dicroísmo circular.

> Analisar o mecanismo de transporte de proteínas globulares e não globulares para uma melhor compreensão da interação entre a macromolécula arborescente e o fluído biológico.

> Medir a distribuição de cavidades em função do número de gerações no dendrímero buscando, desta maneira, avaliar a efetiva área superficial da macromolécula sintética.

- Avaliar a citotoxicidade dos sistemas obtidos neste trabalho.
- Estudar a aplicação da estrutura arborescente na engenharia de tecidos biológicos.
- Incorporar fármacos com propriedades anti-inflamatórias às estruturas dendríticas e avaliar sua performance.
- Utilizar o sistema PGLD-Sk no revestimento de stents e verificar sua peformance por técnicas *in-vitro e in-vivo*.

Cada sugestão futura proposta acima tem como objetivo responder a perguntas altamente específicas e, cujas respostas contribuirão fortemente para o total domínio da tecnologia de síntese de macromoléculas dendríticas. Acreditamos que as perguntas merecem respostas não somente para satisfação intelectual, mas procurando também contribuir para que nossas universidades depositem seu "olhar" sobre aqueles que são nossa mais forte e pura motivação de existir academicamente: os excluídos de nossa sociedade.