

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Tese de doutorado

"Desenvolvimento de curativos para cicatrização
de feridas por segunda intenção baseados em
biomateriais capazes de promoverem
resposta celular controlada via estímulo externo”

Autor: Carlos Ignacio

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Junho de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Carlos Ignacio

DESENVOLVIMENTO DE CURATIVOS PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
POR SEGUNDA INTENÇÃO BASEADOS EM BIOMATERIAIS CAPAZES DE
PROMOVEREM RESPOSTA CELULAR CONTROLADA VIA ESTÍMULO
EXTERNO

Defesa de tese de doutorado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica e de Minas da Universidade
Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Ciências e Engenharia de Materiais
Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
2009

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice, pelo apoio, orientação, incentivo.

À Dra. Sandra A. L. Moura, pela solidariedade e amizade, desde o início deste trabalho, no UNILESTEMG e depois no ICB/UFMG.

À Prof. Dra. Lucíola Barcelos, pelo incentivo e incansável colaboração nos experimentos com os animais, tarefa que faz com muito carinho. E pela ajuda na montagem do protocolo do CETEA.

À Prof. Dra. Mônica Diniz Ferreira, pelo incentivo e pela colaboração na interpretação dos resultados de histologia.

À Prof. Dra. Sílvia Passos de Andrade, pela disponibilização do laboratório de Angiogênese.

Aos alunos de graduação, do Curso de Engenharia de Materiais, Igor Alan Soares, Cinthia Brito, Helbert Andrade, Kelly Pontes, que muito colaboraram nos trabalhos.

A José Eugênio de Oliveira e Silva, graduando de engenharia elétrica, pela ajuda na construção da fonte de alta voltagem e do gerador de radiofrequência.

Ao Instituto de Ciências Biológicas ICB-UFMG, pela disponibilização e uso dos laboratórios de Fisiologia e Biofísica e Patologia Geral.

Ao departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – DEMET/UFMG, pela disponibilização das análises de Microscopia Eletrônica e Espectroscopia Infravermelho.

Ao Centro Universitário do Leste de Minas Gerais-UNILESTE, pela disponibilidade de uso dos laboratórios e pela bolsa de doutorado.

À faculdade de farmácia do UNILESTE, pela disponibilização dos laboratórios.

À Fapemig, pela Bolsa de Iniciação Científica Tecnológica e Institucional da FAPEMIG –PROBIC, concedida ao aluno Igor Alan Gomes Soares.

À minha família, pela compreensão nos períodos de ausência.

A tantos outros, que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

Sumário

Agradecimentos	ii
Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	ix
Lista de equações	ix
Abreviaturas.....	x
Resumo	xii
Abstract.....	xiv
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulos 2 - Objetivos	7
Capítulo 3 - Revisão bibliográfica.....	8
3.1 - Epiderme.....	8
3.2 - Derme	9
3.3 - Feridas na pele.....	10
3.4 - Cicatrização	14
3.5 - Curativos.....	20
3.6 - Tipos de curativo	21
3.7 - Polímeros inteligentes.....	25
3.8 – Graftização ou enxertia	37
3.9 - Graftização e adesão de proteínas.....	39
3.10 - Cultura de células e adesão celular	40
3.11 - Técnicas preparatórias de superfícies poliméricas para graftização	44
3.12 – Estudos in vivo com materiais	52
Capítulo 4 – Procedimento Experimental.....	53

4. 1 - Materiais	54
4. 1. 1 - Preparação dos filmes:.....	54
4. 1. 2 - Obtenção do filme	55
4. 1. 3 – Limpeza e extração de contaminantes do filme.....	57
4. 1. 4 - Purificação do monômero – N – isopropilacrilamida (N-IPAAm)	59
4. 1. 5 - Tratamento corona.....	63
4. 1. 6 - Tratamento com radiação Ultravioleta	65
4. 1. 7 - Graftização	66
4. 1. 8 - Medidas do ângulo de contato	68
4. 1. 9 – Transição LCST	69
4. 1. 10 – Espectroscopia infravermelho FTIR-ATR.....	70
4. 1. 11 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
4. 1. 12 - Teste <i>in vitro</i> de adesão em proteína	71
4. 2 - Testes <i>in vivo</i>	72
4. 2. 1 - Preparação do curativo	72
4. 2. 2 - Implantação	73
4.2.3 - Verificação do mecanismo <i>on-off</i> em um modelo de ferida cutânea excisional.	75
Capítulo 5 - Resultados e Discussão.....	83
5.1 - Ângulo de Contato.....	83
5.1 – Ganho de massa – graftização.	85
5.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	87
5.4 - Transição LCST.....	92
5.5 - Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier - FTIR.....	95
5.6 - Testes de adesão com deposição de albumina.....	98
5. 7 - Testes <i>in vivo</i>	101
Capítulo 6 - Conclusão	118
Capítulo 7- Referências Bibliográficas.....	119

Lista de figuras

Figura 1.1: Representação da transição (LCST) nos enxertos de P-N-IPAAm em poliuretano	5
Figura 1.2: Esquema representando o leito de ferida por segunda intenção e curativo....	5
Figura 1.3: Esquema representando curativo posicionado sobre o leito da ferida.....	5
Figura 1.4: Esquema representando proliferação de células.....	6
Figura 1.5: Esquema representando o acionamento <i>on-off</i>	6
Figura 1.6: Esquema representando a retirada do curativo sem trauma.	6
Figura 3.1: Estrutura da pele, indicando principais elementos	10
Figura 3.2: Matriz extracelular (ECM) e fibroblastos	17
Figura 3.3: Esquema gráfico representando os vários estágios de lesão e o tempo de duração.....	18
Figura 3.4: Tipos de feridas - Primeira, segunda e terceira intenção.....	19
Figura 3.5: Fórmula química estrutural para o poli(n-isopropilacrilamida).....	27
Figura 3.6: Transição globular para enovelada.....	27
Figura 3.7: Esquema representando a reação RAFT	30
Figura 3.8: Esquema representativo de polimerização RAFT de P-N-IPAAm	31
Figura 3.17: Efeito do tipo de comonômero na LCST do PNIPAM	32
Figura 3.18: Esquema representativo do hidrogel de PNIPAM	34
Figura 3.19: Esquema representativo da progressão da formação do gel.....	35
Figura 3.20: Gráfico representando Grau de inchamento x Tempo	35
Figura 3.21: Gráfico representando Retenção de água em relação ao tempo.....	36
Figura 3.22: Gráfico: LCST x Concentração de sais no PNIPAM.....	37
Figura 3.10: Esquema representando alguns tipos de <i>polymers brushes</i>	38
Figura 3.11: Esquema representativo de graftização: grafting to e grafting from	39
Figura 3.12: Esquema representando alguns tipos de <i>polymers brushes</i>	40
Figura 3.13: Mecanismo de adesão da célula.	42
Figura 3.14: Esquema representando dispositivo on-off, para camadas de células.....	42

Figura 3.15: Eletromicrografia do cultivo e células sobre superfície com poli (N-IPAAm co DEGMA) à temperatura de 37°C (a) e destacamento após decréscimo de temperatura (b).....	43
Figura 3.16: Esquema representando tipos de adesão de células sobre substrato.	43
Figura 3.23: Esquema representando ângulo de contato entre líquido e sólido.	45
Figura 3.24: Esquema representativo sistema corona ponta-plano.....	48
Figura 3.25: Gráfico de densidade de elétrons em função da energia.	49
Figura 4.1 – Fluxograma da metodologia utilizada	53
Figura 4.2: Poliuretano Elastollan ELA585A10 natural.....	54
Figura 4.3: Poliuretano em piridina a temperatura de 50°C	54
Figura 4.4: Poliuretano totalmente dissolvido em piridina a 50°C.....	55
Figura 4.5: Derramamento da solução sobre a placa de vidro.....	55
Figura 4.6: Início da operação de espalmagem da solução.....	56
Figura 4.7: Fim do processo de espalmagem da solução.....	56
Figura 4.8: Retirada do filme da placa.....	57
Figura 4.9: Extrator Soxhlet.....	58
Figura 4.10: Detalhe da câmara do Soxhlet com filme de PU.....	58
Figura 4.11: N – isopropilacrilamida sendo preparado para purificação.....	59
Figura 4.12: N- hexano adicionado ao n-isopropilacrilamida (N-IPAAm).	59
Figura 4.13: Dissolução de N-IPAAm em n-hexano com aquecimento e agitação.	60
Figura 4.14: Dissolução total de N-IPAAm em n-hexano a 60°C.	60
Figura 4.15: Filtragem à vácuo da solução de N-IPAAm em n-hexano.....	61
Figura 4.16: Solução filtrada de N-IPAAm em n-hexano.	61
Figura 4.17: N-IPAAm purificado e totalmente separado do n-hexano.	62
Figura 4.18: Sistema de secagem à vácuo de N-IPAAm.....	62
Figura 4.19: Sistema para tratamento corona do filme de PU.....	64
Figura 4.20: Sistema para tratamento corona do filme de PU.....	64
Figura 4.21: Câmara de vácuo/gás indicando cor azul na abertura do arco elétrico	65
Figura 4.22: Tratamento com radiação ultravioleta.....	66
Figura 4.23: Filme de PU exposto ao UV.....	66
Figura 4.24: Sistema do reator com atmosfera controlada.	67

Figura 4.25: Reator para graftização.....	67
Figura 4.26: Porta amostra do filme na medida do ângulo de contato.	68
Figura 4.27: Lupa para observação do ângulo de contato	69
Figura 4.28: Esquema representativo para medição da LCST.....	70
Figura 4.29: Montagem do curativo.	73
Figura 4.30: Acondicionamento dos camundongos no biotério.	75
Figura 4.31: Aplicação de anestesia no camundongo.	76
Figura 4.32: Preparação da pele do dorso do camundongo.	76
Figura 4.33: Excisão da pelr com <i>punch</i>	77
Figura 4.34: Feridas prontas para serem cobertas.....	77
Figura 4.35: Feridas recobertas com curativos	78
Figura 4.36: Reforço para assegurar a montagem do conjunto.	78
Figura 4.37: Medidas das feridas.....	78
Figura 4.38: Termômetro à laser para leitura da temperatura da pele.	79
Figura 4.39: Leitura de temperatura sobre o curativo.....	80
Figura 4.40: Retirada do curativo.	80
Figura 4.41: Retirada do curativo	80
Figura 4.42: Retirada do tecido região das feridas dorso do camundongo.....	81
Figura 4.43: Vista das feridas lado interno da pele.e a direita esquema representativo. 81	
Figura 4.44: Seccionamento com <i>punch</i> , para análises histológicas	81
Figura 4.45: Preparação para fixação.(A) Feridas sendo seccionadas.....	82
Figura 4.46: Acondicionamento do tecido em formalina (A).....	82
Figura 5.1: Molhabilidade de uma gota de água deionizada sobre asuperfície do PU graftizado com P-N-IPAAm	83
Figura 5.2: Esquema representativo da formação de grupos	84
Figura 5.3: Esquema representativo da graftização poli-N-Isopropilacrilamida superfície de poliuretano	85
Figura 5.5: Eletromicrografia do PU graftizado após tratamento corona.....	87
Figura 5.6: Eletromicrografia do poliuretano graftizado com P-N- IPAAm.....	88
Figura 5.7: Eletromicrografia do poliuretano graftizado com P-N-IPAAm.....	88
Figura 5.8: Eletromicrografia do poliuretano graftizado com P-N-IPAAm.....	89

Figura 5.9: Eletromicrografia do poliuretano poroso sem <i>grafts</i>	90
Figura 5.10: Eletromicrografia do poliuretano poroso com <i>grafts</i>	90
Figura 5.11: Eletromicrografia do poliuretano poroso sem graft.	91
Figura 5.12: Eletromicrografia do poliuretano poroso com graft.	91
Figura 5.13: Eletromicrografia do poliuretano poroso graftizado.	92
Figura 5.14: Poliuretano graftizado com P-N-IPAAm. T= 31,7°C.	93
Figura 5.15: Poliuretano graftizado com P-N-IPAAm T= 32,2°C.	93
Figura 5.16. esquema representativo do estado das moléculas.....	94
Figura 5.17 - Esquema representativo da estrutura química do	95
Figura 5.18 - Esquema representativo da estrutura química do poliuretano.	95
Figura 5.19: Espectros na região do infravermelho de filmes: PU puro sem <i>grafts</i> (A), PU tratado com UV (B), PU graftizado com P-N-IPAAm (C)	96
Figura 5.20: Espectros na região do infravermelho de PU tratado corona e graftizado.	97
Figura 5.21: Gráfico indicando deposição e adesão de albumina.....	99
Figura 5.22: Esquema representativo da deposição de albumina, sobre a superfície de poliuretano com <i>grafts</i> de P-N-IPAAm.	100
Figura 5.24 – Cortes histológicos de implantes de P-N-IPAAm com 7 dias.....	103
Figura 5.25: Grau de contração das feridas sem e com cobertura	105
Figura 5.26: Feridas excisionais em camundongos	106
Figura 5.27: Testes <i>on-off</i> para verificação de aderência	107
Figura 5.28: Esquema representativo do corte do tecido.....	109
Figura 5.29 – Corte de pele normal de camundongo Swiss	110
Figura 5.30A – Pele de camundongo mostrando área de lesão Ferida sem cobertura.	112
Figura 5.31A.- Pele de camundongo mostrando área de lesão Ferida com cobertura de PU com <i>grafts</i> . Coloração H&E.	114
Figura 5.32 – Pele de camundongo mostrando área de lesão cobertura de poliuretano e sem graft..	116

Lista de tabelas

Tabela 3.1. Relação de formulação para polimerização.....	29
Tabela 3.2 LCST de polímeros a base de acrilamida.....	33
Tabela 3.3 Tipos de polímeros com sua representação química e o valor da tensão superficial.....	46
Tabela 5.1 Ângulo de contato entre água deionizada e material.....	84
Tabela 5.2 Ganho de massa após graftização.....	86

Lista de equações

Equação 3.1.....	45
Equação 3.2.....	51
Equação 4.1.....	78
Equação 4.2.....	79

Abreviaturas

AAm - Monômero acrilamida

ATR – Attenuated Total Reflection

AIBN - 4,4'azobis(isobutyronitrile)

ASTM – American Standard Testing Materials

DMA – Dynamical Mechanical Analysis

DSC – Differential Scanning Calorimeter

DTE - Ditioester

ESCA – Electron Spectroscopy for Chemical Analysis

FTIR – Fourier Transformed Infrared

GPC – Cromatografia de Permeação a GEL

HEMA - Monômero 2-hidroxietil metacrilato

HPMA – Hidroxipropilmetacrilamida

IPN – Interpenetrant Polymers Network

ISO – International Standard Organization

LCST – Low Critical Solution Temperature.

LDH – Teste de citotoxicidade

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura.

MTT – MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – teste citotoxicidade

MBAAm - *N, N'*-metileno-bisacrilamide

NIPAM – Monômero n-isopropilacrilamida

N-tBAAm - Monômero butil acrilamida

M_N - Massa Molar Numérica Média

M_W - Massa Molar Ponderal Média

PHPMA – Poli Hidroxipropilmetacrilamida

P-N-IPAAm – Poli(n-isopropilacrilamida).

PDI- Índice de Poli Dispersão

RAFT - Reservible Addition Fragmentation Chain Transfer

RMN-H Ressonância Magnética Nuclear – Hidrogênio.

RMN-C¹³ Ressonância Magnética Nuclear – Carbono 13

PU - Poliuretano

SEC - Cromatografia por exclusão de tamanho

T_g – Temperatura de transição vítrea

UV-VIS – Espectroscopia Ultra Violeta Visível.

XPS – Espectroscopia fotoelétrica de raios-x

Resumo

O mercado conta hoje com uma gama variada de curativos que têm por finalidade básica proteger feridas de possíveis infecções e ressecamento durante sua cicatrização. A evolução científica aliada à elevada incidência de feridas cicatrizadas por segunda intenção e seus altos custos para a saúde pública têm estimulado pesquisadores de diversas regiões do mundo a buscar soluções mais eficientes e baratas, pautados na convicção de que um curativo não tem apenas que proteger feridas. Um bom curativo deve proporcionar proteção aos ferimentos, potencializar condições adequadas para a recuperação dos tecidos lesados, dar suporte para a fixação celular e desenvolvimento do novo tecido sadio. A estratégia, mais frequentemente utilizada, tem sido a de acelerar os mecanismos de proliferação celular buscando propiciar melhores condições para a recuperação da pele. Neste trabalho buscou-se, elaborar um novo curativo que protegesse, contribuísse para a reconstrução tecidual e que no momento adequado e previamente estipulado, pudesse ser removido do tecido neoformado por meio de um estímulo externo favorecendo o descolamento celular sem causar-lhe dano sensível. Utilizou-se, para desenvolvê-lo, polímeros baseados no poli (N-isopropilacrilamida) (P-N-IPAAM) que é sensível a estímulos externos pois possui a propriedade de transição de fase (LCST), que o torna hidrofílico quando atinge temperaturas abaixo de 32° C e hidrofóbico para temperaturas acima de 32°C. A hipótese principal envolveu a utilização do comportamento desse polímero em contato com as novas células. Enquanto hidrofóbico, o polímero favorece a adesão de proteínas e células, porém, quando tornado hidrofílico (abaixo da temperatura de transição), proporciona uma perda da aderência celular, denominado como mecanismo *on-off*. A estrutura do curativo utilizado possuía duas camadas, sendo a primeira composta por um filme de poliuretano (PU) com 50µm de espessura, cuja função é a proteção do ferimento e a segunda composta por uma micro camada de enxertos de P-N-IPAAM, com a função de proporcionar boas condições para atividade celular e o mecanismo *on-off*. Na primeira camada utilizou-se filmes de poliuretano termoplástico que foram fabricados por processo de espalmagem. Para inserir os enxertos de P-N-IPAAM, foi necessária a formação de grupos reativos à superfície do filme de PU, para isto utilizou-se dois tipos

de tratamentos diferentes: efeito corona e radiação ultravioleta. O tratamento por radiação ultravioleta se mostrou mais simples e eficiente, na formação desses grupos. Realizou-se nos filmes tratados com radiação ultravioleta o processo de enxertia de moléculas de P-N-IPAAm por polimerização radicalar em solução, utilizando-se nitrato cérico amoniacal como iniciador, e obtendo-se camadas de polímero enxertado de 3 a 8µm de espessura. Detectou-se a transição LCST do P-N-IPAAm enxertado ao substrato de poliuretano em torno de 32°C. Essa transição pode ser visualizada pelo ponto de turvação do filme e por diferenças na molhabilidade com água (ângulo de contato). Realizaram-se também os testes do mecanismo *on-off in vitro*, com a proteína albumina, fazendo a variação da temperatura acima e abaixo da transição LCST do P-N-IPAAm. Os resultados obtidos indicaram que a camada enxertada é adequada para viabilizar o mecanismo *on-off* e assim permitir o controle sobre o processo de adsorção e dessorção de albumina. Realizaram-se também testes de mecanismo *on-off in vivo* através de cobertura de lesão excisional feita em camundongos tipo Swiss, colocando-se o material em contato direto com a ferida durante três dias e verificou-se que o tecido não estava aderido ao curativo no momento da retirada do curativo. Não foi possível verificar e registrar o mecanismo *on-off* do curativo, devido à rápida diminuição de temperatura da pele dos camundongos após a anestesia, registrada em 28°C, e esta é uma temperatura abaixo da LCST. Portanto para obter-mos resultados mais conclusivos será necessário a manipulação da LCST para abaixo de 25°C. Entretanto verificou-se através das análises histológicas do processo de cicatrização, que as feridas com cobertura apresentaram processo inflamatório menos intenso e tecido conjuntivo mais denso do que as feridas sem cobertura. As feridas cobertas com curativos possuindo enxertos (grafts) apresentaram sinais de reepitelização e angiogênese mais intenso.

Abstract

The high incidence of wound healing by second intention and the high costs associated with their treatment are changing the idea that healing dressing is just for wound protection but to accelerate cell proliferation and to provide good conditions for the skin recuperation. In this work, a new curative was developed that would be able, in the appropriate and programmed moment, to be removed from the new tissue through an external stimulus that would favor cellular detachment without extensive damages. We used for such, polymers based in poly (N-isopropylacrylamide) (P-N-IPAAm), that is sensitive to external stimulus. This polymer has a phase transition that turns it hydrophilic when it is used in temperatures below 32°C and hydrophobic for temperatures above 32°C. The main hypothesis of this work involved the use of the behavior of this polymer in contact with the cells that participate in the wound healing process. While hydrophobic, the polymer can favor protein adhesion, however, when turned hydrophilic (below the transition temperature), it can lead to cellular detachment, the so called on-off mechanism. We prepared a wound dressing with two layers, being the first composed by a polyurethane film (PU) with 50µm of thickness, whose function was the protection of the wound and the second composed by a micro layer of grafts of P-N-IPAAm, whose function is to provide good conditions for cellular activity and the mechanism on-off. Thermoplastic PU films were manufactured by lamination process and the P-N-IPAAm were grafted onto previously created reactive groups on the surface of the PU film. Two types of treatments were used to activate the surface: corona effect and the ultraviolet radiation. The treatment by ultraviolet radiation was shown to be easier to use and more efficient. The grafting process of P-N-IPAAm molecules was accomplished by radical polymerization in solution using ceric ammonium nitrate as the initiator. Layers ranging from 3 to 8 µm of thickness of grafts were obtained. The transition LCST of P-N-IPAAm grafted to the PU was detected around 32°C. This transition was monitored by checking the cloudy point of the film and by measuring the contact angle as a function of the temperature. The mechanism on-off in vitro was

studied by measuring the adsorption of albumin in temperatures above and below the LCST transition of P-N-IPAAm. Results showed that the grafted layer is able to display the on-off mechanism to allow the control of the process of albumin adsorption/desorption. They also took place tests of mechanism on-off in vivo through covering of lesion excisional done in mice type Swiss, being put the material in direct contact with the wound for three days and it was verified that the tissue was not adhered to the curative in the moment of the retreat of the curative. It was not possible to verify and to register the mechanism on-off of the curative, due to the fast decrease of temperature of the skin mice after the anesthesia, there was fall temperature of the skin, registered in 28°C that it is below LCST (32°C), at this stage no adherence between the tissues and the curative could be noticed. Therefore to get more conclusive results it will be necessary to manipulate the LCST of the grafts for a temperature below 25°C. However it was verified through histological analyses of cicatrization process, that wounds with curatives presented less intense inflammatory process and denser conjunctive tissue than the wounds without covering. The wounds with covered by PU with grafts showed signs of more intense re-epithelization and angiogenesis.

Capítulo 1 - Introdução

A pele é o maior órgão do corpo humano e recobre toda a sua superfície, constituindo cerca de 20% do peso corporal. É dividida em duas camadas distintas: a epiderme e a derme. A epiderme é a camada externa, composta por diferentes tipos celulares: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans e de Merkel. A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo, constituído por fibras de colágeno e elastina com numerosos fibrócitos que sintetizam estas proteínas e sustentam o tecido, a derme também é constituído por mastócitos perivascular e dendrócitos, importantes na imunidade e reparo da derme¹. Além de fazer a comunicação com o meio ambiente, a pele tem a finalidade de proteção química, física, biológica e realiza, entre outras funções, a termoregulação e proteção imunológica. Entretanto, alguns danos, que geralmente se manifestam na forma de feridas, podem comprometer sua anatomia e fisiologia² e cuidados específicos devem ser tomados, para que não haja um maior comprometimento do organismo. Dealey³ conceitua ferida como “*qualquer lesão que leve a uma quebra da continuidade da pele*”, ou seja, qualquer ruptura que comprometa a principal barreira de proteção do nosso organismo. Existem variados tipos e formas de feridas, e vários e amplos são os estudos existentes a respeito do tema, mas, restringiremos nosso escopo às feridas crônicas que são, em sua origem, manifestação de doença subjacente e costumam vir associadas a eventos vasculares locais ou sistêmicos.

De modo geral, as feridas são classificadas como agudas ou crônicas. Aquelas, normalmente, duram menos que oito semanas, já estas, são assim denominadas, por falharem em seu processo normal de cicatrização, requerendo um tempo maior para cicatrizar; ou não cicatrizando completamente; ou tornando-se recorrente.² As queimaduras severas, diabéticas, úlceras de pressão (decúbito), úlceras venosas são consideradas feridas crônicas.^{4,5} Sua origem pode decorrer como consequência de uma agressão ao tecido vivo; associada à diabetes ou a má circulação sanguínea local ou do avanço da idade; gerando incômodo e perda de qualidade de vida para o paciente.

Embasados na literatura médica³ sabe-se que, somente na América Latina, anualmente, surgem aproximadamente 1,1 milhões de novos casos de feridas crônicas. Cerca de 4% dos portadores de diabetes sofrem com úlcera ativa e ainda 1% de pessoas com mais de 65 anos sofrem com úlceras de pressão. A úlcera de pressão é uma ferida que ocorre em pacientes acamados por longo tempo, atingindo tanto jovens como idosos e gerando custos elevados. Recentes estimativas do custo³ de seu tratamento (clínico e cirúrgico) revelaram custo médio hospitalar de US\$ 21.675,00. Quando um paciente com fratura de colo de fêmur desenvolve uma úlcera de pressão, os encargos hospitalares aumentam em média US\$10.986,00/paciente. No paciente cirúrgico, o grande impacto nos custos de internação parece ser determinado pela presença ou não de complicações pós-operatórias, as quais podem alterar significativamente o período de internação.³

Moryson⁶ afirma que, no Brasil, embora não haja dados confiáveis sobre o número de pessoas acometidas por feridas crônicas, alguns trabalhos relatam que a cronificação de lesões, em especial as úlceras crônicas dos pés e pernas é extremamente alta, causando grande impacto psíquico, social e econômico sobre o indivíduo por ela acometido. Os portadores dessas lesões, com frequência, desenvolvem seqüelas que podem levar à perda de membros e de suas funções, com conseqüente afastamento do trabalho e de suas atividades normais o que vem a repercutir em elevados custos financeiros e profundas conseqüências sociais tanto para o cidadão quanto para o país.

As feridas crônicas demandam atenção e exigem tratamento especializado para obtenção de retorno funcional e anatômico da região. Havendo grande perda de pele ou presença de dificuldades para a cicatrização, é necessário fazer a cobertura imediata com um curativo⁷. Este terá a função de proteger a área da perda de fluidos e proteínas, prevenir infecção por bactérias e subseqüente danos aos tecidos e, em alguns casos, estimular a cicatrização por possibilitar um suporte para a proliferação de células enfim, procurando substituir, paliativamente, a função natural da pele.

Focando o olhar para uma maior qualidade de vida aos portadores de feridas crônicas e redução de custos hospitalares, chegamos à conclusão de que um novo conceito de

curativo é necessário. Desenvolvendo-se curativos que ajam de forma mais efetiva na ferida acelerando seu processo de cicatrização, proporcionar-se-ia menor tempo de internação e maior conforto aos pacientes. Entretanto, para que se atinja com eficácia a população é preciso que ocorra, concomitantemente, o desenvolvimento de matéria-prima mais abundante e barata, processos de fabricação automatizados e métodos de esterilização mais simples.

A grande maioria dos curativos encontrados no mercado brasileiro hoje é importada e/ou têm tecnologia patenteada por empresas multinacionais ⁴. Atualmente, há um grande número de pesquisadores ^{8, 9, 10, 11, 12, 13} trabalhando na síntese e modificação de novos materiais biocompatíveis para aplicação em curativos e grandes avanços têm ocorrido na compreensão dos processos e fenômenos envolvidos nas diversas fases da reparação tissular, porém, muito há, ainda, a se pesquisar. Fundamentalmente, os curativos têm sido construídos dentro do padrão “dupla camada” ¹⁴ tendo uma camada elástica externa e uma subcamada interna. Aquela é, geralmente, feita utilizando poliuretano ou silicone substituindo artificialmente a epiderme e essa é feita utilizando um hidrogel, que, dada a sua alta capacidade de absorção de água, funciona como um armazenador do exsudato da ferida, propiciando a manutenção do ambiente úmido que promove o debridamento natural de tecido necrosado. ^{10, 15}

Os curativos oferecidos no mercado atual se deparam com dois efeitos determinantes e antagônicos entre si que são: adesão ativa e adesão passiva. ^{11, 17} Para que ocorra a cicatrização é preciso obter tensões superficiais adequadas que proporcionem boa aderência para a ativação, proliferação e diferenciação das células (adesão ativa), mas em contraponto, esse mesmo efeito torna-se indesejado na retirada do curativo, pois arrasta consigo uma boa parte do tecido neoformado, abrindo novamente a ferida.

A proposta deste trabalho é desenvolver um curativo que possua um sistema de acionamento e desligamento (*on-off*) ^{20, 21, 22} de aderência à ferida que irá como consequência, acelerar o processo de cicatrização sem, contudo gerar danos quando da sua retirada. A estrutura projetada utilizará a mesma estratégia do curativo de duas

camadas, ou seja, uma primeira camada substituindo a epiderme protegendo o ferimento, impedindo a entrada de bactérias e permitindo a troca de gases, porém, inovando na segunda, que possuirá uma interface especial (poli (N-isopropilacrilamida)) que estará em contato direto com as células.²³ Essa interface terá a capacidade de modificar sua natureza ao passar por sua temperatura crítica (LSCT)^{22,24,25} de 32°C. A hipótese principal desta tese é de que o poli (n-isopropilacrilamida) à temperatura do corpo humano será capaz de proporcionar um nível de tensão superficial mais adequado à proliferação e adesão das células (hidrofóbico). E, no momento da retirada do curativo, bastará mudar a sua temperatura, alterando a natureza hidrofóbica do polímero para hidrofílica, para proporcionar um descolamento suave do tecido neoformado sem causar danos às células.

O trabalho foi dividido em três etapas, sendo que a primeira foi dedicada a preparação do filme polimérico e preparação de uma interface especial construída pela graftização (enxertia) de poli (N-isopropilacrilamida) em sua superfície.

A segunda etapa foi dedicada à caracterização química, física e morfológica da superfície do polímero. Esses testes foram necessários para se compreender suas propriedades.

A terceira etapa foi dedicada aos testes *in vitro* e *in vivo* para verificar reações inflamatórias e cinéticas de cicatrização, bem como testar os mecanismos de desligamento (*on - off*) *in vivo*.

As Figuras 1.1 a 1.6 ilustram a estratégia proposta para o curativo com mecanismo inteligente de desligamento.

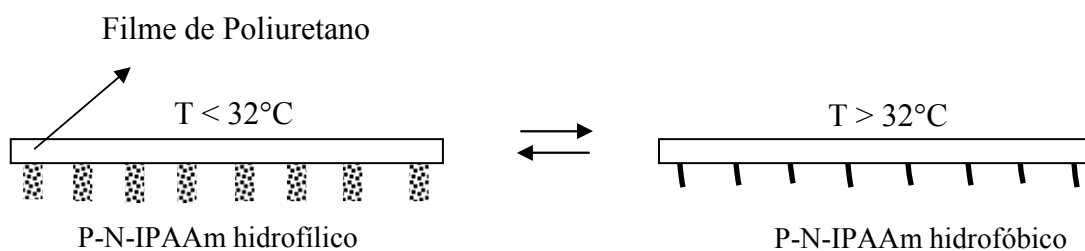


Figura 1.1: Representação da transição (LCST) nos enxertos de P-N-IPAAm em poliuretano

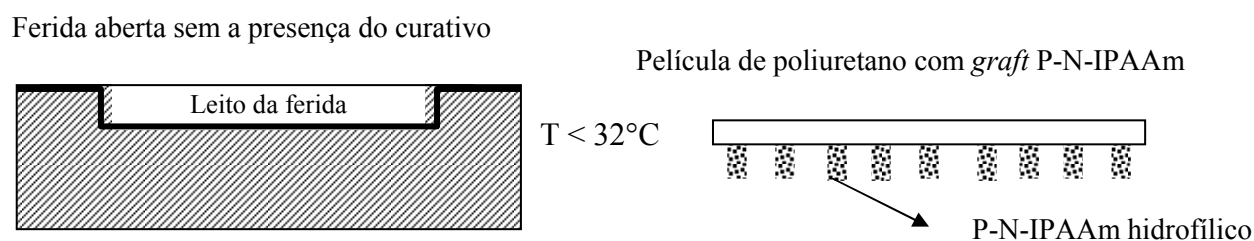


Figura 1.2: Esquema representando o leito de ferida por segunda intenção e curativo

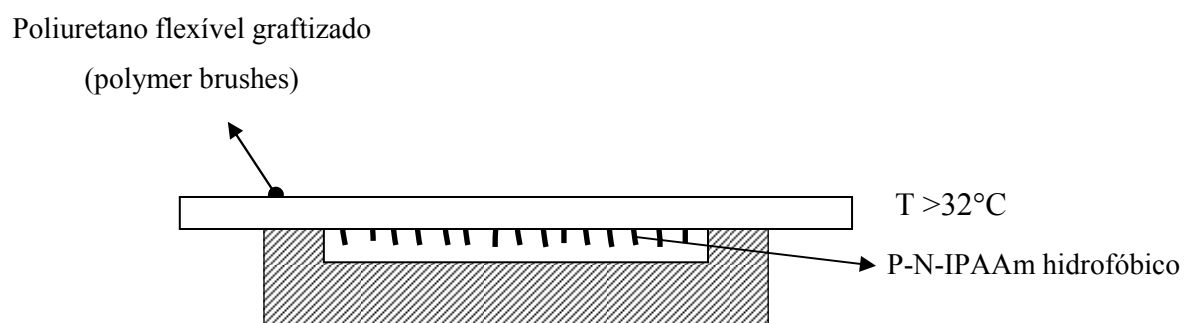


Figura 1.3: Esquema representando curativo posicionado sobre o leito da ferida.

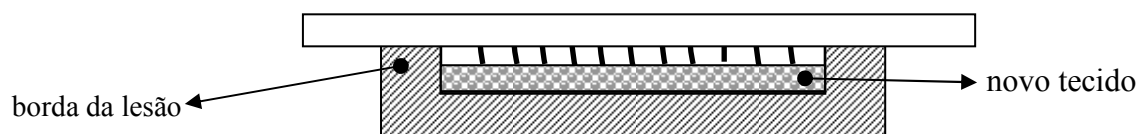


Figura 1.4: Esquema representando proliferação de células em contato com o P-N-IPAAm

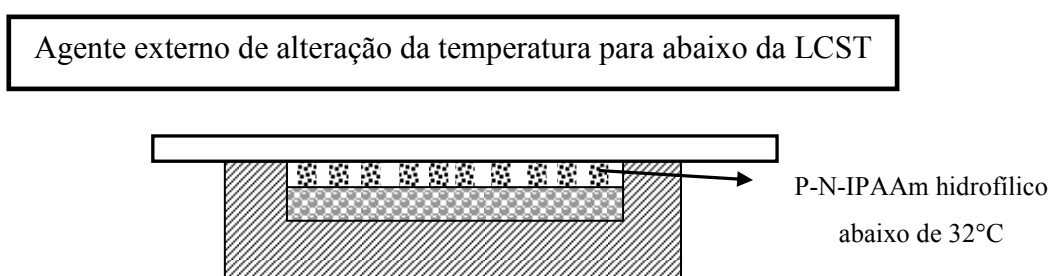


Figura 1.5: Esquema representando o acionamento *on-off*

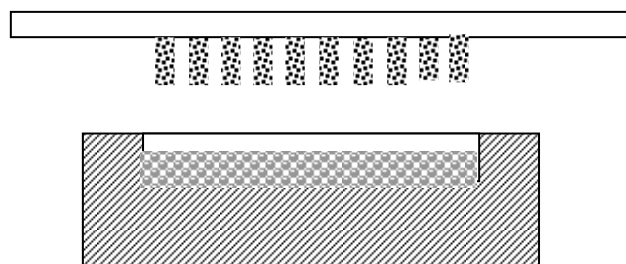


Figura 1.6: Esquema representando a retirada do curativo sem trauma.

Capítulos 2 - Objetivos

Objetivo geral

Estudar o potencial do uso de cadeias enxertadas de poli (N-isopropilacrilamida) em substratos de poliuretano visando a geração de curativos avançados inteligentes capazes de modular processos de adesão celular e tissular a partir de estímulos externos.

Objetivos específicos:

- Avaliar a efetividade do processo corona e de radiação ultravioleta em preparar a superfície dos filmes de poliuretano para receber os enxertos (*grafts*) de P-N-IPAAm;
- Enxertar polímeros baseados no poli (N-isopropilacrilamida) na superfície do poliuretano por polimerização em solução aquosa;
- Caracterizar o sistema polimérico obtido;
- Verificar a transição LCST na superfície do poliuretano graftizado.
- Avaliar a mecanismo *on-off in vitro* através da adesão de proteínas no poliuretano graftizado
- Avaliar *in vivo* os curativos desenvolvidos, visando monitorar: eficiência na recuperação do ferimento e mecanismo *on-off* de descolamento do curativo.

Capítulo 3 - Revisão bibliográfica

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a 15% do peso de uma pessoa e exerce diversas funções como: regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo, proteção contra agentes diversos do meio ambiente. Compete-lhe também funções sensoriais de proteção ao calor, frio, pressão, dor e tato. Protege o corpo de invasão por parasitas e injúrias mecânicas. A melanina produzida pelos seus melanócitos atua no sentido de proteger o corpo contra a radiação ultravioleta. É um órgão vital composto de vários tipos de células estruturadas por uma matriz extracelular. É formada pela epiderme e pela derme, e embora a hipoderme esteja localizada logo abaixo da derme, não é considerada como parte da pele ¹.

3.1 - Epiderme

A epiderme tem, entre suas funções, prevenir a perda de calor e de água para o ambiente, e a infiltração de bactérias. Seu principal componente é o queratinócito, que forma estruturas mantidas unidas por desmossomas, que promovem adesão célula a célula, que dá origem à camada córnea, composta basicamente de queratina, uma proteína responsável pela impermeabilização da pele. Não possui vasos, os nutrientes e o oxigênio chegam a ela por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme. Em geral a epiderme possui quatro camadas, a camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e a camada córnea. ^{1, 2, 4}

O extrato ou camada basal é responsável pela reposição celular, a renovação celular constante da epiderme faz com que as células da camada córnea sejam gradativamente eliminadas e substituídas por outras. Esta camada está em um plano mais profundo, em contato com a derme. É constituído por células cúbicas ou prismáticas pouco diferenciadas que apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela renovação constante da epiderme. Contém citoqueratina, algumas destas células

diferenciam-se e passam para as camadas mais superficiais, enquanto outras permanecem na camada basal e continuam a se dividir¹.

Na camada espinhosa, encontramos células poligonais cúbicas, cubóides ou ligeiramente achatadas com mais queratina que as basais. Começam a formar junções celulares umas com as outras, como desmosomas, dando o aspecto de espinhos¹.

Na camada granulosa, as células são poligonais achatadas com núcleo central, com grânulos de queratina proeminentes.¹

A camada córnea é a camada mais externa, constituída de células achatadas eosinófilas sem núcleo (mortas) com grande quantidade de filamentos, principalmente queratinas¹.

3.2 - Derme

A derme é um tecido conjuntivo que sustenta a epiderme. É constituída por numerosos fibrócitos que sintetizam as proteínas das fibrilas do colágeno e da elastina que sustentam o tecido. É composta pela região papilar de contato com a epiderme e pela região reticular mais densa. É na derme que se localizam os vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição da epiderme e também os nervos e órgãos sensoriais a eles associados.^{1,2} Estes incluem vários tipos de sensores:

- Corpúsculo de Vater-Pacini, sensíveis à pressão;
- Corpúsculo de Meissner com função de detecção de pressões de intensidades variadas;
- Órgão de Ruffni, sensíveis ao calor;
- Célula de Merckel, sensíveis a tato e pressão;
- Folículo piloso, com terminações nervosas associadas;
- Terminação nervosa livre, com dendritos livres sensíveis.

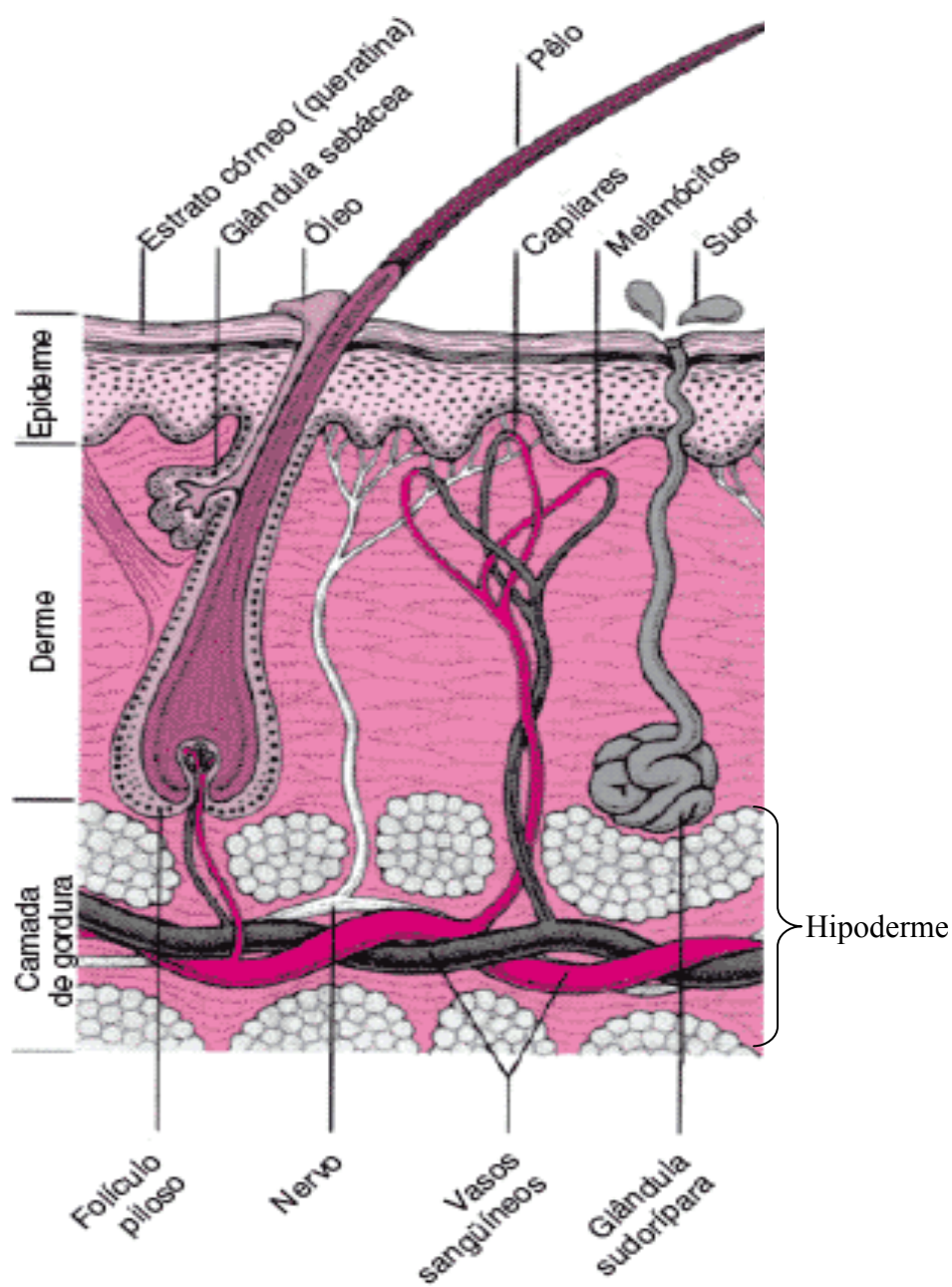


Figura 3.1: Estrutura da pele, indicando principais elementos
(fonte: Merck)

3.3 - Feridas na pele

Ferida pode ser definida como qualquer ruptura da integridade da pele, membranas mucosas ou qualquer outra estrutura do corpo⁵ podendo ser causada por traumas físicos,

químicos ou desencadeada por uma afecção clínica, apresentando-se de diversas formas, tamanhos e profundidades ²⁶.

3.3.1 - Úlceras de Pressão ou Decúbito

Úlceras de Pressão ou Decúbito são úlceras decorrentes de isquemia tecidual local provocada pela alteração do reflexo de dor em pacientes com lesão medular (tetraplégicos, paraplégicos ou hemiplégicos) ou pacientes debilitados, idosos ou cronicamente doentes. As úlceras de pressão têm sido alvo de grande atenção nos EUA, devido a uma população de idosos vivendo em instituições de longa permanência, estimada em torno de 1,5 milhões, sendo que, dentre estes, cerca de 25% a 33% chegam a essas instituições já portando úlceras de pressão, e que aproximadamente 35% deles ainda as desenvolverão em algum tempo de sua estadia. Sendo ainda causa indireta de morte em paraplégicos, com uma frequência de 7 a 8%.²⁷

A etiologia da úlcera de pressão ainda não está totalmente esclarecida, mas é sabido que a pressão contínua sobre a pele é fator preponderante. Estudos indicam que pressão entre 60 e 580mmHg no período de 1 a 6 horas pode ocasioná-las. Além da pressão, forças de cisalhamento e fricção podem agir sinergicamente no desenvolvimento de uma ferida em pacientes que estão desnutridos, incontinentes, acamados ou com distúrbios mentais ⁶.

Uma úlcera de pressão em seu primeiro estágio é uma alteração observável relacionada com pressão na pele íntegra, cujos indicadores comparativos à área adjacente ou oposta do corpo podem incluir mudanças em uma ou mais das seguintes condições: temperatura da pele (aquecimento ou resfriamento) e/ou sensibilidade (dor, prurido). Ela manifesta-se como uma área definida de hiperemia persistente na pele pouco pigmentada, ao passo que, em peles mais escuras, ela pode manifestar-se com tonalidades persistentes de vermelho, azul ou púrpura.²⁷

O segundo estágio é caracterizado por perda cutânea de espessura parcial envolvendo epiderme ou derme. É superficial e manifesta-se clinicamente por abrasão, flictema ou cratera rasa.²⁷

O terceiro estágio é determinado por perda cutânea de espessura total envolvendo lesão ou necrose do tecido subcutâneo que pode se estender até a fáscia (tecido conjuntivo) subjacente, sem atravessá-la. Manifesta-se clinicamente como uma cratera profunda.²⁷

No quarto estágio nota-se a perda cutânea de espessura total com destruição extensa, necrose tecidual ou lesão muscular, óssea ou das estruturas de suporte (por ex.: tendão ou cápsula articular). A formação de túneis ou de tratos fistulosos também pode estar associada nesse estágio.²⁷

3.3.2 - Úlceras Venosas ou de estase

Ferida que surge nas pernas e/ou pés em consequência da dificuldade do sangue voltar para o coração. As úlceras dos membros inferiores são muito freqüentes, extremamente incapacitantes e afetam de modo significativo a produtividade e a qualidade de vida dos indivíduos, além de determinar gastos significativos para os serviços de saúde. Os três principais tipos de úlceras dos membros inferiores são as venosas, as arteriais e as neuropáticas. As venosas são as mais comuns, representando 80% das úlceras de pernas. A causa mais comum e importante das úlceras dos membros inferiores é a insuficiência venosa crônica, seguida de arteriosclerose, que representa de 10 a 25% de todas as úlceras; e que pode coexistir com a doença venosa. A maioria das úlceras venosas é tratada com alguma forma de compressão (bandagens compressivas / bota de Unna), e, portanto, se houver algum grau de insuficiência arterial nesses doentes, esse tipo de tratamento tão utilizado na rotina médica poderá, além de ser pouco benéfico, retardar a cicatrização da úlcera e causar danos maiores, como maior isquemia do membro acometido.²⁸

As terapias de compressão são consideradas o ponto mais importante da cicatrização, pois facilita o retorno venoso, impedindo a estase e conseqüentemente a trombose e

necrose. Consistem de alta compressão graduada, capaz de manter o local comprimido por até 1 semana. Os dispositivos de compressão permitem manter um curativo simples e não-aderente sobre a úlcera, propiciando um ambiente de cicatrização úmido e limpo. Em alguns casos é possível determinar o tipo de bactérias que infecta a ferida e administrar medicamentos tópicos. Não há um curativo em particular que seja mais efetivo na cicatrização das úlceras venosas de perna. O recomendável é que o curativo tenha baixo custo e seja pouco ou não-aderente, para evitar danos ao leito da ferida²⁹ no momento de sua retirada.

O tratamento de úlceras venosas tem custos substanciais em todo o mundo. Na Escandinávia, o custo do tratamento tem sido estimado em U\$25 milhões/ano (1985 US dólares); na Inglaterra, em U\$200 milhões/ano (1989 US dólares). Nos EUA, as feridas crônicas geram gastos em torno de 7 bilhões/ano e as venosas por volta de U\$ 1 bilhão/ano.³⁰

3.3.3 - Queimadura

As lesões cutâneas causadas por queimaduras ocupam o terceiro lugar entre os acidentes que mais ocorrem no mundo. No Brasil, as estatísticas publicadas são escassas e desatualizadas e, segundo os dados fornecidos pelo Ministério da Saúde (2000), o Sistema Único de Saúde (SUS) gasta anualmente, cerca de R\$ 55 milhões com o tratamento.³¹

Um recente levantamento, realizado por Dallan³¹, em sua dissertação, aponta que para o tratamento de queimaduras, há atualmente no mercado cerca de 120 tipos de produtos constituídos de diversos materiais, sendo quase todos importados. Dentre eles, há somente dois produtos nacionais: um biomaterial do tipo hidrogel reforçado com fibras de polipropileno para uso em queimaduras que foi desenvolvido pelos Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP, Brasil) e Instituto de Pesquisas e Energia Nuclear (IPEN, São Paulo, SP, Brasil) e uma biomembrana natural, sintetizada por bactérias, que foi desenvolvido pela empresa Bionext Produtos Biotecnológicos (São Paulo, SP) em parceria com pesquisadores do Instituto de

Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP, campus em Araraquara, SP) e do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP, campus em São Carlos, SP). Esta mesma dissertação aponta que, apesar da diversidade de materiais, o custo do tratamento é bastante elevado, sendo fatores preponderantes o custo dos curativos e a necessidade de troca freqüente.

A ferida causada por queimaduras é classificada segundo o grau de gravidade, sendo que a queimadura de primeiro grau é bem superficial e tem como característica não atingir funções hemodinâmicas e apresenta alteração da cor da pele. A de segundo grau tem como característica atingir a epiderme e a derme e causa alterações nas funções hemodinâmicas e tem uma característica bem peculiar que é a presença de bolhas. A de terceiro grau é profunda, atingindo todas as camadas da pele e ainda tecidos subjacentes atingindo os tecidos subcutâneos, o tecido ósseo, os músculos. A de quarto grau tem como característica a carbonização dos tecidos.³¹

O tratamento das lesões por queimaduras é um grande desafio aos profissionais da saúde, devido, sobretudo, ao elevado potencial para desenvolvimento de infecções. A terapêutica sistêmica ou local visa, fundamentalmente, o equilíbrio das funções vitais assim como a instalação de medidas de prevenção de complicações, dentre as quais estão as infecções. Após a lesão, uma grande quantidade do líquido extracelular é seqüestrada para a área lesada, podendo este desvio de líquido causar falência dos órgãos e dos tecidos restantes do corpo.³²

3.4 - Cicatrização

Cicatrização de feridas é um tipo de reparo dos tecidos humanos e envolve uma seqüência complexa de eventos¹⁴. Fatores de crescimentos peptídicos produzidos por plaquetas, macrófagos, células epidérmicas e dérmicas são muito importantes na reconstrução dos tecidos.^{8, 9, 13, 33} O processo de cicatrização consiste de inflamação, seguido por formação de tecido de granulação e remodelação tecidual⁸. A fibrose ocorre subsequentemente a formação de tecido de granulação, e é um importante evento

para reduzir o tamanho da lesão. Regeneração epidérmica e dérmica (contração da lesão) podem usualmente fechar a ferida suavemente. Fibroblastos ricos em actina, em tecidos de granulação, conhecidos como miofibroblastos, são os responsáveis pela contração da ferida.^{8,9}

Existem numerosos fatores sistêmicos e locais que podem vir a afetar a cicatrização, interrompendo o processo de inflamação e ocasionando falhas na produção e interligação do colágeno e na neovascularização. Estes fatores podem ser ocasionados por: alterações nutricionais, idade, tabagismo, uso de medicamento, imunodepressão, infecção local, insuficiência renal, insuficiência vasculogênicas, presença de tecido necrosado, escaras, agentes tópicos inadequados.³⁴

O processo de cicatrização é complexo e compreende a resposta dinâmica e imediata do organismo à lesão, com intuito de restaurar a característica anatômica, estrutural e funcional do tecido lesionado. Consiste de três fases sobreponíveis: a inflamatória, a proliferativa e a maturação.

3. 4. 1 - Fase inflamatória ou exudativa

Em condições fisiológicas normais, a fase inflamatória é a mais curta, com duração de quatro a dez dias. Ocorre, inicialmente, a vasoconstrição que busca estancar o sangramento. As plaquetas afluem para a ferida propiciando o controle do sangramento e a limpeza, durando aproximadamente três dias⁴. As plaquetas têm uma função importantíssima que é formar a placa de fibrina, elemento inicial de contenção do sangramento, produzindo substâncias quimiotáxicas, que têm como função atrair outras células para o local, e produzindo, caso da cicatrização, substâncias do grupo dos polipeptídeos formadas nos focos inflamatórios, que atraem leucócitos e fatores estimulantes do crescimento³⁵. Há presença de eritema, calor, edema, dor e perda de função no local. Após a vasoconstrição vem a vasodilatação que ocorre quando se dá a ruptura das terminações nervosas, por uma ação reflexa, determinada pela vasoconstrição e pela liberação no leito da ferida de substâncias vasoativas que vão

gerar essa vasodilatação. Nessa fase, a migração de leucócitos manterá a ação de limpeza e defesa, feitas principalmente através dos neutrófilos com função de fagocitose. Os monócitos também aparecem no leito da ferida para substituir os neutrófilos e gerando os macrófagos. O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase. Permanece do terceiro ao décimo dia. Fagocita bactérias e neutrófilos mortos e direciona o desenvolvimento de tecido de granulação. Formações como fibrina, crosta composta de soro e hemácias impedem que o tecido se resseque, mantendo um ambiente favorável à reparação.⁴

3.4.2 - Fase proliferativa ou de tecido de granulação

Nessa fase acontece o preenchimento da lesão com duração que varia entre 7 e 21 dias. É dividida em três processos: reepitelização, fibroplasia e angiogênese.

Na reepitelização, acontece a divisão ou mitose de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, quando a ferida é de espessura parcial. E apenas das margens, nas de espessura total. Sabe-se que o plano de movimento dos queratinócitos migrantes é determinado também pelo conteúdo de líquido no leito da ferida. Feridas superficiais abertas e ressecadas reepitelizam mais lentamente do que as ocluídas.^{33,36} Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio.³⁷

Subsequentemente acontece a fibroplasia e a formação da matriz extracelular, fatores fundamentais para a formação do tecido de granulação que são uma coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno (Figura 3.2). A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz. Longe de ser apenas produtor de colágeno, ele produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, sendo estas responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico.³⁸

Em seguida ocorre a angiogênese ou formação de vasos sanguíneos, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Inicialmente, as células endoteliais migram para a área ferida, ocorrendo a proliferação das células endoteliais que dão acesso às células responsáveis pelas próximas fases. A mediação dos macrófagos iniciará a produção de fatores de angiogênese que estimularão a migração de células endoteliais da periferia para o leito da ferida, formando os novos vasos. Essa vascularização só acontece em meio úmido.

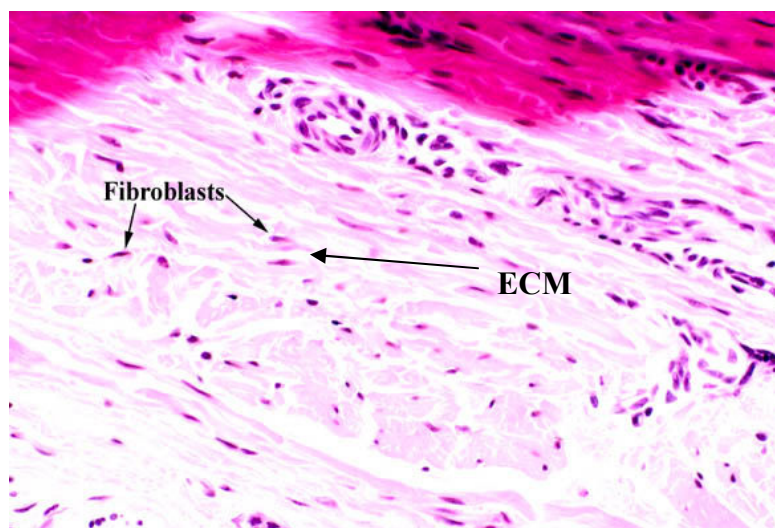


Figura 3.2: Matriz extracelular (ECM) e fibroblastos

3.4.3 - Contração

O miofibroblasto ocasiona tensões que potencializam o encolhimento da ferida. Após a produção de uma falha cutânea, a área assim formada sofre imediata contração, como resultado da retração das margens da lesão, conseqüente à ação centrífuga das fibras elásticas da pele.^{7, 5, 26} Quando, numa ferida plana se inicia o processo de cicatrização, sua área torna-se progressivamente menor, devido ao movimento centrípeto de suas

bordas, sobretudo em resposta à ação de miofibroblastos presentes no tecido de granulação ^{8, 26}. Este fenômeno é denominado de contração da ferida e sua conclusão requer meses, sendo muitas vezes incompleto. ³⁹

3.4.4 - Fase de maturação

O tempo de duração desta etapa varia de seis meses a dois anos e clinicamente se observa uma cicatriz contraída que inicialmente é fina e pálida e que posteriormente se transforma em uma cicatriz madura hipo ou hiper pigmentada. ^{4, 5, 7} Apesar de a cicatriz ter uma aparência mais grossa e mais dura do que a pele, ela nunca tem 100% da resistência mecânica à tração em relação a pele. A Figura 3.3 mostra um esquema da cinética de cicatrização de uma lesão.

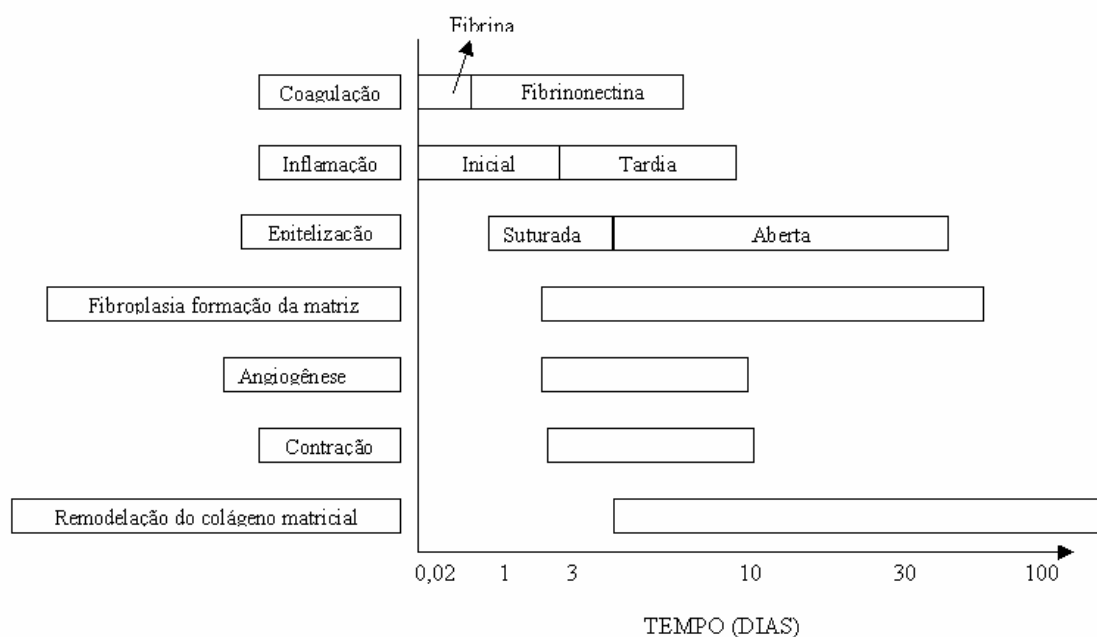


Figura 3.3: Esquema gráfico representando os vários estágios de lesão e o tempo de duração. (Fonte: Cirurgia Cosmética. Princípios e Técnicas. 2000: 19)

3.4.5 Classificação segundo o tipo de cicatrização

A cicatrização pode ser por primeira, segunda ou terceira intenção. ^{4, 5}

Primeira intenção (união primária): as bordas da ferida são opostas ou aproximadas, com perda mínima do tecido, ausência de infecção e pequeno edema. O tecido de granulação não é visível.

Segunda intenção (granulação): esta ferida tem presença de infecção e como a borda da ferida está distante, o reparo é mais demorado e mais complicado. Caracterizada por grande perda de tecido, permanecendo aberta. Suas fases de cicatrização são marcantes, com resposta inflamatória evidenciada. Necessita de maior quantidade de tecido de granulação, com epitelização visível, tendo necessidade de fortalecimento e um grande processo de contração.

Terceira intenção (sutura secundária): ficará aberta enquanto houver infecção real e depois se fechará por aproximação cirúrgica das bordas da ferida. A Figura 3.4 representa os três tipos de cicatrização.

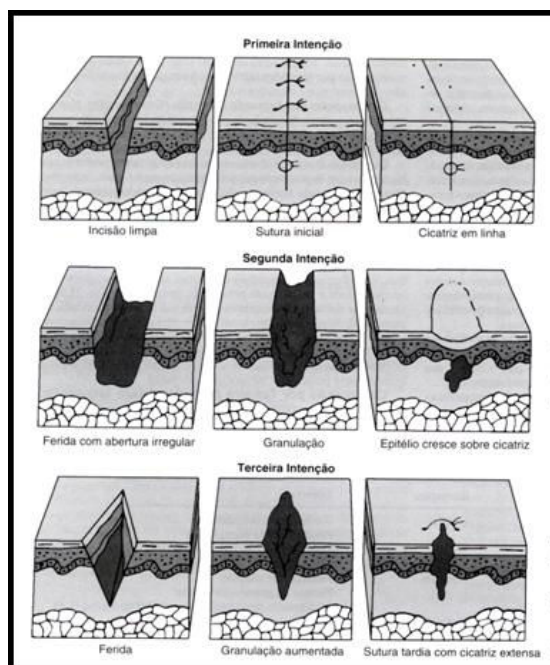


Figura 3.4: Tipos de feridas - Primeira, segunda e terceira intenção.
(Fonte: Mandelbaum et al)⁴

3.5 - Curativos

Curativo é um termo muito amplo e consiste no conjunto de procedimentos que envolvem limpeza, debridamento e aplicação de cobertura à ferida, tendo como objetivo o favorecimento da cicatrização; e de prevenção da colonização de locais de inserção por dispositivos invasivos feitos para diagnósticos, ou terapêuticos.³⁹

Os diferentes materiais utilizados em curativos buscam proteger e promover o alívio da dor, servindo em alguns casos como auxiliares no debridamento. Os materiais mais utilizados são membranas de poliuretano usadas como camada externa devido a sua biocompatibilidade e hemocompatibilidade. São altamente elastoméricos (extensíveis) e permeáveis às substâncias gasosas, criando um ambiente inerte para o sangue, controlando a perda de líquidos e calor através da área ferida e prevenindo a invasão por bactérias. São mecanicamente resistentes e protegem a ferida de efeitos externos.¹⁴

Os hidrogéis são usados como material da subcamada, ficando em contato direto com o leito da ferida, podendo ser microporosos e macios. Como absorvem água mantém a ferida úmida favorecendo o debridamento e alívio da dor. A gelatina preparada do colágeno é uma opção interessante, pois além de tornar-se um hidrogel mais resistente mecanicamente - se a ela acrescentarmos ligações cruzadas - tem a característica de não expressar antigenicidade.⁴⁰ Não se pode desprezar o potencial do colágeno nativo, porém a sua difícil solubilidade e antigenicidade em algumas condições fisiológicas o tornam menos conveniente que a gelatina. Devido a sua alta capacidade de absorção de água, a gelatina pode acumular fluidos e debris de células que são absorvidos e retidos dentro da esponja. O crescimento de tecido ocorreria na matriz esponjosa e o curativo permaneceria na ferida sendo bioabsorvido posteriormente e substituído pelo novo tecido em crescimento.⁴⁰

Excesso de líquido acumulado no curativo tipo hidrogel sem macroporos pode causar a maceração do tecido nas bordas da ferida, por isso, este curativo não tem aplicação em feridas com muito exudato. Uma estrutura altamente porosa ou um hidrogel com alta

capacidade absorção de água evita este tipo de problema, preservando o tecido nas bordas da ferida.⁴⁰

Há diversos tipos de curativos no mercado e cada tipo de ferida deve ser bem avaliado antes de se optar por um deles. Existem alguns pré-requisitos básicos a serem considerados nos curativos, que estão relacionados a seguir.^{3, 4, 5, 26, 34, 40}

- Boa tolerância dérmica;
- Proporcionar conforto físico e psicológico ao paciente;
- Comprimir, sustentar ou imobilizar;
- Remover/absorver a drenagem das secreções;
- Manter a umidade entre a lesão e o curativo;
- Proteger contra as infecções - impermeabilidade às bactérias;
- Ser isento de partículas e de compostos tóxicos contaminadores;
- Permitir troca gasosa;
- Fornecer isolamento térmico;
- Ser permeável aos raios-x e/ou exames;
- Não aderência à lesão - evitando traumas durante a sua retirada.

3.5.1 - Umidade e armazenamento do exudato

A partir de 1962, ocorreu uma verdadeira "revolução no conceito de curativos", quando Winter e Roove⁴ demonstraram que a taxa de epitelização era 50% mais rápida em um ambiente úmido e que a formação de crostas era minimizada, trazendo efeitos extremamente benéficos para o processo cicatricial e reduzindo a dor, devido à proteção das terminações nervosas contra o dessecamento. O interesse gerado ocasionou o desenvolvimento de pesquisas, produção e comercialização desse tipo de recurso.

3.6 - Tipos de curativo

Há diversos tipos de curativos no mercado, alguns são específicos, outros já são utilizados em duas ou mais aplicações. Uma boa descrição é feita por Pereira⁴⁰ em seu trabalho de mestrado, intitulado “Revisão Sistemática da Literatura Sobre Produtos Usados no Tratamento de Feridas”, onde é feita a descrição de quase todos os tipos de curativos existentes, citando aplicações, forma de uso, contra indicações e nomes comerciais.

3.6.1 - Poliuretano

Apresentados na forma de filmes transparentes são bastante versáteis, podendo ser utilizados tanto como coberturas primárias quanto secundárias. Indicados para tratamento de feridas superficiais minimamente exsudativas, sendo também benéficos para áreas doadoras de enxertos cutâneos com baixa exsudação, proteção de feridas cirúrgicas sem complicações, fixação de cateteres, curativos secundários, prevenção de lesões de pele por umidade excessiva ou atrito, como por exemplo, em úlcera por pressão e lacerações.⁴⁰

3.6.2 Hidrocolóide

Cobertura estéril, composta por espuma externa ou filme de poliuretano permeável ao vapor, unida a um material interno, sendo mais comumente o carboximetilcelulose, a gelatina ou a pectina. Em contato com a ferida, o hidrocolóide interage com o exudato formando um gel. O gel evita a aderência à ferida e proporciona alívio da dor, por manter úmidas as terminações nervosas. A inibição do crescimento bacteriano é potencializada pelo microambiente ácido promovido pela oclusão com este polímero.⁴⁰

3.6.3 - Hidrogel

É um gel transparente, formado por redes tridimensionais de polímeros e copolímeros hidrofílicos compostos de água - 78 a 96%, uretanos, poli (vinil pirrolidona) (PVP) e polietileno glicol. Está disponível em forma de placa e gel e requer a utilização de cobertura secundária. Devido à reduzida capacidade de absorção é contra indicado em feridas exsudativas. As trocas devem ser realizadas entre 1 a 3 dias.⁴¹

3.6.4 - Papaína

É constituída de enzimas proteolíticas sendo usada no processo de reparação de tecidos danificados. Seu efeito está relacionado à retirada de tecidos necróticos, desvitalizados e infectados da lesão. Ela é, após o seu preparo, um pó de cor leitosa, com odor forte e característico. Sua molécula é constituída de 17 aminoácidos diferentes com massa molar relativa de 20900g/mol. Na forma de pó, deve ser preparada imediatamente antes da realização do curativo. A papaína não danifica os tecidos, porém deve-se ter precaução com o produto da digestão das enzimas, ou seja, o exudato contendo esta substância pode ser irritativo sobre a pele íntegra, sendo necessárias trocas freqüentes de curativos, para evitar lesões na pele, ao redor da ferida.⁴⁰

3.6.5 - Carvão ativado

Se constitui em cobertura estéril, composta de tecido de carvão ativado impregnado com prata, envolvido externamente por invólucro de não-tecido poroso feito de fibras de náilon, selado em toda sua extensão. É produzido pela carbonização de raíom de viscose. Possui um sistema de poros no tecido capaz de reter bactérias, que são inativadas pela ação da prata. É uma cobertura primária e requer cobertura secundária, sendo feita usualmente com gazes, que devem ser trocadas diariamente ou mais de uma vez ao dia. Tem indicação em feridas infectadas ou não, úlceras vasculogênicas, feridas fúngicas, neoplasias, deiscência cirúrgica, úlceras por pressão e aquelas com drenagem de exudato moderado ou abundante. É contra indicado em feridas secas e recobertas por escaras. Em lesões com pouco exudato, o carvão ativado pode aderir e causar sangramento durante sua remoção, principalmente nas áreas com tecido de granulação.⁴⁰

3.6.6 - Alginatos

Os alginatos são polissacarídeos derivados do ácido algínico, que são obtidos principalmente de algas marinhas da espécie *Laminaria*. São utilizados há algumas décadas devido às suas propriedades hemostáticas. O sódio do exudato e o cálcio do

alginate sofrem troca iônica formando um gel solúvel de alginato de sódio. Esse gel não é aderente à ferida e é indicado para feridas exsudativas. É também utilizado para o tratamento de feridas de espessura total, como deiscência de ferida cirúrgica, úlceras, etc. De fácil aplicação, tem duas apresentações: placa ou fita, porém sua utilização deve ser bem avaliada devido ao seu custo elevado.⁴⁰

Tabela 3. 2 – Custo de curativos disponíveis no mercado (Fonte: Pereira⁴⁰)

Descrição	Produto	Fabricante	Dimensões	Preço/unidade (US\$)
Filme	Opsite®	Smith & Nephew, USA	5 ½" x 4"	1,67
			5 ½" x 10"	4,28
			11" x 6"	5,67
			11" x 11 ¾"	8,37
	Tegaderm®	3M, USA	4" x 4 ¾"	1,71
			4" x 5 ½"	1,76
			4" x 10"	3,55
			6" x 8"	3,85
Bioclusive®	Johnson & Johnson, USA	4" x 5"	1,59	
		5" x 7"	3,09	
		8" x 10"	4,43	
Espuma	Allevyn®	Smith & Nephew, USA	4" x 4"	9,58
			5" x 5"	13,70
			6" x 6"	17,85
Alginato	Kallostat®	Convatec, Inglaterra	3" x 4 ¾"	6,88
			4" x 8"	14,99
			6" x 9 ½"	30,94
Biodegradável	Curativos esteréis	Masune, USA	1" x 36"	6,95
			3" x 36"	7,75
			8" x 36"	11,60
		Medco, USA	1" x 36"	7,30
			3" x 36"	8,15
			8" x 36"	11,80

3.6.7 – Curativos com fatores de crescimento

Com o desenvolvimento da becaplermina, que é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), foi estabelecida a categoria dos curativos bioativos, isto é, curativos ou substâncias que interagem diretamente com as fases da cicatrização promovendo sua aceleração.^{22, 42} São indicados somente em situações especiais devido ao seu alto custo. A utilização da becaplermina é feita, apenas, nos casos em que exista deficiência da

ação dos fatores de crescimento comprovada como, por exemplo, nas úlceras neuropáticas crônicas de pacientes diabéticos.³⁰

3.6.8 - Estrutura tridimensional para proliferação de células

Os curativos temporários podem ser agrupados em duas categorias distintas: aqueles que possuem poros em suas estruturas,⁴³ permitindo assim, a migração celular e aqueles que não permitem o crescimento de células em suas superfícies podendo ser utilizados como recobrimentos (como por exemplo, algumas membranas poliméricas simples).⁴⁴ A porosidade permite a ancoragem das células à estrutura do curativo havendo, portanto, a necessidade de sua retirada por intervenção cirúrgica. Tal procedimento pode ser suprimido, caso seja utilizado, conjuntamente ao curativo, uma estrutura porosa de natureza biodegradável. Neste caso, as células podem se ancorar a essa camada e lá permanecerão até o fim do processo. Neste caso não se retira o curativo, deixando-o no local até que a camada biodegradável seja totalmente absorvida pelo organismo ao longo do processo de cicatrização.^{30, 45} Estes materiais, ao serem bioabsorvidos, ainda apresentam algumas reações inflamatórias e este é um problema ainda a ser resolvido.⁴⁶

3.7 - Polímeros inteligentes

Os polímeros inteligentes ou que respondem a um estímulo – *stimuli responsive polymers* - são cada vez mais utilizados em aplicações de alta tecnologia, devido a sua capacidade de responder a um estímulo externo e apresentar grandes modificações de propriedades tais como hidrofília-hidrofobia, tensão superficial, memória de forma, além de outras.^{47, 48, 49, 50, 51, 52} Os estímulos podem ser físicos tais como: temperatura, ultra-som, campo elétrico, campo magnético, ondas eletromagnéticas ou ao ambiente químico, por exemplo, sensibilidade ao pH ou a presença de íons (sais).

3.7.1 - Poli (n-isopropilacrilamida) (P-N-IPAAm)

O poli (n-isopropilacrilamida) possui o mecanismo de estímulo físico relativo a

temperatura, relacionado com uma transição de fase que pode ocorrer próxima à temperatura do corpo humano, tornando-o potencialmente um material com forte potencial para aplicações médicas.

Em 1978, Tanaka ⁵³ observou precisamente a transição de fase nos polieletrólitos derivados de poliacrilamida, tais como: N-isopropilacrilamida, dietilacrilamida, entre outros. Desde então, ele e seus colaboradores têm demonstrado este comportamento em géis ionizados de poliacrilamida. Também interpretaram as mudanças de volume dos hidrogéis termosensíveis a partir de modelos cinéticos que obedecem à lei de Fick para a difusão, o que deu início a um crescente número de trabalhos envolvendo o poli (N-isopropilacrilamida), cuja unidade estrutural esta representada na Figura 3.5.

Esse é, provavelmente, o mais conhecido polímero que apresenta inversão de solubilidade sob aquecimento, isto é, diminui a solubilidade em água com o aumento da temperatura. Esta característica é observada em polímeros que apresentam LCST (Lower Critical Solution Temperature) que é a temperatura crítica inferior de solubilidade do polímero em um determinado solvente. ^{54, 55} Isto ocorre geralmente em sistemas que apresentam fortes interações secundárias do tipo ligações de hidrogênio entre polímero e solvente à baixas temperatura, permitindo haver uma boa miscibilidade entre eles, para temperaturas mais altas o sistema se torna instável devido as forças de hidrogênio entre polímero-solvente se aniquilarem, separando as fases (colapso). Essa temperatura pode ser observada visualmente, através da turvação de uma solução do sistema solvente-polímero ao ultrapassar a temperatura de 32°C. Este método é conhecido como ponto de turvação. ^{54, 55}

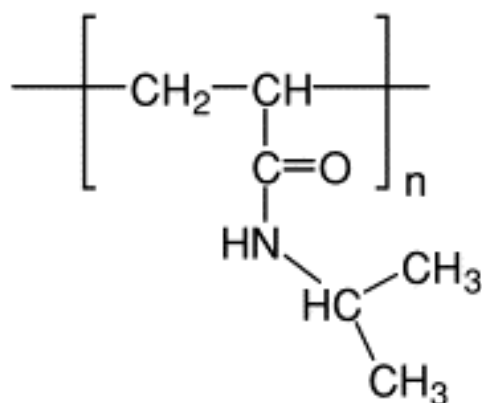


Figura 3.5: Fórmula química estrutural para o poli(n-isopropilacrilamida)

Acima da LCST prevalecem as interações hidrofóbicas, resultando na precipitação do polímero na água. As mudanças estruturais do material devido a presença da água gera uma expansão das moléculas e a saída de água gera um colapso das moléculas resultando a contração volumétrica, denominada transição globular para enovelada, conforme mostra a Figura 3.6.^{53,54,55}

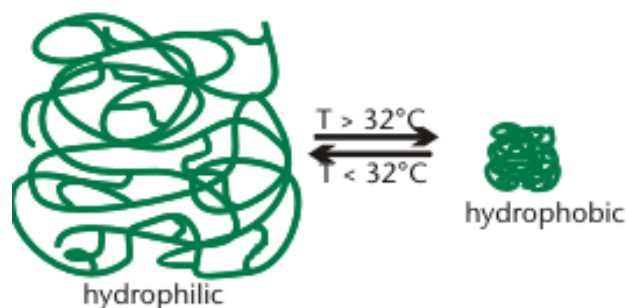


Figura 3.6: Transição globular para enovelada.
(fonte: Han et al³²)

Nas diversas aplicações para o poli (n-isopropilacrilamida) é comum este estar misturado com alguns aditivos, que por sua vez, podem vir a perturbar a LCST do polímero⁵⁴ se tiverem a capacidade de interagir com a água ou com o polímero. Este comportamento, entretanto, torna-o ainda mais interessante, pois potencializa diversas aplicações, dentre as quais se destacam, na liberação controlada de fármacos e na utilização em processos de separação industrial, entre outras.

A facilidade que a LCST dos géis de poli (n-isopropilacrilamida) tem de ser ajustada para próximo da temperatura do corpo humano, através de copolimerizações e do uso de aditivos, torna este polímero um material extremamente útil em aplicações biomédicas, principalmente na liberação controlada de medicamentos. O processo consiste, basicamente, na incubação do gel em solução contendo as biomoléculas à temperatura abaixo da LCST e posteriormente as moléculas podem ser expelidas ao se colocar o gel em soluções (ou corpo humano) a uma temperatura acima da LCST.⁵⁷

Outra aplicação muito importante e com inúmeras patentes é o processo de separação de moléculas. É realizado por seletividade de tamanho e ocorre quando o gel é colocado em uma solução aquosa contendo vários solutos. A água presente na solução penetra e causa o inchamento do gel, os solutos grandes tais como macromoléculas, que estão na solução, não conseguem adentrar na rede porosa do gel por impedimento estérico, enquanto que os solutos pequenos transitam e penetram livremente nela. Após a remoção do gel, a solução é deixada mais concentrada de macromoléculas. O gel é removido e colocado em outra solução aquosa a uma temperatura acima da LCST, causando a liberação da água de sua estrutura. Juntamente com ela, as moléculas de pequena massa molar também são lixiviadas, possibilitando a reciclagem do gel para utilização posterior.⁵⁷

3.7.2 Polimerização do n-isopropilacrilamida

O processo de polimerização de P-N-IPAAm linear pode ser realizado adicionando monômero de N-IPAAm em 40 ml de metanol, na presença de iniciador α' -azobis-isobutironitrila (AIBN) e aquecendo até 60°C.⁵⁸ A reação é mantida com nitrogênio seco por duas horas. A massa molar do polímero pode ser controlada pela relação monômero/iniciador (M/I), como listado na Tabela 3.2. Em seguida, adiciona-se uma solução 8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por gotejamento na solução de poli(n-isopropilacrilamida). O polímero precipitado é lavado em água destilada à quente (80°C) e, em seguida, é seco sob vácuo. A massa molar média pode ser estimada por viscosidade intrínseca (equação

de Mark-Houwink). Este método usualmente não fornece a curva de distribuição de massa molar.

Tabela 3.1. Exemplo de Formulação para polimerização.

Relação M/I (monômero/Iniciador) e massa molar resultante do processo de polimerização (Fonte: Stevin et al ⁴⁵)

P-N-IPAAm (g)	AIBN (g)	M / I (relação molar)	Massa Molar média
4,52	0,164	40	222.000
4,52	0,0657	100	223.000
4,52	0,0329	200	289.000

O controle da distribuição de massa molar é um dos aspectos mais importantes na caracterização de um polímero e geralmente é expresso através de médias. As duas mais importantes são: massa molar numérica média (M_N) e massa molar ponderal média (M_W) e a sua relação indica o índice de polidispersividade (PDI), dada pela equação 1.

$$PDI = M_N / M_W \quad (1)$$

Ganachaud et al ⁵⁹ relata que têm encontrado dificuldades na medida da distribuição de massa molar do P-N-IPAAm usando técnicas de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) e apresentam um trabalho aonde comparam várias técnicas de medida, tais como espalhamento de luz, titulação de grupos terminais com SEC. Eles demonstraram que há discrepâncias em valores acima de 10^4 g/mol de massa molar e sugeriram alguns procedimentos de preparação e de manipulação da amostra para diminuir estas discrepâncias. Convertine et al ⁶⁰ por outro lado, contornaram este problema utilizando polimerização viva, que é um tipo de reação que mantém a polimerização muito bem controlada, previsível e com PDI próximo a 1. Dentre as diversas maneiras de polimerização viva, ultimamente tem-se destacado a polimerização RAFT (Reservible Addition Fragmentation Chain Transfer) ou polimerização ⁶⁰ por transferência, fragmentação e adição reversíveis. O processo envolve a adição de monômeros, um

bom solvente para o polímero e o monômero, um iniciador azo ou peróxido e o agente de transferência reversível⁶¹ como mostra a Figura 3.7.

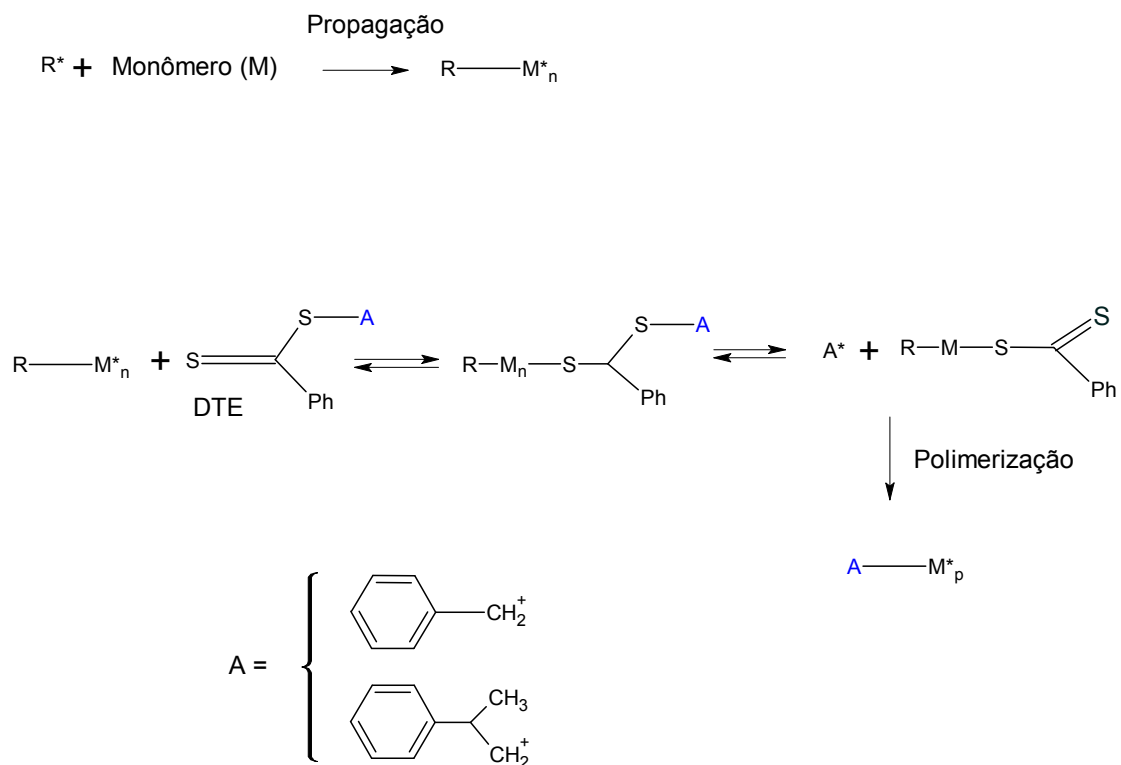


Figura 3.7: Esquema representando a reação RAFT⁴³

O agente de transferência (ditioéster, DTE) reage com o radical do iniciador (R^\bullet) ou o radical de propagação ($R-M_n^\bullet$) para dar origem a outro agente de transferência A^\bullet , que reinicia a polimerização. O comportamento vivo envolve uma reversível seqüência de adição fragmentação entre a espécie ativa e a espécie dormente o $S=C(\text{Ph})S$.

Convertine et al⁶⁰ utilizaram a polimerização RAFT para a produção do poli(*N*-isopropilacrilamida), realizada em um solvente, o *N,N*-dimetilformamida (DMF), empregando um azo iniciador convencional - 2,2-azo bis (4-metoxi-2,4-dimetilvaleronitrila) - como fonte de radicais primários e um agente de transferência de cadeia disponível comercialmente (tri-tiocarbonatado), o 2-dodecil sulfanil tiocarbono sulfato ácido 1-2-metil propionico (DMP), como mostrado na Figura 3.8. Todas as

polimerizações foram conduzidas a 25 °C sob atmosfera de nitrogênio e 33 % em massa de monômero. Elas apresentaram excelente controle sobre o tamanho e estrutura das cadeias poliméricas, sem revelar sinais de reações indesejáveis ao agente de transferência de cadeia que pudesse gerar ramificações ao final da reação. Os autores também fizeram várias comparações metodológicas na medida de distribuição de massa molar e concluíram que, com esta técnica, as medidas podem ser realizadas com GPC, mesmo acima de 10⁴g/mol.

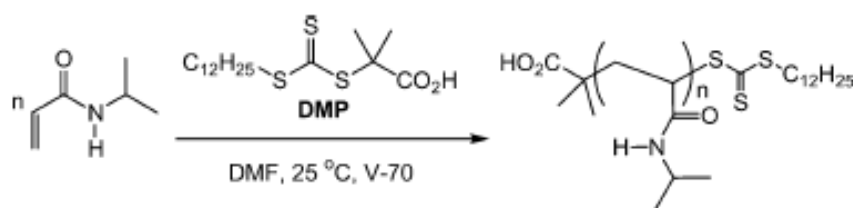


Figura 3.8: Esquema representativo de polimerização RAFT de P-N-IPAAm⁶⁰

Este tipo de polimerização pode ser utilizado em processos de enxertia de moléculas na superfície de polímeros. É uma técnica chamada *grafting from*, que será vista posteriormente.

3.7.3 - Ligações cruzadas

Os hidrogéis são materiais poliméricos que possuem a propriedade de aumentar várias vezes o seu volume inicial através da absorção de água sem, no entanto, perder a sua forma. As aplicações deste tipo de material dependerão do grau de inchamento e de suas propriedades mecânicas. Um hidrogel necessita formar uma rede tridimensional na sua estrutura para ser estabilizado, para isto necessita de um agente reticulante. Esse agente pode ser químico (através de ligações cruzadas covalentes), ou pode ser físico (através de cargas complexas - ligações de hidrogênio, van der Waals, etc.).⁶² As ligações cruzadas são as mais interessantes e geralmente melhoram as propriedades mecânicas dos hidrogéis. A gelatina é um hidrogel estabilizado por agentes físicos e geralmente suas propriedades mecânicas são pobres. Estas propriedades podem ser melhoradas acrescentando-se um agente reticulante químico, como o glutaraldeído, por exemplo.

No caso do P-N-IPAM, as ligações cruzadas são preparadas em solução aquosa com persulfato de potássio (iniciador) e monômero de N-I-PAAm e *N,N'*-metileno-bisacrilamide (MBAAm, como agente reticulante mantido a 70°C por 4h). As ligações cruzadas geralmente permitem ao polímero absorver água impedindo a sua completa dissolução. O polímero apenas sofre um inchamento ao absorver a água. Aumentando-se a densidade de ligações cruzadas, melhoram-se as propriedades mecânicas do hidrogel, mas limita-se a absorção de água.

3.7.4 – Influência da arquitetura dos polímeros inteligentes na LCST

Há várias maneiras de estruturação do polímero e dos copolímeros que podem influenciar a temperatura de transição (LCST) bem como a cinética de absorção de água. A copolimerização com outro monômero que possui diferente hidrofobia pode controlar a LCST do P-N-IPAAm.^{57, 58} A Figura 3.17 apresenta o efeito de dois comonômeros de diferentes naturezas, na LCST do P-N-IPAM em relação à composição do copolímero. O monômero acrilamida (AAm) tem natureza hidrofílica, enquanto o butil acrilamida N-tBAAm possui uma natureza hidrofóbica.

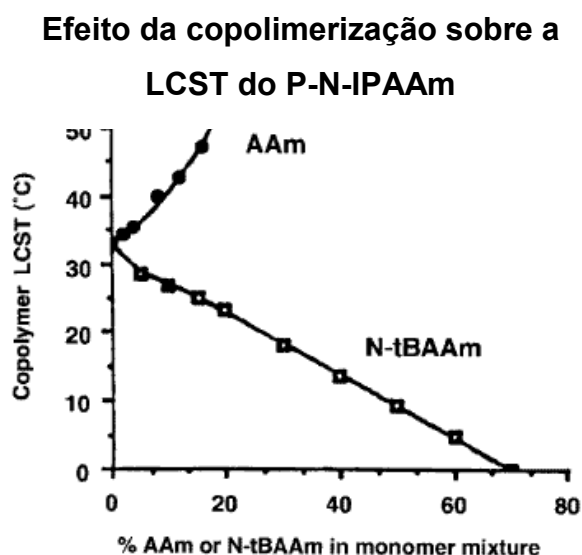
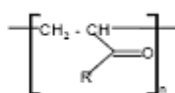

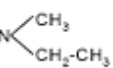
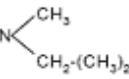
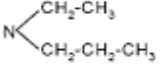




Figura 3.17: Efeito do tipo de comonômero na LCST do PNIPAM
 Monômero Acrilamida (AAm) de natureza hidrofílica
 Monômero N-tBAAm de natureza hidrofóbica⁵⁸

Os valores de LCST são influenciados pelos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, assim como o posicionamento desses grupos ao longo da cadeia. O tipo de copolimerização também pode proporcionar uma arquitetura em nível molecular bastante distinta entre si e, portanto, podendo gerar diferentes resultados em termos de LCST. Os resultados apresentados na Figura 3.17 foram obtidos para copolímeros randômicos, já os copolímeros grafitizados com os mesmos tipos de co-mônômeros não apresentam variação de LCST⁵⁸ com a variação de composição do copolímero.

Tabela 3.2 – LCST de polímeros a base de acrilamida⁶³



R	Poly (N-alkylacrylamide)	LCST (°C)
NH ₂	Poly(acrylamide)	no LCST, soluble in water
NH-CH ₃	Poly(N-methylacrylamide)	no LCST, soluble in water
NH-CH ₂ -CH ₃	Poly(N-ethylacrylamide)	82
NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Poly(N-n-propylacrylamide)	22
NH-CH-(CH ₃) ₂	Poly(N-isopropylacrylamide)	32-34
NH- 	Poly(N-cyclopropylacrylamide)	47
NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Poly(N-n-butylacrylamide)	no LCST, insoluble in water
N-C(CH ₃) ₃	Poly(N-t-butylacrylamide)	no LCST, insoluble in water
N-(CH ₃) ₂	Poly(N,N-dimethylacrylamide)	no LCST, soluble in water
N- 	Poly(N-ethyl, N-methylacrylamide)	56
N-(CH ₂ -CH ₃) ₂	Poly(N,N-diethylacrylamide)	32-42*
N- 	Poly(N-isopropyl, N-methylacrylamide)	25
N- 	Poly(N-ethyl, N-propylacrylamide)	no LCST, insoluble in water
N-(CH ₂ -CH ₂ -CH ₃) ₂	Poly(N,N-dipropylacrylamide)	no LCST, insoluble in water
	Poly(N-acryloylpyrrolidine)	55
	Poly(N-acryloylpiperidine)	4

3.7.5 Influência da arquitetura do hidrogel na velocidade de absorção e perda de água

Algumas aplicações para polímeros inteligentes dependem de uma resposta rápida, como, por exemplo, o uso como músculos artificiais. A velocidade de absorção de água também é modulada pela arquitetura do material. Os mecanismos de transporte da água dependerão da estruturação molecular. O empacotamento do hidrogel pode ser modulado controlando-se a topologia do polímero de P-N-IPAAm simplesmente grafitizando-o com oligômeros do próprio polímero na rede do hidrogel (N-IPAAm) (Figura 3 18) o que proporciona uma desidratação muito rápida com a mudança de temperatura.⁵⁸

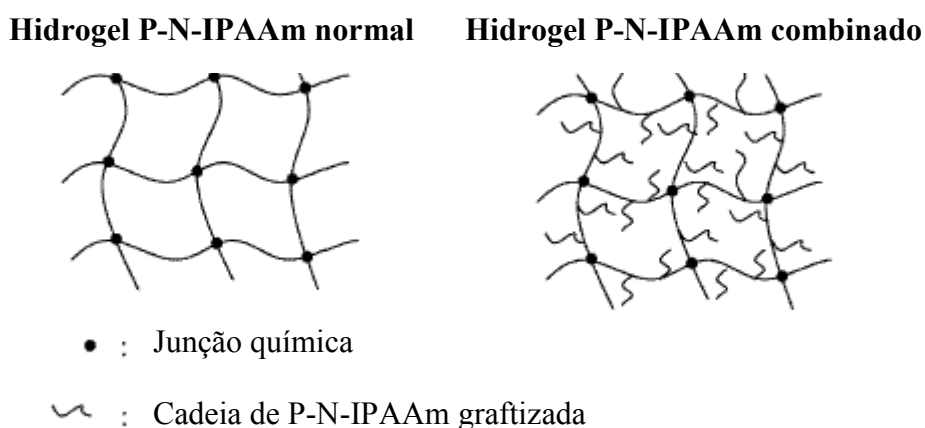


Figura 3.18: Esquema representativo do hidrogel de PNIPAM Tipo normal e tipo combinado (com grafitização de oligômeros de PNIPAM) (Fonte: Gil et al⁵⁸)

Liu et al⁵⁸ relatam que obtiveram uma resposta rápida na absorção de água pelo hidrogel simplesmente mudando o método de realização da polimerização. Este resultado foi obtido quando foram comparados hidrogéis polimerizados pelo sistema convencional de polimerização radicalar com outros produzidos via polimerização RAFT. A diferença foi devido à formação de uma arquitetura hiper ramificada do hidrogel polimerizado pelo sistema RAFT permitindo a formação de espaços intermoleculares por onde possibilitava e facilitava a saída ou entrada de água. O esquema da estrutura dos dois

sistemas pode ser visto na Figura 3.19 e na figura 3.20 mostra a diferença entre o sistema polimerizado via raft e o convencional.

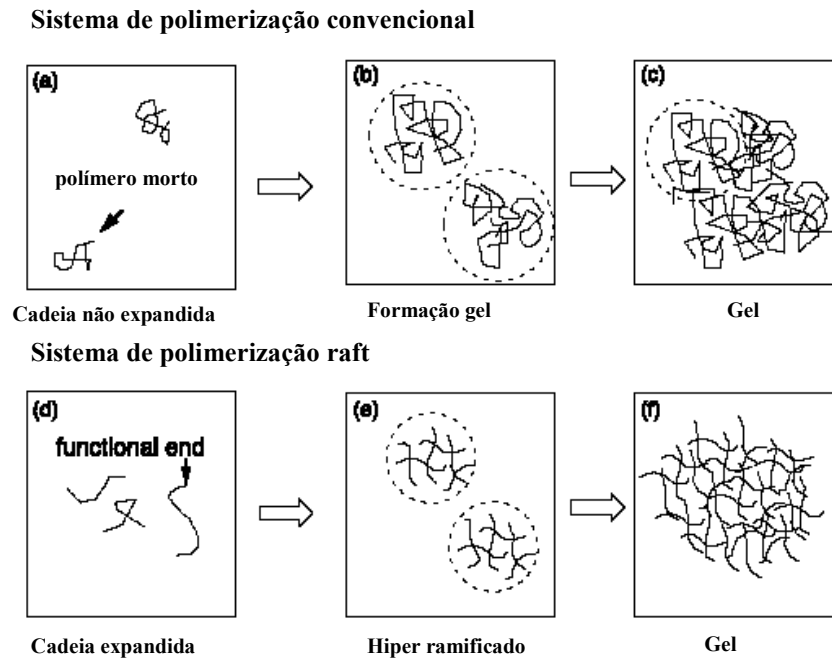


Figura 3.19: Esquema representativo da progressão da formação do gel. Diferentes estruturas dos géis (a)–(c) sistema convencional de polimerização. Polimerização RAFT d)–(f)⁶⁴

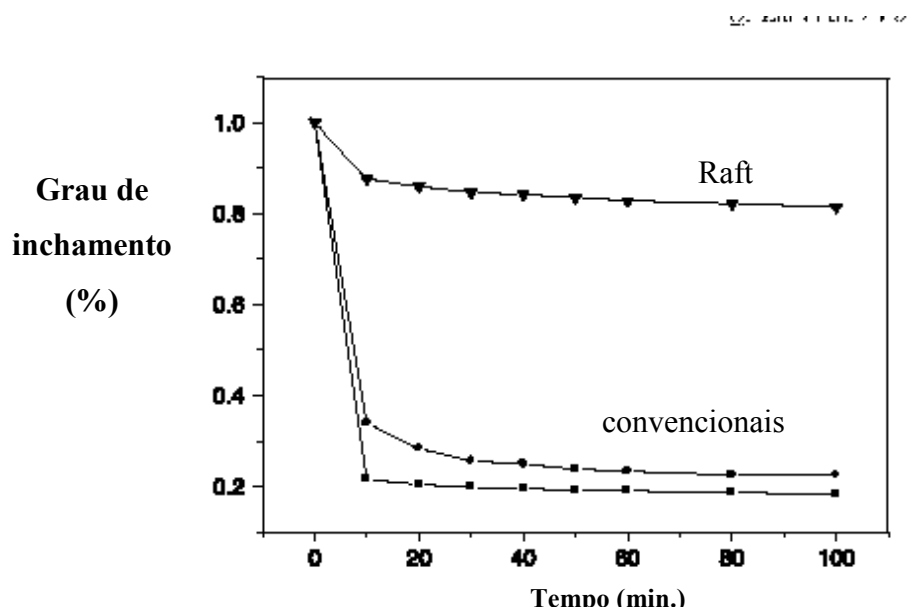


Figura 3.20: Gráfico representando Grau de inchamento x Tempo⁶⁴

Zhang et al ⁶¹, relatam um trabalho no qual utilizaram água e acetona no sistema de polimerização e formação de ligações cruzadas. Este procedimento permitiu que a estrutura do hidrogel se expandisse pela ação do solvente, durante a sua estruturação e permitisse caminhos livres para a saída rápida da água. Na Figura 3.21 pode ser vista a perda de água em relação ao tempo com os sistemas em que se variava a quantidade de acetona. Nota-se que o tempo de perda de água diminuía com o aumento da quantidade de acetona na preparação do hidrogel.

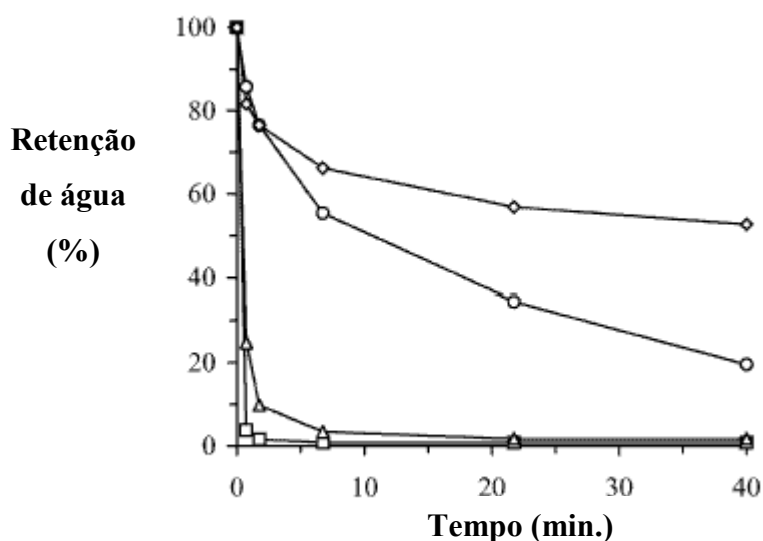


Figura 3.21: Gráfico representando Retenção de água em relação ao tempo Variando a composição acetona – água: ○ (20% , 80%) ; ◇ (40%, 60%) ; △ (60%, 40%); □ (80%,20%).⁶⁴

3.7.6 Influência de sais na LCST

Os sais exercem forte influência na LCST na seguinte ordem $KI < KCl < KOH$ que esta de acordo com a série de Hoffmeister. Os sais interagem com as moléculas de água por hidratação diminuindo a entropia do sistema. Para manter o equilíbrio, a entropia do sistema pode ser aumentada assim que as moléculas de água são liberadas fora da molécula hidrofóbica. A Figura 3.22 apresenta o comportamento LCST com a concentração do sal.⁶⁵

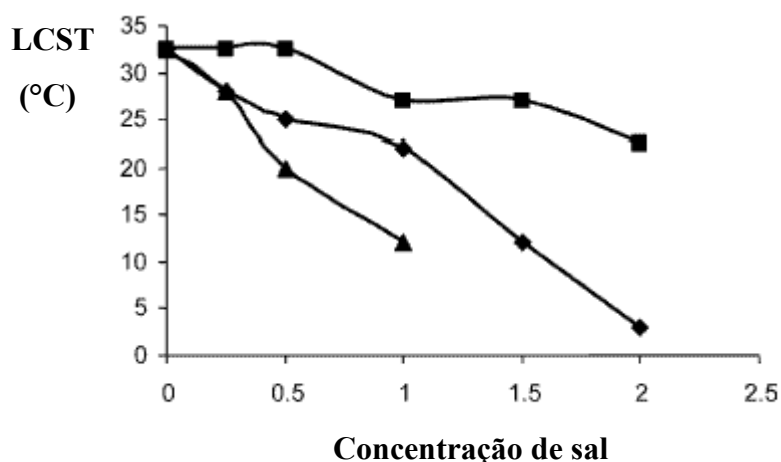


Figura 3.22: Gráfico: LCST x Concentração de sais no PNIPAM. (□ KI, ◇ KCl, △ KOH). (Fonte: Panayiotou et al ⁶⁵)

3.8 – Graftização ou enxertia

A modificação de uma superfície sólida de outro polímero ou mesmo de um material inorgânico, através da inserção de um polímero é denominado *polymers brushes* (Figura 3.10). Esta técnica consiste em aderir quimicamente uma monocamada de polímero sobre a superfície desejada. ^{66, 67, 68, 69} Primeiramente, há uma preparação da superfície, que consiste em criar uma interface para futuras ligações químicas, com o material polimérico, que pode ser um oligômero, ou uma rede de hidrogel (com ligações cruzadas, ou não). As possibilidades arquitetônicas ^{70, 71, 72} deste tipo de interface são inúmeras, podendo variar o comprimento de cadeia polimérica, ou variar a densidade de ligações à superfície, ou copolimerizar um bloco no polímero graftizado, ou colocar diferentes polímeros graftizados lado a lado na superfície modificada. ⁷³

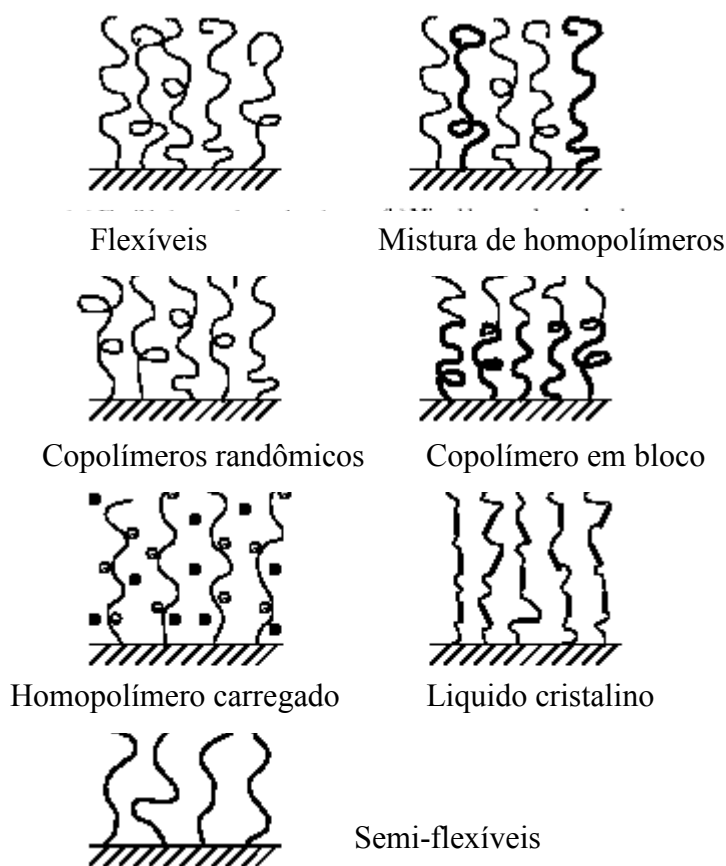


Figura 3.10: Esquema representando alguns tipos de *polymers brushes* ³⁶

Há dois tipos de graftização (enxertia) em superfície de materiais poliméricos que são predominantes: *grafting to* e *grafting from*. *Grafting to* é uma técnica em que o polímero a ser enxertado é previamente fabricado por polimerização, por exemplo, RAFT (pré-polímero) e depois enxertado na superfície a ser modificada. É condição necessária que a superfície deve ser preparada de modo a possuir grupos reativos com o pré polímero, a vantagem deste processo é que pode se controlar e medir o tamanho dos enxertos, com extrema facilidade.⁷³

A *graftização from* é uma técnica realizada através de polimerização radicalar utilizando-se iniciadores que coordenam a formação de radicais na superfície do polímero a ser graftizado. Tais radicais promovem a incorporação do monômero que reage propagando-se a partir da superfície. Há reações de homo polimerização em paralelo que competem com a graftização. A figura 3.11 representa este dois modelos.

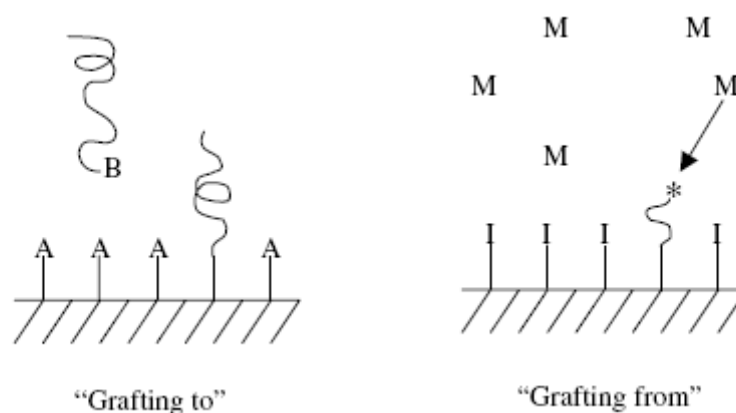


Figura 3.11: Esquema representativo de graftização: grafting to e grafting from ³⁶

3.9 - Graftização e adesão de proteínas.

Alguns trabalhos sobre adesão de proteínas indicam que há uma influência grande da morfologia das cadeias de superfícies graftizadas com PEO (polietileno glicol) e também com P-N-IPAAm. Assim, a densidade de cadeias, comprimento das cadeias e a extensão do estiramento das cadeias da camada graftizada afetam as interações com as moléculas de proteínas.^{74,75,76,77,78, 79,80, 81}

A figura 3.12 mostra um esquema representativo dos tipos de conformação relacionado a densidade de moléculas enxertadas sobre a superfície do polímero e o comportamento frente a uma transição LCST. No esquema A e B tem-se uma baixa densidade de moléculas, chamada conformação em cogumelos (*mushroom conformation*). No esquema C e D tem-se uma alta densidade de moléculas e conformação tipo escova (*brush conformation*). A e C estão no estado hidratado (abaixo de LCST) e B e D estão no estado colapsado (acima da LCST).

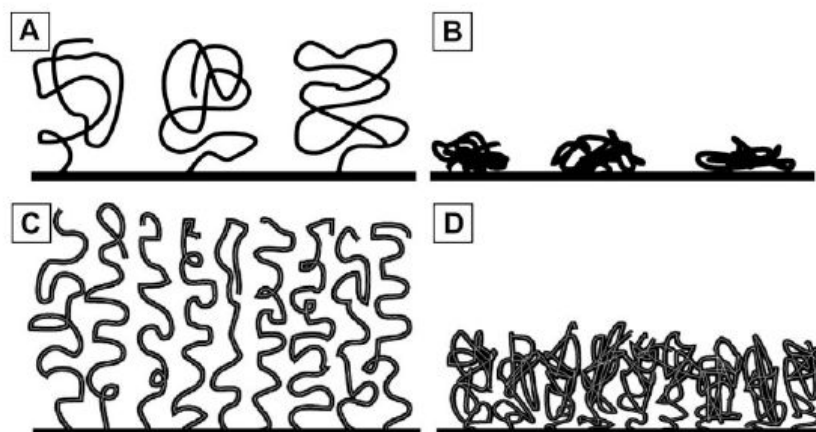


Figura 3.12: Esquema representando alguns tipos de *polymers brushes* ⁸²

A conformação em cogumelo ocorre quando a separação das moléculas é maior que o raio de giração das cadeias poliméricas. Quando o raio de giração é inferior tem-se a conformação em escova. A conformação em cogumelo pode levar a exposição do substrato, particularmente no estado colapsado. ^{82, 83}

A modificação de superfícies de materiais poliméricos para uso em cateteres, através da graftização de poliacrilamida que possui propriedades antitrombogênicas ^{84, 85, 86, 87, 88} é bastante estudada e utilizada.

3.10 - Culturas de células e adesão celular

A primeira condição para adesão de uma célula a uma determinada superfície é a adesão de proteínas, ^{89, 90, 91, 92, 93} e apesar de algumas proteínas poderem se fixar na superfície hidrofílica do P-N-IPAAm (abaixo da LCST), as células não se fixam devido às propriedades mecânicas do hidrogel serem inadequadas (macia demais). ⁹⁴

A modelagem da adsorção de proteínas pode ser feita pelas medidas das forças de interação entre as pontas (sonda) do Microscópio de Força Atômica (AFM) com proteínas e P-N-IPAAm em solução tampão. Entretanto diferenças na preparação do recobrimento e as condições de uso na CP-AFM tem mostrado diferenças significativas nos resultados. ^{95, 96, 97}

Estudos para avaliação de forças interfaciais envolvidas entre proteínas e recobrimentos de P-N-IPAAm são feitos através de microscopia de força atômica (AFM) utilizando-se sondas do microscópio (*probe*) revestidas com colóide (CP-AFM) e tem fornecido informações das interações entre as proteínas da superfície e da sonda do microscópio e a superfície de P-N-IPAAm acima e abaixo da LCST.^{94, 96, 97, 98}

Alguns trabalhos tem utilizado esta técnica de avaliação^{95, 99, 100, 101, 102,} de superfície . Em geral é notado que há forças atrativas significantes entre a ponta hidrofóbica e a superfície do P-N-IPAAm a temperaturas acima da LCST, enquanto abaixo da LCST, as forças interativas são desprezíveis.⁹⁴

A massa molar das proteínas tem um papel importante na adsorção: os recobrimentos de baixa densidade de graftização podem permitir a aproximação de proteínas de massa molar pequena. Como a adsorção de proteínas é usualmente irreversível sobre substrato não hidratado, é de se esperar que o recobrimento incompleto do substrato, quando o estado colapsado é atingido, deve promover uma reversão incompleta das interações entre proteína e recobrimento.^{96, 97, 102, 103}

A quantidade de proteína que é irreversivelmente adsorvida não é somente determinada pelas interações químicas e da microestrutura do recobrimento, mas também pelo tipo de proteína, tempo de residência da proteína sobre a superfície e a desnaturação da proteína.^{98, 104}

Recentemente, Shimizu et al⁴⁶ realizaram importantes trabalhos a respeito de adesão de células para uso em dispositivos de proliferação e crescimento de células. A idéia do grupo, a princípio, era construir, através de uma nova concepção, um tecido tridimensional. Primeiramente, construíram-se camadas bidimensionais de células e posteriormente estas foram montadas, camada por camada, até se obter um tecido espesso e funcional. Porém, para isso tornar-se possível, era necessário fazer a retirada da camada de célula que estava sobre a placa de cultura, sem rompimento da estrutura

bidimensional, já construída. Para solucionar este problema Shimizu⁴⁶ teve a idéia de revestir placas de poliestireno com uma fina camada de poli (n-isopropilacrilamida) (técnica de feixe de elétrons) e sobre esta placa fez crescer uma camada de células a 37°C. Nesta condição, o polímero se mostra hidrofóbico e propicio à adesão e crescimento celulares. Quando se diminui a temperatura para menos de 32°C, o polímero torna-se hidrofílico, liberando a camada de células que pode ser retirada sem causar nenhum dano às células (Figuras 3.13 e 3.14).

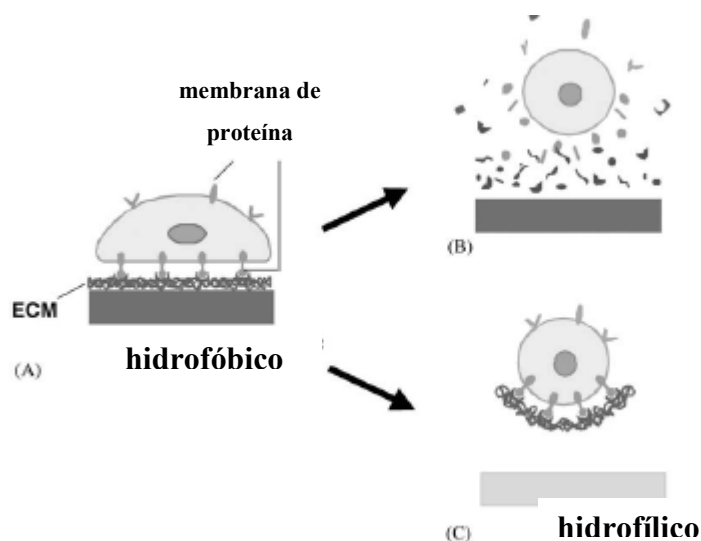


Figura 3.13: Mecanismo de adesão da célula.

A – Superfície hidrofóbica

B - Destacamento com agentes químicos

C – Destacamento com mudança da superfície⁵⁶

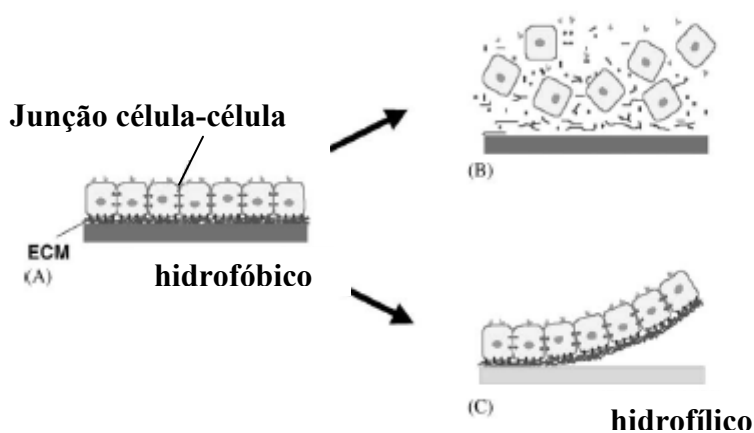


Figura 3.14: Esquema representando dispositivo on-off, para camadas de células.²⁸

Nitschke et al.⁶² fizeram estudos sobre adesão e destaque de células sobre superfícies de copolímero P(NIPAMM co-DEGMA), onde os grupos de dietileno glicol proporcionaram melhoria no destaque das células. A figura 3.15 mostra uma eletro micrografia de proliferação de células sobre uma superfície com resposta ao destacamento de células via estímulo externo.

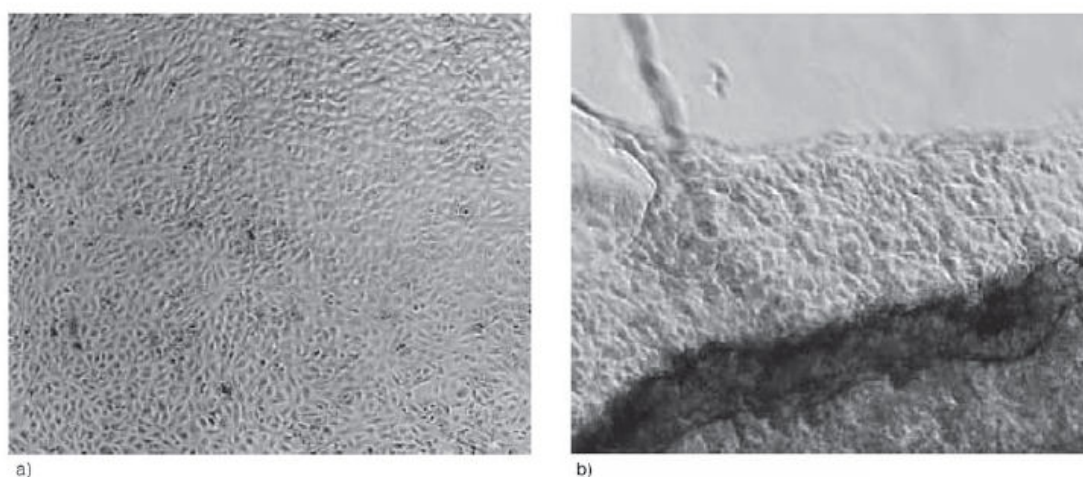


Figura 3.15: Eletro micrografia do cultivo e células sobre superfície com poli (N-IPAAm co DEGMA) à temperatura de 37°C (a) e destacamento após decréscimo de temperatura (b).²⁹

Os mecanismos de destacamento celulares da superfície de um polímero termicamente sensível não são simples e representam mudanças no metabolismo celular. As células entram em contato com uma superfície (adesão passiva) e a partir daí estão dinamicamente alterando as suas membranas e sua morfologia para otimizar as interações e estabilizar a interface célula-material (adesão ativa) (Figura 3.16).¹⁶

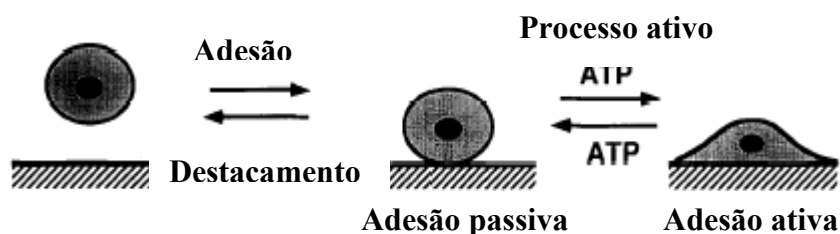


Figura 3.16: Esquema representando tipos de adesão de células sobre substrato.¹⁶

A mudança da natureza da adesão nas células envolve mudanças na interface célula-material e isto demanda um consumo de energia ¹⁶ que advém, obviamente, do metabolismo celular. O P-N-IPAAm começa a se hidratar a 32°C, neste momento as células começam a se modificar e quanto menor a temperatura mais o P-N-IPAAm se hidrata, o que facilita o destacamento das células de sua superfície. Entretanto, o metabolismo da célula também se reduz o que demanda um maior tempo para o destacamento. Foi observado que a temperatura específica para se destacar as células integralmente (sem danos), de uma superfície termosensível¹⁶ varia de acordo com o tipo de células, pois cada tipo apresenta uma temperatura sensitiva diferente e metabolismos celulares diversos. Okano et al ¹⁶ relataram diferenças significativas de temperatura sensitiva entre as células hepatocíticas (10°C) e endoteliais (20°C) e apontaram que esta tecnologia é importante não só no destacamento integral de células em culturas, mas também para purificação, ordenação e separação de células.

Harriz et al ⁶³ demonstraram que o comportamento mecânico (flexibilidade e rigidez) do material é muito importante na adesão e espalhamento das células. Pelham e Wang ¹⁰⁵ reportaram um trabalho minucioso no qual exploraram a topografia superficial dos hidrogéis, utilizando-se de indentação por microscopia de força atômica, e concluíram que a adesão e espalhamento das células sobre uma variedade de géis, a base de acrilamidas, são regulados pela flexibilidade dos substratos. Vários estudos indicam que a transdução mecânica entre células e matriz extracelular é um fator importante no comportamento celular tais como: adesão, migração, proliferação, diferenciação, re-diferenciação, metástase e apoptose. ^{18, 73}

3.11 - Técnicas preparatórias de superfícies poliméricas para graftização

A característica de uma superfície pode ser representada pela medida de sua tensão superficial, que por sua vez pode ser medida pelo ângulo de contato entre a superfície a ser caracterizada e um líquido de tensão superficial conhecida. ⁹⁴ O ângulo de contato pode ser relacionado com três forças superficiais que mantém a gota de um líquido em equilíbrio com uma superfície sólida (figura 3.23), dada por:

$$\gamma_{LV} \cos\theta + \gamma_{SL} = \gamma_{SV} \quad (3.1)$$

onde

γ_{LV} - energia interfacial entre líquido e vapor (mN/m).

γ_{SL} - energia interfacial entre sólido e líquido (mN/m).

γ_{SV} - energia interfacial entre sólido e vapor (mN/m).

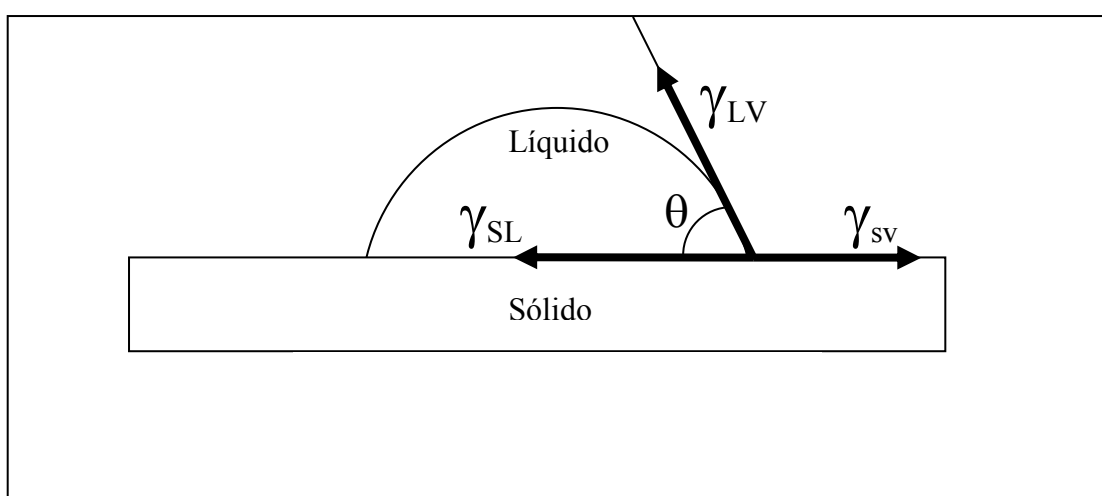


Figura 3.23: Esquema representando ângulo de contato entre líquido e sólido.

O ângulo θ igual a 0° significa que o líquido molha completamente a superfície, ou seja, líquido e sólido possuem a mesma tensão superficial. Por outro lado, ângulos que se aproximam de 180° , indicam que o líquido tem baixa molhabilidade sobre a superfície sólida, ou seja, tensão superficial do líquido é muito diferente que a da superfície sólida.

A tensão superficial dos polímeros varia com a composição química de suas moléculas. Assim, polímeros que possuem flúor em sua composição têm valores de tensão superficiais bem baixos e vão aumentando conforme se muda a composição tal como mostra o esquema representativo na tabela 3.3. Nota-se que a medida que se acrescenta grupos de hidrogênio, cloro, oxigênio e nitrogênio, os valores de tensão superficial vão aumentando.

Tabela 3.3 Tipos de polímeros com sua representação química e o valor da tensão superficial.

Polímero	Fórmula	Tensão Superficial (γ) (Mn/m)
Teflon (PTFE)	$\text{-(CF}_2\text{-CF}_2\text{)}_n\text{-}$	16,2
Polifluoreto de Vinilideno (PVDF)	$\text{-(CH}_2\text{-C(F)}_2\text{)}_n\text{-}$	25
Poliétileno (PE)	$\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-}$	31
Poliestireno (PS)	$\text{-(CH}_2\text{-CH(C}_6\text{H}_5\text{))}_n\text{-}$	33
Álcool polivinílico (PVA)	$\text{-(CH}_2\text{-CH(OH))}_n\text{-}$	37
Policloreto de vinila (PVC)	$\text{-(CH}_2\text{-CHCl)}_n\text{-}$	40
Poliétileno tereftalato (PET)	$\text{-(C(=O)-C}_6\text{H}_4\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n\text{-}$	43

A superfície do polímero é a região de fronteira entre a massa polimérica e o ambiente externo. Muitos polímeros apresentam hidrofobia e inércia química que são indesejáveis em certas aplicações. A possibilidade de modificação da superfície torna-se uma estratégia muito interessante para se obter atividades específicas de uso sem comprometer as propriedades mecânicas do material. ^{73, 95, 96, 106, 107, 108, 109}

Diversas técnicas são utilizadas para realizar o acoplamento de macromoléculas a superfície de polímeros e tipicamente envolvem a criação de sítios reativos (radicais) e formação de hidroperóxidos na superfície com posterior reação com as moléculas a serem enxertadas covalentemente. Essas moléculas podem ser um pré polímero que se liga aos sítios reativos ou pode ocorrer a partir de monômeros que iniciam a polimerização se ligando aos sítios da superfície do polímero. Dentre as técnicas existentes, se destacam: tratamento químico,¹¹⁰ tratamento corona,^{111, 112, 113, 114} plasma a baixa temperatura,^{115, 116, 117, 118, 119, 120, 121} radiação ultravioleta,^{121, 122, 123} radiação gama,¹²⁴ feixes de partículas (elétrons, íons), etc. Na prática podemos considerar que ainda há limitações para todas essas técnicas, por exemplo: a radiação UV pode diminuir a resistência mecânica dos filmes; o plasma necessita de sistema de baixa pressão (vácuo), o que dificulta a linha de produção; o tratamento com raios Gama necessita equipamentos caros; o tratamento Corona apresenta dificuldades em materiais de geometria complexa, além de necessitar de um bom controle ambiental (temperatura, fluxo de ar, tipo de gás, umidade relativa, limpeza de eletrodos).

Vai ser abordado neste trabalho somente as técnicas de tratamento corona e irradiação ultravioleta.

3.11.1 - Tratamento corona

A descarga corona é produzida quando um potencial elétrico é aplicado entre dois eletrodos,¹¹⁴ que pode ser ponta-placa ou placa-placa. Geralmente o ar atmosférico é o gás que está entre as placas, tal como está representado na figura 3.24. Este método tem diversos campos de aplicação, desde tratamento de água até a separação de poluentes (precipitadores eletrostáticos) e é muito utilizada em tratamentos superficiais, principalmente no setor de embalagens plásticas, onde a superfície é tratada para melhorar a adesão da tinta de impressão.

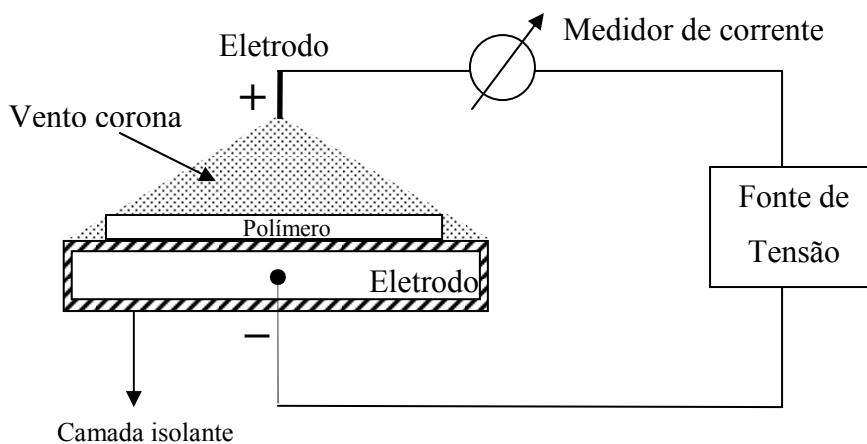


Figura 3.24: Esquema representativo sistema corona ponta-plano.

Quando o alto campo elétrico (5.000 a 20.000Volts) é aplicado entre os eletrodos, os elétrons colidem com as moléculas de gás que são ionizadas, causando o vento corona e espécies ativas (íons). Se um polímero é colocado entre os eletrodos, este sofre ataque dessas espécies ativas, podendo inclusive, criar radicais na superfície do material polimérico.

Alguns fenômenos visíveis acontecem entre os eletrodos. Dentre eles, se destaca a abertura de uma descarga luminosa que indica que está presente uma alta densidade de elétrons dotados de alta energia. Este fenômeno fica mais estável e intenso quando se diminui a quantidade de moléculas entre os eletrodos (vácuo). A colisão dos elétrons com oxigênio, nitrogênio e outros gases faz com que este elétron perca energia que é transferida às moléculas, excitando-as ao estado energético mais elevado. Posteriormente, essas moléculas voltam ao seu estado natural liberando energia, na forma de luz, calor e outras radiações eletromagnéticas. A figura 3.25 indica a quantidade de energia dos elétrons que são necessárias para a geração de descarga luminosa. Note que o valor varia de 1 a 20eV. Sabe-se que a energia para quebrar uma ligação hidrogênio-carbono e gerar uma espécie ativa na superfície do polímero é cerca de 2,5eV, ou seja, há energia suficiente durante as colisões para gerar tais espécies. Durante efeito corona, gera-se muito gás ozônio, perceptível pelo cheiro característico,

significando que há oxigênio nascente próximo à superfície do polímero. Este oxigênio se combinará facilmente com as espécies ativas formando grupos hidroxilas e carbonilas na superfície do polímero. Estes grupos serão os pontos de ligação de moléculas para ali serem enxertadas.

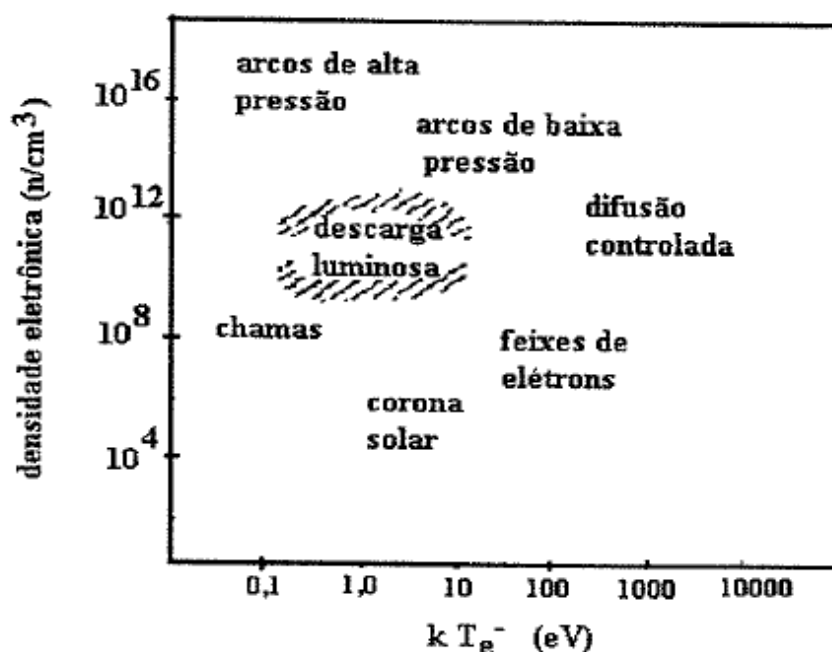


Figura 3.25: Gráfico de densidade de elétrons em função da energia. ¹¹⁴

Os parâmetros que influenciam nas propriedades superficiais dos filmes tratados com descarga corona são: temperatura, umidade relativa, distância dos eletrodos, forma dos eletrodos, tipos de gases utilizados, tensão aplicada e tempo de tratamento ¹⁰⁷. Segundo Torres e Sinésio, em um trabalho de tratamento corona em PET, as maiores influências no valor do ângulo de contato, portanto, na eficácia do tratamento por descarga Corona, normalmente são exercidas pela distância da ponta de descarga à amostra e pelo tempo de tratamento. Nos ensaios realizados, no entanto, a distância apresentou uma influência menor na eficácia do tratamento em relação ao tempo. ¹⁰⁸

Zhu et al ⁷⁵ estudaram a modificação de membranas de polietersulfona através de tratamento corona em uma câmara com ar seco e fluxo controlado (10L/min.) com duas

placas de alumínio como eletrodo de dimensões de 20x30 cm a uma distância entre placas de 8 mm, a placa inferior possuía um revestimento de silicone com 4mm de espessura, utilizou-se também um gerador de frequência (10KHz). A graftização em sua superfície foi feita meio aquoso com ácido acrílico (1 a 2mol/L). A reação de graftização atingiu 5 horas em seu melhor grau de polimerização que chegou a 150 a 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Foram feitas medidas de ângulo de contato de água sobre a superfície do polímero e indicou variação de 90° no ângulo de contato entre antes e após a graftização. O estudo se estendeu as propriedades mecânicas do material e mostra que até 100W de potência, quase não houve alterações nas propriedades mecânicas do material, mas acima de 200W de potência há comprometimento dessas propriedades.

Jingxin e Liao ⁷⁶ graftizaram poli (ácido acrílico) em filmes de polietileno de baixa densidade, utilizando-se o tratamento corona. Neste trabalho houve a impregnação de benzofenona no filme de polietileno, antes de realizar o tratamento corona. A graftização ocorreu em solução aquosa de ácido acrílico. Parâmetros, tais como, tempo de tratamento corona e voltagem fez com que o grau de graftização aumentasse até um valor máximo e depois decrescesse. O aumento de tempo de reação, temperatura de reação e concentração de monômeros (ácido acrílico) fez com que o grau de graftização aumentasse. O melhor resultado obtido (grau de graftização de 220 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ocorreu com tempo de tratamento de 70s, 20% de ácido acrílico, 1,5 horas de reação a temperatura de 70°C.

3.11.2 – Tratamento por radiação de fótons ou ultravioleta

A radiação ultravioleta é classificada segundo faixas de comprimento de onda (λ): *UVA* (400 – 320nm, também chamada de "luz negra" ou onda longa), *UVB* (320–280nm, também chamada de onda média) e *UVC* (280 - 100nm, também chamada de UV curta ou "germicida"). A energia fornecida pela onda eletromagnética é suficientemente alta para gerar sítios ativos e formação de hidroperóxidos na superfície dos materiais poliméricos.

A equação de Planck permite o cálculo da energia necessária para a propagação da onda, dada por:

$$E = h c / \lambda \quad (3.2)$$

Onde h é a constante de Planck que vale $4,13 \times 10^{-15}$ eV.s e c é a velocidade da luz que vale 3×10^8 m/s.

O comprimento de onda máximo para ultravioleta está em torno de 400nm, significando que a energia mínima para este comprimento de onda é 3,1eV (elétrons volts). Esta energia é suficiente para a quebra de ligação C-H, que é cerca de 2,54eV e a energia para a quebra de uma ligação C-C é de 3,79eV. Ambas são geradoras de sítios ativos na superfície dos polímeros.

Vários estudos sobre a radiação UV têm sido feitos para observar seus efeitos na fotodegradação dos materiais poliméricos e na foto polimerização de resinas, vernizes e adesivos. Seu uso na modificação de superfícies poliméricas é uma técnica que tem sido usada com frequência.

Ebara et al ⁷⁷ utilizando técnicas de UV, graftizou P-N-IPAAm em micro canais de membranas de polidimetilsiloxano para uso em processos de filtragem, afim de se produzir uma válvula aos micro canais, permitindo a passagem de moléculas específicas. Neste trabalho foi empregada uma polimerização direta, utilizando a benzofenona como foto iniciador. Nesta técnica, primeiramente faz-se a adsorção da benzofenona na superfície do filme polimérico e posteriormente mergulha-se o filme em uma solução aquosa de N-IPAAm (monômero) sob irradiação UV com uma lâmpada de 365nm e 100W de potência. A densidade de moléculas na superfície do filme aumenta com o aumento do tempo de exposição e a concentração de foto iniciador.

Curtia. et al ⁷⁸ graftizaram P-N-IPAAm sobre a superfície de polietileno tereftalato (PET) e poliestireno (PS) através de UV. Foi utilizado pré-irradiação da superfície com

uma lâmpada de 215W seguida de foto polimerização do n isopropilacrilamida (N-IPAAm) e acrilamida (AAm) em uma solução aquosa tendo como foto iniciador o periodato de sódio. Os resultados indicaram alterações importantes no ângulo de contato entre água e a superfície dos polímeros utilizados e ainda apresentou a mudança de natureza hidrofóbica – hidrofílica em 35°C (LCST do copolímero P-N-IPAAm/PAAm).

O uso de radiação ultravioleta é evidenciado pela facilidade de aplicação e manuseio. A possibilidade de irradiar grandes áreas superficiais de geometria complexa, talvez seja a maior vantagem de se utilizar esta técnica. Além disso, este é um método relativamente barato e de baixa manutenção.

3.12 – Estudos *in vivo* com materiais

Os testes *in vivo* são mais difíceis de serem realizados e tem um custo mais elevado. Além disso, eles são mais difíceis de se controlar, envolvem sempre um comitê de ética e por isso são usados mais na fase final, quando já se tem um bom conhecimento a partir de testes *in vitro*.

Para se testar curativos, geralmente se preparam feridas por segunda intenção em animais, como ratos, camundongos, coelhos ou cães. O curativo é aplicado sobre a área da ferida e sempre há um grupo controle onde não se aplica o curativo em teste. Neste caso, apenas protege-se o ferimento com gaze e vaselina. O teste tem duração máxima de 28 dias, onde se verifica a aderência, absorção e aspecto do exudato ⁷ e a cinética de cicatrização. ¹²⁵ A cinética é realizada com medidas dimensionais da ferida com paquímetro ou via programas de computador baseados em fotografia. A troca de curativos pode ser realizada diariamente, ou em intervalos maiores, dependendo da especificidade do trabalho. Alguns animais são sacrificados no decorrer dos experimentos para serem submetidos a biópsias na região da ferida para análises histológicas ¹³¹. Tais análises buscam verificar informações como: a presença de macrófagos, fibroblastos, angiogênese, disposição das fibras de colágenos, presença de hemorragia, aspecto granular e reações inflamatórias.

Capítulo 4 – Procedimento Experimental

O fluxograma abaixo (fig. 4.1) representa a metodologia utilizada neste trabalho

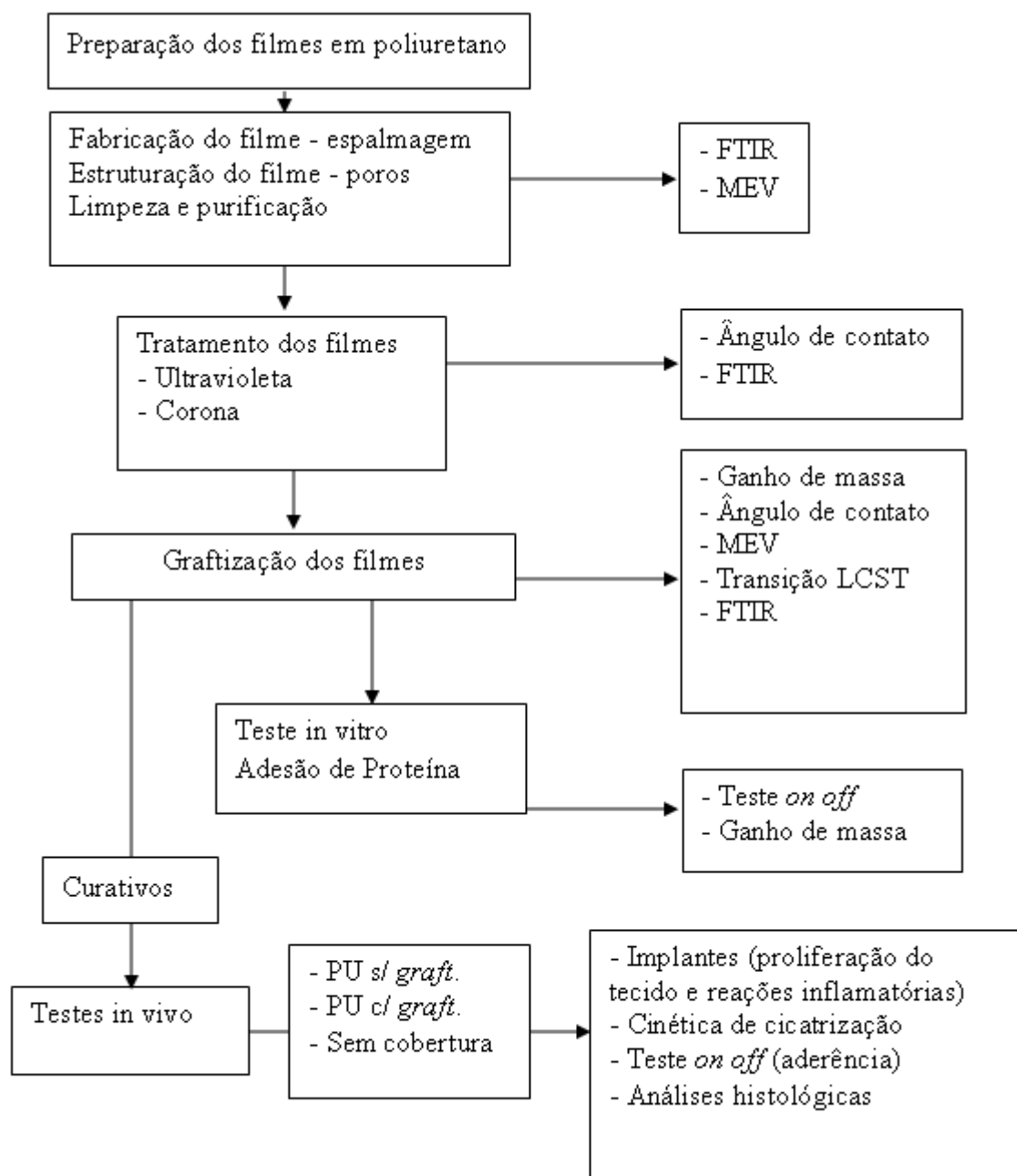


Figura 4.1 – Fluxograma da metodologia utilizada

4.1 - Materiais

4.1.1 - Preparação dos filmes:

Os filmes de poliuretano termoplástico Elastollan ELA585A10 (BASF), gentilmente cedido pela empresa Petropol Polímeros, foram obtidos através da técnica de espalmagem, por espalhamento de uma solução de poliuretano 20% em piridina PA, sobre uma placa de vidro.

O procedimento adotado para seu desenvolvimento começou com a pesagem de 20g de poliuretano (figura 4.2), juntamente com 80g de piridina PA (figura 4.3). O béquer foi tampado com um vidro de relógio para evitar evaporação do solvente, até a sua completa dissolução (figura 4.4) e deixado por 24 horas à temperatura de 50°C,



Figura 4.2: Poliuretano Elastollan ELA585A10 natural



Figura 4.3: Poliuretano em piridina a temperatura de 50°C

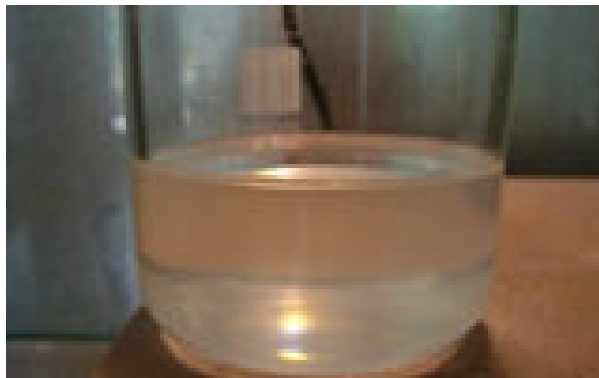


Figura 4.4: Poliuretano totalmente dissolvido em piridina a 50°C

4. 1. 2 - Obtenção do filme

Para a obtenção do filme, utilizou-se uma placa de vidro de 150x170mm, que foi primeiramente lavada com solução sulfocrômica, enxaguada diversas vezes com água destilada. Após sua secagem em estufa a 105°C, foram coladas, simetricamente, várias camadas de fita adesiva em suas bordas laterais, de modo que as fitas que determinaram a espessura do filme a ser formado ficassem com a mesma altura.

A espalmagem do filme foi realizada, dentro de uma capela, espalhando-se a solução sobre uma placa de vidro em uma quantidade suficientemente grande para poder cobrir toda a placa (figura 4.5).



Figura 4.5: Derramamento da solução sobre a placa de vidro

Em seguida, com auxílio de um bastão de vidro apoiado sobre as fitas das bordas, conforme mostra a figura 4.6, espalhou-se a solução sobre a placa de vidro, com uma velocidade lenta e uniforme. (figura 4.7).

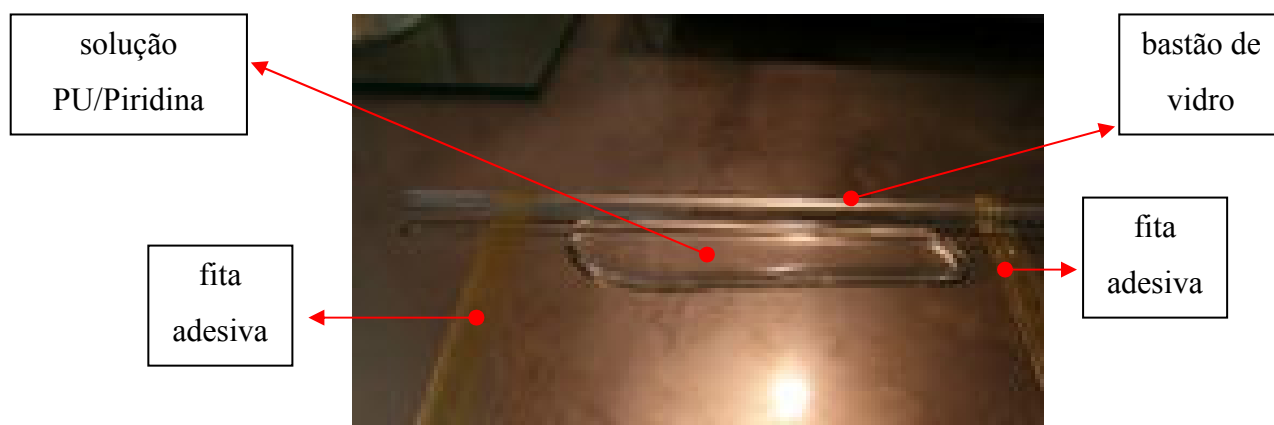


Figura 4.6: Início da operação de espalmagem da solução



Figura 4.7: Fim do processo de espalmagem da solução

Após o espalhamento, desligou-se o exaustor e fechou-se a porta da capela, a fim de que a secagem do filme se desse sempre de maneira suave e lenta. Após 8 horas, tempo suficiente para que o filme se formasse, retirou-se o filme da placa de vidro, puxando lentamente uma de suas bordas, até retirada completa do filme, conforme figura 4.8..



Figura 4.8: Retirada do filme da placa

Os filmes porosos foram obtidos acrescentando à solução de piridina, cerca de 10% de cloreto de lítio, em seguida repetiu-se o mesmo procedimento de espalmagem descrito acima. Após a evaporação da piridina, os filmes foram retirados da placa de vidro e imersos em um béquer contendo água destilada à temperatura de 50°C sob agitação, para retirada do cloreto de lítio. A água foi trocada a cada 60 minutos de agitação. Foi realizado um total de seis trocas de água, sendo que na última o tempo de agitação se estendeu por 24 horas. O objetivo é a formação de poros pela retirada dos sais (cloreto de lítio) da estrutura do material.

4. 1. 3 – Limpeza e extração de contaminantes do filme.

O filme, após ser retirado da placa, foi cortado em pedaços menores para facilitar a colocação em um extrator Soxhlet para retirada de eventuais aditivos (plastificantes, antiaderentes, etc.). Utilizou-se como solvente o etanol P.A. O processo de extração foi realizado por 24 horas. O equipamento utilizado para a extração (figura 4.9) consistiu de uma manta de aquecimento, um balão para o depósito de etanol, um extrator Soxhlet e um condensador de refluxo, refrigerado a água.

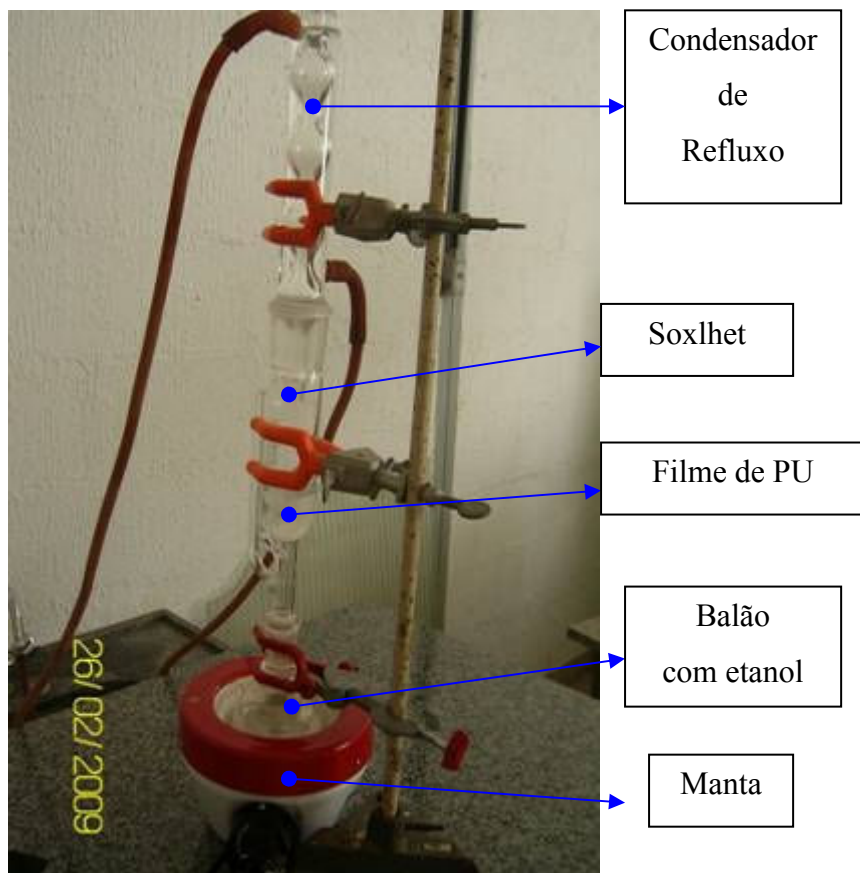


Figura 4.9: Extrator Soxhlet

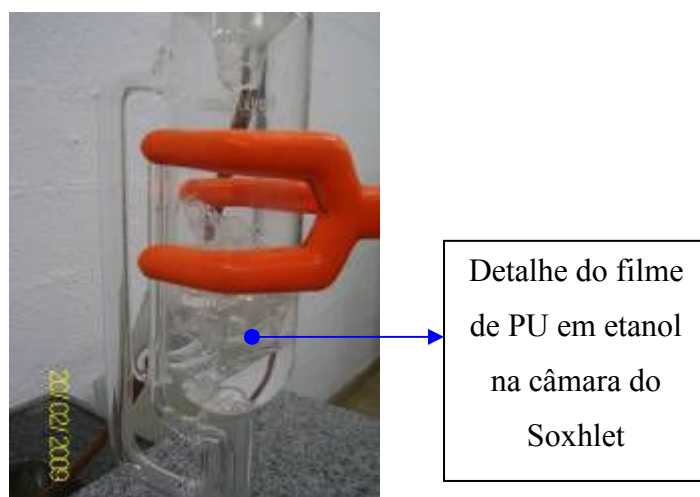


Figura 4.10: Detalhe da câmara do Soxhlet com filme de PU

4. 1. 4 - Purificação do monômero – N – isopropilacrilamida (N-IPAAm)

Na purificação do n-isopropilacrilamida 97% (Aldrich) (fig. 4.11), 50g de n-isopropilacrilamida (fig. 4.12) foram dissolvidos em 300ml de n-hexano (Synth). a 60°C, com agitação por 15 minutos.(fig. 4.13 e fig. 4.14).



Figura 4.11: N – isopropilacrilamida sendo preparado para purificação



Figura 4.12: N- hexano adicionado ao n-isopropilacrilamida (N-IPAAm).



Figura 4.13: Dissolução de N-IPAAm em n-hexano com aquecimento e agitação.



Figura 4.14: Dissolução total de N-IPAAm em n-hexano a 60°C.

Transcorrido o tempo, foi feita a primeira filtração a vácuo na solução, ainda quente, tendo como objetivo retirar-lhe as impurezas insolúveis (fig. 4.15 até fig. 4.16). Utilizou-se um funil de Buchner e um filtro de papel.



Figura 4.15: Filtragem à vácuo da solução de N-IPAAm em n-hexano.

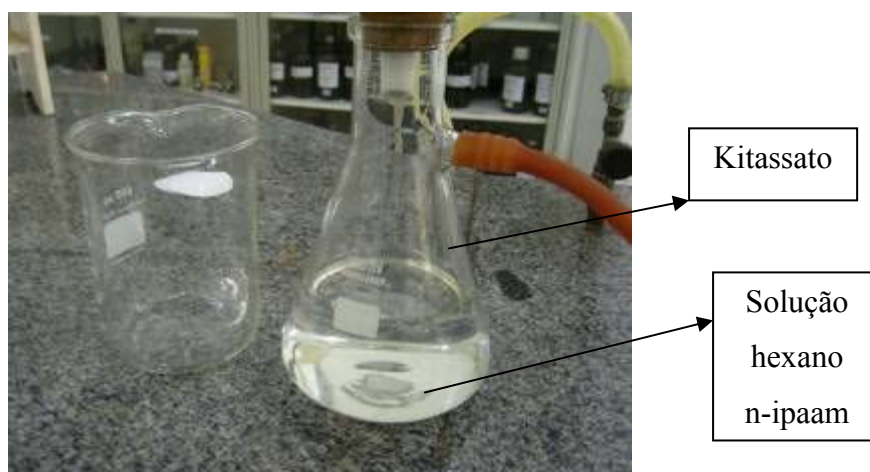


Figura 4.16: Solução filtrada de N-IPAAm em n-hexano.

Após a filtragem a quente, transferiu-se o líquido filtrado do kitassato para um béquer de 500ml e realizou-se a precipitação a -6°C , utilizando-se para isto uma solução de salmoura e gelo dentro de um recipiente de porcelana.

Após 6 horas, observou-se uma intensa precipitação de cristais de N-IPAAm, que foram levados novamente ao processo de filtração a vácuo (fig. 4.17), onde foram separados, ainda em baixa temperatura, para que o N-IPAAm não se solubilizasse novamente e houvesse perda no rendimento da purificação. Este procedimento foi repetido como medida de precaução.

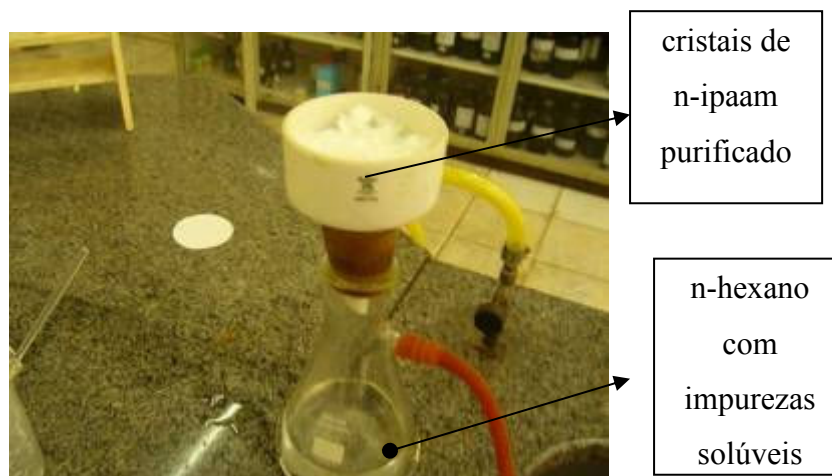


Figura 4.17: N-IPAAM purificado e totalmente separado do n-hexano.

Após a filtragem à vácuo, o N-IPAAM foi colocada na embalagem original (após limpeza) e levado para secagem à vácuo durante 2 horas, utilizando se um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, conforme a figura 4.18. O N-IPAAM foi guardado em local adequado aguardando as etapas de polimerização.



Figura 4.18: Sistema de secagem à vácuo de N-IPAAM.

4. 1. 5 - Tratamento corona

O equipamento para tratamento corona foi construído (fig. 4.23) com ajuda de alguns colaboradores e com recursos do laboratório de tecnologia mecânica e laboratório de polímeros do Unileste. O gerador de frequência e o formato dos eletrodos foram os detalhes do projeto em que mais houve necessidade de aprimoramento: o gerador de frequência por necessidade de ajuste da impedância entre gerador e os eletrodos pela necessidade de se distribuir melhor o vento corona.

O tratamento corona foi realizado utilizando-se dois procedimentos:

1 – Tratamento do poliuretano (purificado) em corona com atmosfera livre com 60% de umidade relativa. (fig. 4.19)

2 – Tratamento do poliuretano (purificado) em corona sob vácuo primário (20torr) e adição de argônio sob atmosfera rarefeita (fig. 4.20 e 4.21).

Em ambos os casos foi utilizado uma tensão de 20.000Volts, corrente de 3 a 6mA e frequência de 12kHz. O filme foi colocado entre os dois eletrodos, mais especificamente sobre o anodo. Houve variação de tempo de tratamento e variação da distância dos eletrodos, sendo que, para verificar esses pontos ideais de tratamento, houve a medida da redução de ângulo de contato entre a água e a superfície do poliuretano (tensão superficial). Essas medidas foram feitas 5 minutos após tratamento à atmosfera livre e 30 minutos após tratamento em vácuo.

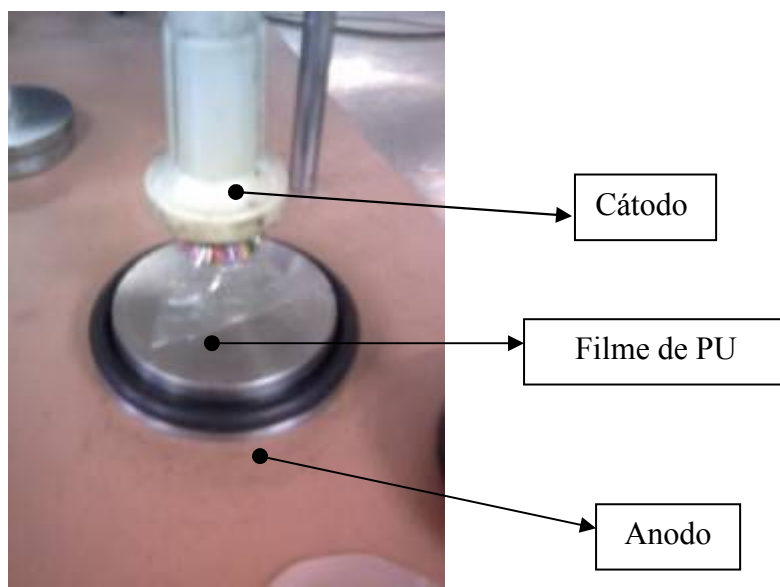


Figura 4.19: Sistema para tratamento corona do filme de PU.

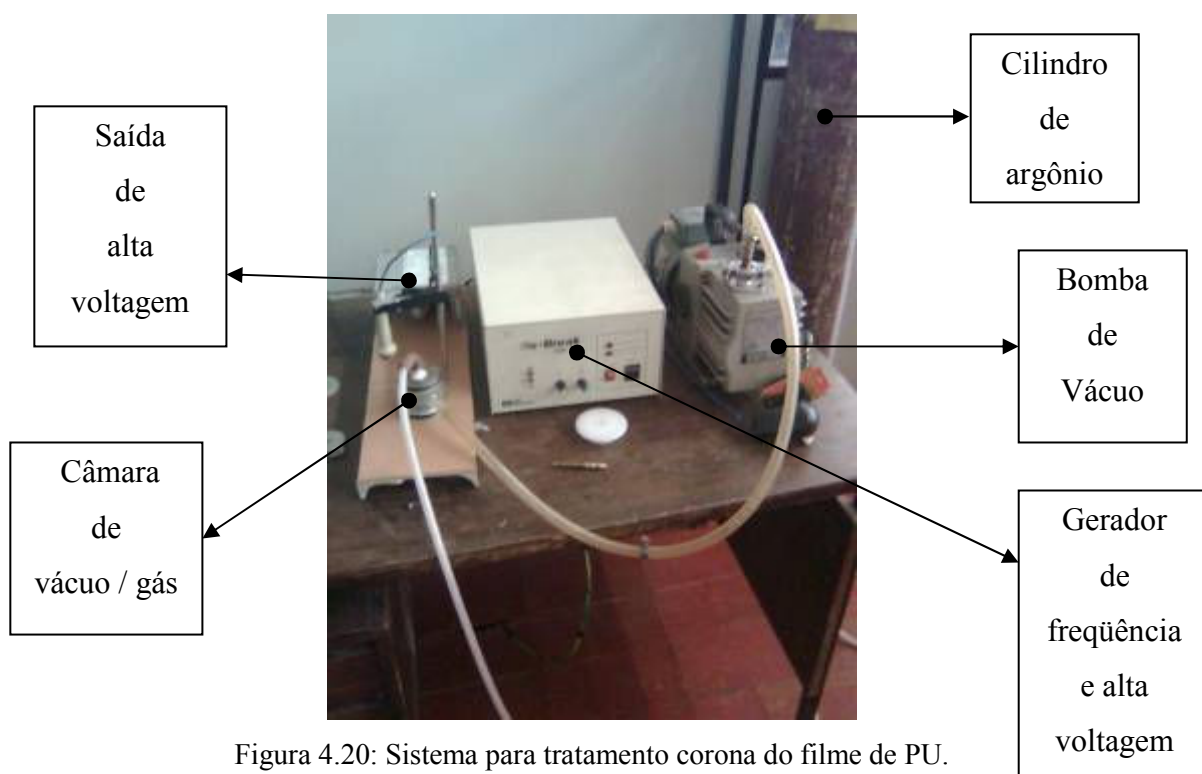


Figura 4.20: Sistema para tratamento corona do filme de PU.

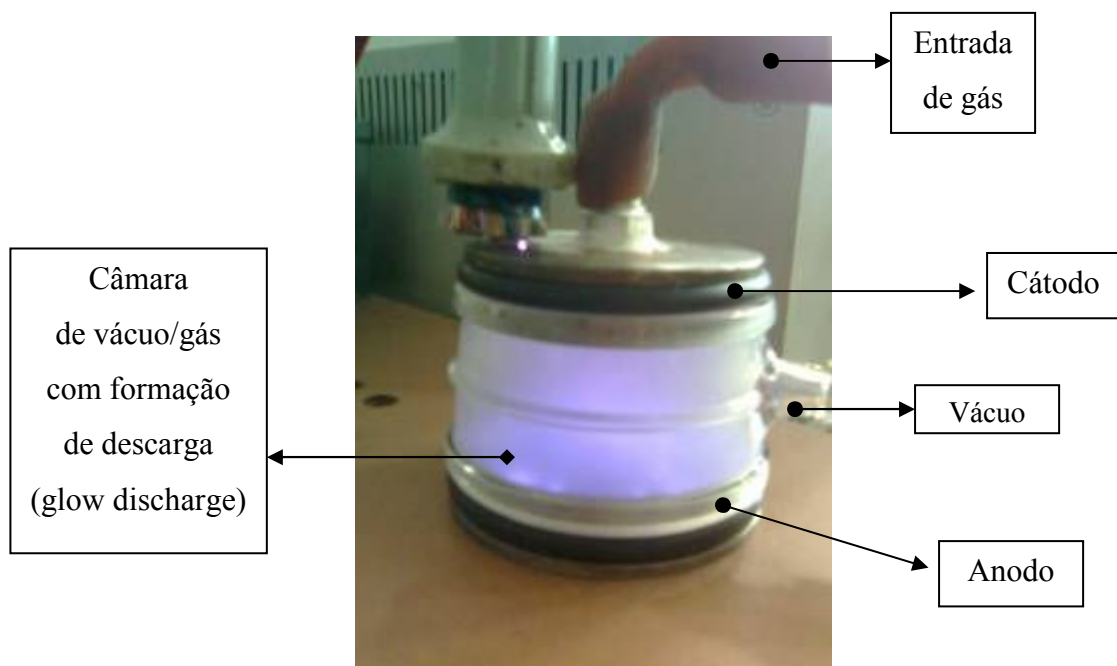


Figura 4.21: Câmara de vácuo/gás indicando cor azul na abertura do arco elétrico

4. 1. 6 - Tratamento com radiação Ultravioleta

O tratamento com radiação ultravioleta foi feito adaptando-se uma lâmpada de baixa pressão, com comprimento de onda 256-370nm, com de potência 30W, dentro de uma calha de lâmpada fluorescente (fig. 4.22), com revestimento de alumínio. Realizou-se o tratamento colocando-se o filme de poliuretano sobre uma placa cerâmica a uma distância de 5cm da lâmpada (fig. 4.23), durante vários intervalos de tempo. Primeiramente foi realizado 12 horas de tratamento, para verificar o comprometimento das propriedades mecânicas do poliuretano após longa exposição à radiação. Após esta verificação, padronizou-se um tratamento de 4 horas para a formação de hidroperóxidos e radicais livres na superfície do PU para a posterior graftização com N-IPAAm.



Figura 4.22: Tratamento com radiação ultravioleta.



Figura 4.23: Filme de PU exposto ao UV.

..

4. 1. 7 - Graftização

A graftização do N-IPAAm foi realizada em um balão de três bocas (fig. 4.24 e 4.25) com agitação magnética, fluxo de nitrogênio (1 bolha por segundo) e controle de temperatura (abaixo de 32°C). A solução foi preparada com 5% de monômero N-IPAAm em ácido nítrico 0,04N e 0,1% nitrato cérico amoniacal e degaseificada em vácuo. Após pesagem, os filmes de poliuretano foram introduzidos no reator, juntamente, como referência, de um pedaço de filme de poliuretano sem tratamento. Transcorridas doze horas, os filmes foram retirados da solução e devidamente lavados para a retirada de monômeros e polímeros que não estavam adequadamente aderidos à sua superfície. Essa limpeza foi feita com trocas contínuas de água destilada a 70°C, que foi agitada durante 4 horas. Os filmes foram secos em estufa 105°C e novamente pesados.

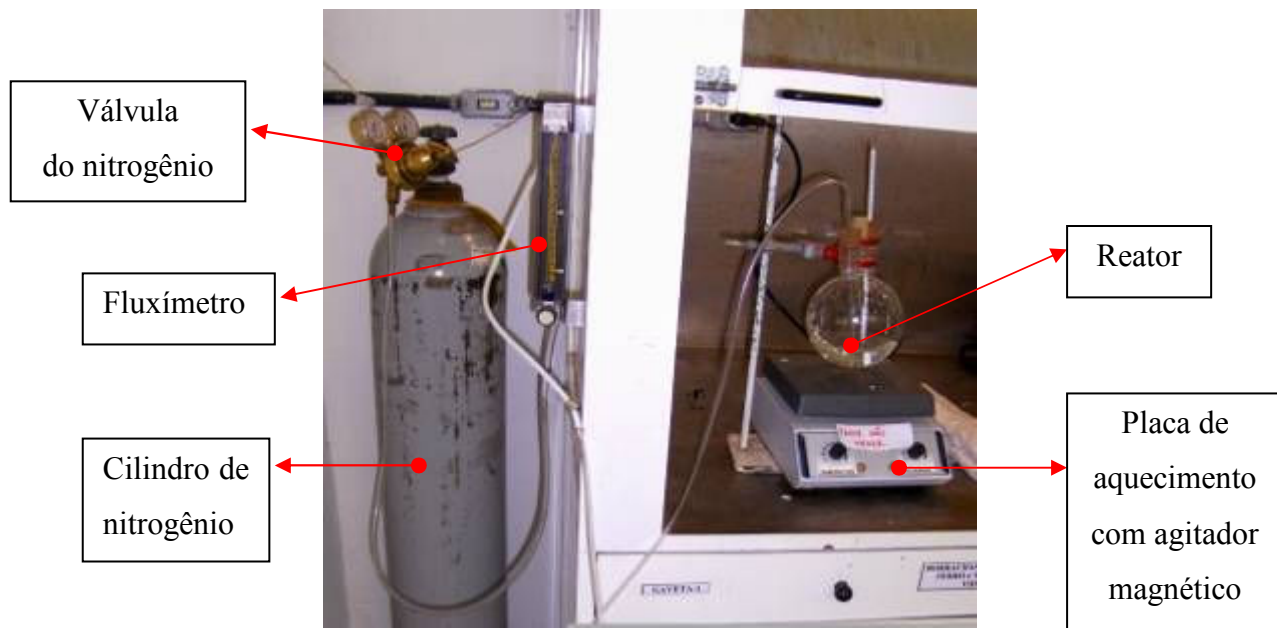


Figura 4.24: Sistema do reator com atmosfera controlada.

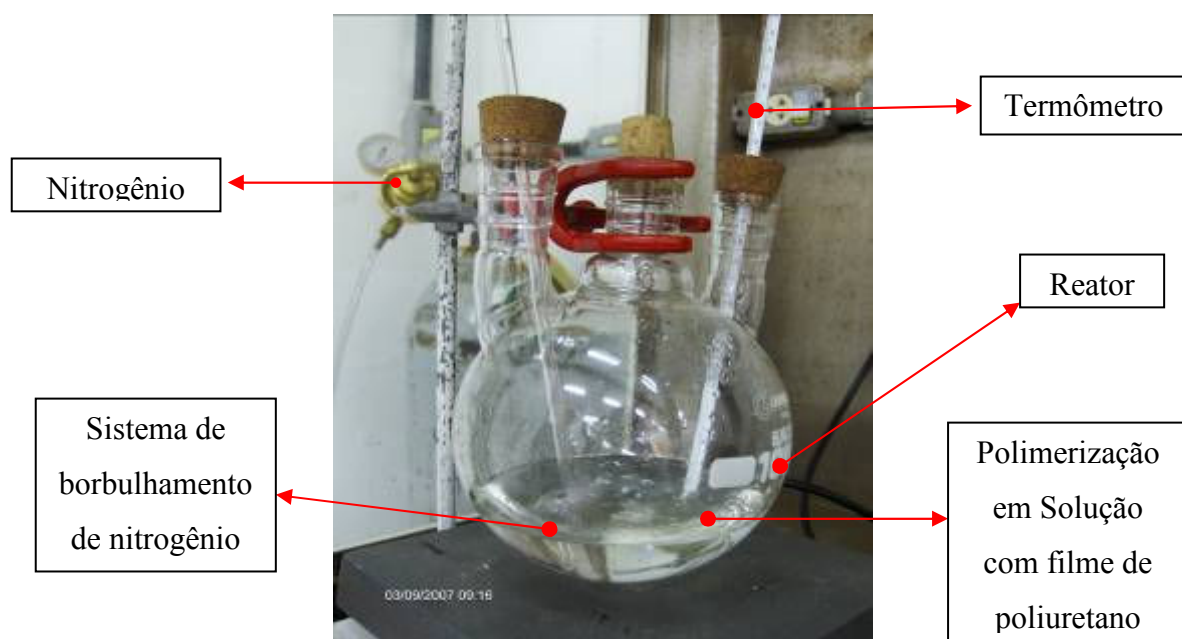


Figura 4.25: Reator para graftização

4. 1. 8 - Medidas do ângulo de contato

O ângulo de contato entre a gota de água deionizada e o filme de poliuretano foi medido utilizando-se uma lupa e um porta amostra que foi montado do seguinte modo: colocou-se a lupa na posição inclinada de 90° em relação a sua posição original (fig. 4.26), nesta posição poderia se observar a gota na horizontal. Fixou-se o filme sobre a borda lateral de um vidro de 2mm de espessura com a ajuda de dois grampos (fig. 4.27), para que ficasse bem esticado e reto. Com uma micro seringa colocou-se $1\mu\text{L}$ de água deionizada sobre a superfície do filme em seguida fotografou-se a gota, para posterior medição em microcomputador. As medidas foram tomadas após pelo menos 30 segundos de contato da água com a superfície do poliuretano e foram realizadas cinco medidas em cada filme, com desvio de 2° .

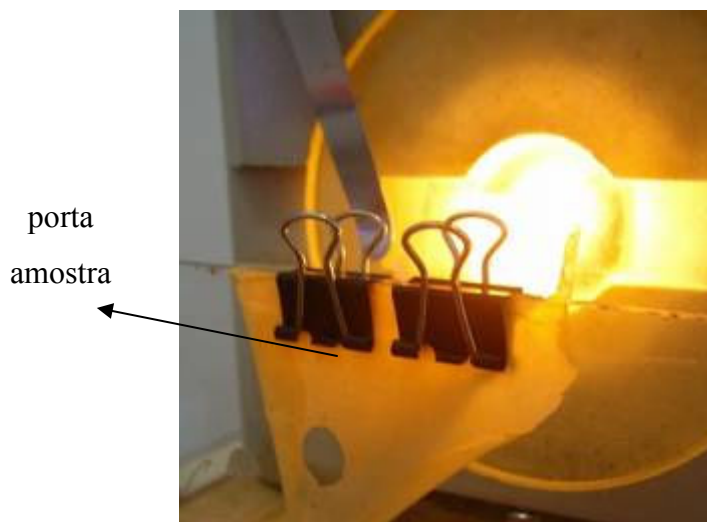


Figura 4.26: Porta amostra do filme na medida do ângulo de contato.



Figura 4.27: Lupa para observação do ângulo de contato

4. 1. 9 – Transição LCST

A medida da temperatura de transição LCST foi realizada colocando-se um filme de poliuretano graftizado com P-N-IPAAm em uma placa de Petri imerso em água destilada (fig.4.28). Aqueceu-se a água até uma temperatura de 35°C e deixou-se resfriar naturalmente. Foi feita leitura de temperatura através de uma termo resistência PT100 classe B, mergulhado na água. Este sensor foi acoplado a um multímetro para leitura da resistência ôhmica e através de uma tabela convertia-se ao valor da temperatura. O erro deste tipo de montagem (sensor e multímetro) é de 0,30°C. O registro foi feito visualmente e com uma câmera digital através da verificação de alteração da transparência. Para melhor visualização do efeito, a placa de Petri foi colocada sobre uma figura contendo um código de barra.

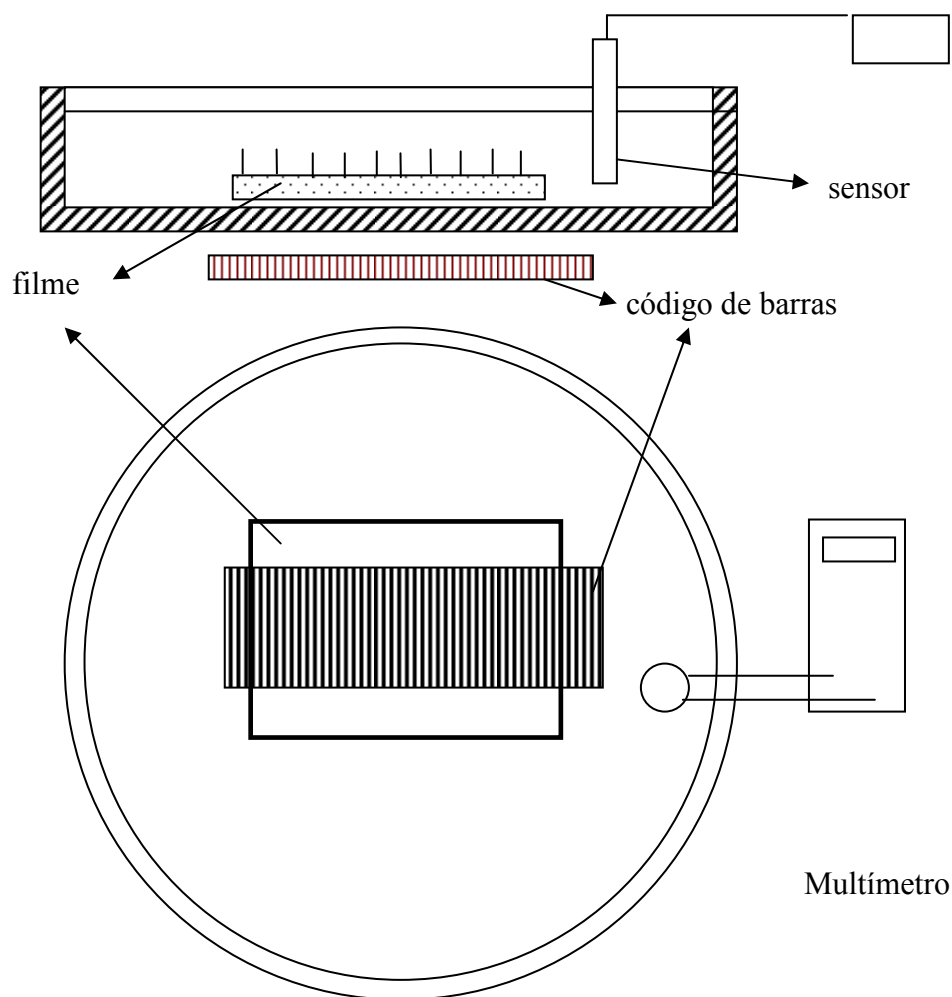


Figura 4.28: Esquema representativo para medição da LCST.

4. 1. 10 – Espectroscopia infravermelho FTIR-ATR

As amostras foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). Espectros de FTIR foram coletados num espectrômetro Perkim-Elmer Paragon 1000, utilizando-se um acessório para reflexão total atenuada (ATR). Durante as análises, as amostras foram pressionadas contra a superfície de um cristal ATR: KRS-5. A análise por reflexão atenuada permite a análise da superfície do material, pois é baseada na reflexão total da radiação na interface de matérias com índices de refração diferentes.

Os espectros foram obtidos utilizando 16 leituras por espectro; resolução de 4cm^{-1} , região de aquisição de 4000 a 400cm^{-1} em ar atmosférico e espectro de referência, *background* obtido com a presença do cristal.

4. 1. 11 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície de fratura dos materiais produzidos foi investigada através de microscopia eletrônica de varredura, utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura, marca JEOL, modelo 6360LV, do departamento de Engenharia Metalúrgica da UFMG. As superfícies de fratura foram obtidas através da imersão dos materiais em nitrogênio líquido por cinco minutos e fratura imediatamente realizada após a remoção. Este procedimento permite preservar a morfologia original da estrutura interna, visualizando o formato dos poros e possibilitando fazer medidas da camada superficial de material enxertado. As superfícies de fratura foram recobertas com ouro e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura.

4. 1. 12 - Teste *in vitro* de adesão em proteína

O teste de adesão *on-off in vitro* foi feito testando a adesão de proteína sobre a superfície do poliuretano graftizado com P-N-IPAAm, primeiramente fazendo-se aderir proteína (albumina 2,0% em água) em duas condições: acima e abaixo de 32°C . Neste caso, foi analisado qual o estado da superfície do PU (hidrófilo ou hidrófobo) seria mais adequado para a fixação das proteínas. Em seguida, foi verificado se as proteínas que aderiram acima de 32°C (estado hidrófobo) estavam bem fixas e se abaixo de 32°C essas proteínas seriam eluídas.

As amostras 1 e 2 foram feitas de poliuretano graftizado com P-N-IPAAm. A amostra 1 foi colocada em uma solução de albumina a temperatura maior que 32°C durante 5 dias. A amostra 2 foi colocada em uma solução de albumina a temperatura abaixo de 32°C durante 5 dias.

Após a etapa de deposição em solução aquosa de albumina as amostras foram lavadas, secas e pesadas da seguinte maneira (limpeza 1):

- Amostra 1 lavada em água destilada a temperatura acima de 32°C
- Amostra 2 lavada em água destilada a temperatura abaixo de 32°C

A amostra 1 foi novamente lavada em água destilada, mas desta vez à temperatura abaixo de 32°C para verificar se haveria perda de massa, ou seja, se a proteína que aderiu acima de 32°C perderia a aderência abaixo de 32°C. A amostra 2 foi novamente lavada a temperatura abaixo de 32°C (Limpeza 2). Em seguida foram secas em estufa e pesadas novamente para verificação da variação de massa.

4. 2 - Testes *in vivo*

Os testes *in vivo* foram realizados no ICB – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG departamento de Fisiologia e Biofísica/Lab. de Angiogênese.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA protocolo 069/09.

4. 2. 1 - Preparação do curativo

Os curativos foram preparados no Departamento de Micro Clínica da Faculdade de Farmácia, do Unileste. Foram utilizados os filmes de poliuretano com e sem tratamento, que foram cortados utilizando-se um vazador de 10mm de diâmetro. Após o corte, o filme foi levado para esterilização em luz ultravioleta de 30W de potência e comprimento de onda 254-370nm, durante dois minutos de exposição em cada face do filme a uma distância de 2cm do filme. Os filmes esterilizados foram colocados dentro de um coletor de amostra previamente esterilizado e levados para a montagem final, em uma capela de fluxo laminar com ambiente esterilizado por luz ultravioleta.

A montagem foi feita utilizando-se duas películas - uma com adesivo para prender o material à pele do animal e a outra simples (sem adesivo) apenas para proteger temporariamente o material até seu uso no teste *in vivo* - que foram montadas paralelamente, tendo entre elas o material tratado (fig. 4.29). Para esse fim, foi utilizada capela previamente esterilizada por luz ultravioleta durante 15 minutos, luvas de látex e pinças de aço inox para manuseio das partes com e sem adesivo do curativo.

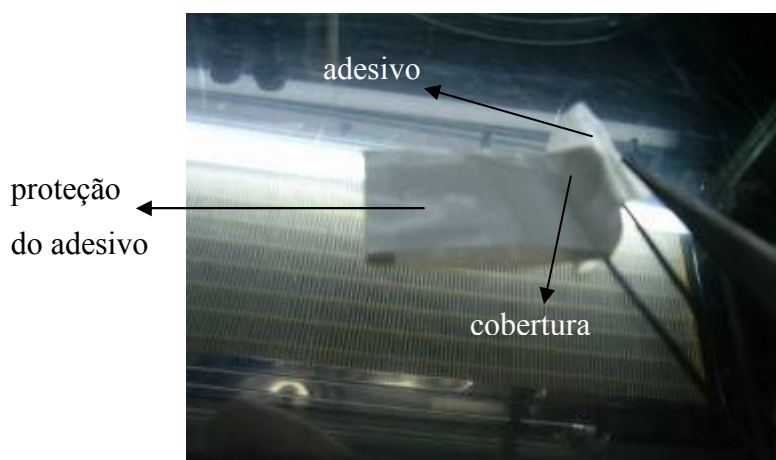


Figura 4.29: Montagem do curativo.

Os curativos prontos foram colocados em um coletor de amostra convencional e levados para a aplicação nos testes *in vivo*.

4. 2. 2 - Implantação

Todos os testes *in vivo* foram feitos no Instituto de Ciências Biológicas - ICB - da UFMG.

Este teste foi realizado para dois tipos de materiais: o poliuretano e poli(n-isopropilacrilamida). O poliuretano utilizado é o mesmo fabricado no procedimento 4.1.2 e sem poros. O poli(n-isopropilacrilamida) foi sintetizado pelo processo de polimerização em solução aquosa, em um reator de vidro de três bocas. A solução possuía a seguinte composição:

- 50g água;
- 3,35g de N-IPPA_m; monômeros.
- 0,067g MBAA_m (*N, N'*-metileno-bisacrilamida); agente de ligação cruzada.
- 0,0335g APS – persulfato de amônia; Iniciador
- 0,0335g TEMED-trietililenodiamina, acelerador.

A reação ocorreu à temperatura ambiente em cerca de 15 minutos e o resultado foi um hidrogel, de consistência macia tal como uma gelatina. O material foi lavado em água destilada, cerca de 5 vezes, sempre fazendo-se várias ciclagens de temperatura, aquecendo e resfriando-se o banho em torno da LCST (32°C) para facilitar a limpeza, pois acima de 32°C a água é expulsa do interior do hidrogel carreando as impurezas (monômeros, iniciadores e catalisadores). Para aplicação do implante, cortou-se, com auxílio de uma lâmina, pequenos pedaços (0,3x0,5 cm) deste hidrogel.

Tanto o poliuretano como o hidrogel foram esterilizados em autoclave à vapor, à temperatura de 130°C, durante o tempo de uma hora. Em seguida colocados dentro de um recipiente esterilizado que foi hermeticamente fechado e levado ao ICB para implantação nos animais.

Os implantes foram colocados na região subcutânea dorsal de camundongos (Swiss), através de uma incisão de 10mm de comprimento. Não houve nenhuma fixação do implante. Assim que o material for implantado, a abertura foi suturada. Após 7 dias os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os implantes retirados para análise histológica

Foram utilizados três animais, por material, totalizando-se 6 animais. Os implantes para avaliação histológica, depois de retirados, foram fixados em formalina tamponada (aldeído fórmico (37- 40%) 100ml, fosfato monossódico 4g, fosfato bisódico 4,5g, água destilada 900 ml) por 24 horas. Posteriormente o material foi processado para inclusão em parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia (5 µm) e as lâminas montadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

As imagens microscópicas dos cortes histológicos foram capturadas com uma objetiva (40x) plana apocromática em microscópio (Zeiss Axiolab; Zeiss; Germany). As imagens foram digitalizadas e transferidas para o analisador de imagem (Kontron Eletronics, Carl Zeiss – KS300 versão 2).

O acondicionamento dos camundongos foi feito em Biotério de manutenção (laboratório de angiogênese, local onde os experimentos foram realizados). Os animais foram distribuídos em caixas de polipropileno (fig. 4.30) sobre estantes vazadas, o que permitia a circulação de ar entre as caixas (distância de 5cm entre cada uma horizontalmente e de 80cm verticalmente). Os animais foram tratados com ração industrial e água filtrada. O barulho era restrito e a iluminação controlada. Os ciclos de claro-escuro foram controlados artificialmente, diariamente, segundo o ciclo natural da espécie. A temperatura também foi controlada e a circulação de ar garantida por exaustor.



Figura 4.30: Acondicionamento dos camundongos no biotério.

4.2.3 - Verificação do mecanismo *on-off* em um modelo de ferida cutânea excisional.

Testes para verificação do mecanismo on-off dos curativos foram executados em camundongos Swiss que foram anestesiados (fig.4.31) e tiveram dorso previamente

depilado (fig. 4.32) com máquina elétrica de corte de pelos para a produção de duas feridas cutâneas excisionais, criadas através do pressionamento da pele da região dorsal com um furador circular tipo *punch* de biópsia (diâmetro de 0,5cm e área de 0,196cm² (fig. 4.33 e fig. 4.34). Os animais foram previamente divididos em dois grupos: grupo sem cobertura e grupo com cobertura. A anestesia utilizada foi 80mg/Kg de cetamina e 10 mg/Kg de xilazina. Foram usados 2 grupos e 5 camundongos, num total de 10 camundongos. Testes anteriores indicaram que houve um pequeno desvio padrão nas variáveis estudadas, por isto o valor de n igual a 5 apresenta boa confiabilidade.



Figura 4.31: Aplicação de anestesia no camundongo.



Figura 4.32: Preparação da pele do dorso do camundongo.



Figura 4.33: Excisão da pele com *punch*.



Figura 4.34: Feridas prontas para serem cobertas.

Cinco animais tiveram recobertas as feridas do lado direito (5 feridas) com poliuretano sem graft ou qualquer outro tipo de tratamento (fig. 4.35 e fig. 4.36). As feridas do lado esquerdo (cinco feridas) foram recobertas com poliuretano graftizado com P-N-IPAAm. Um grupo de cinco animais sem cobertura (10 feridas) foi usado como controle.

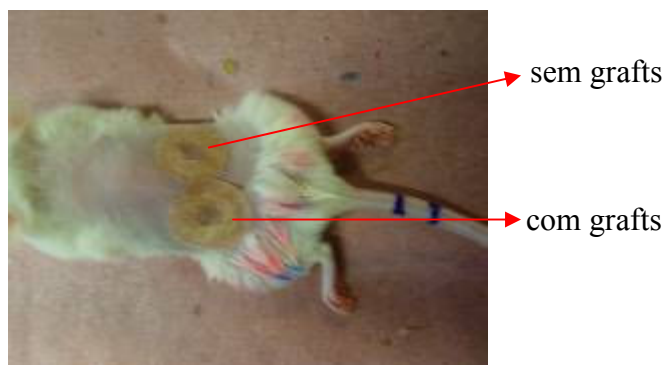


Figura 4.35: Feridas recobertas com curativos



Figura 4.36: Reforço para assegurar a montagem do conjunto.

Após a retirada dos curativos, as feridas foram avaliadas, medidas (antes e durante o processo de cicatrização) (fig. 4.37) e fotografadas. A avaliação do fechamento da ferida foi realizada com paquímetro e as medidas foram tomadas observando-se o maior e menor diâmetro.



Figura 4.37: Medidas das feridas..

A área foi calculada pela equação (4.1) ⁷:

$$A = \pi R.r \quad (4.1)$$

Onde r é o raio menor e R é o raio maior, medidos em uma mesma ferida.

O cálculo do fechamento da ferida foi feito pela equação (4.2) ⁷

$$M \pm DP = (A_0 - A_1) / A_0 \quad (4.2)$$

Onde A_0 é a área inicial da ferida e A_1 é a área da ferida no dia da observação. M é a média e DP é o desvio padrão.

As observações consistiram primordialmente de anotar os aspectos de coloração, aderência, presença de infecção, presença de tecido de granulação e teve como fatores preponderantes os seguintes tópicos:

- Observar o arraste de tecido na retirada do curativo.
- Testar e observar mecanismo *on-off*.

Testou-se e observou-se o mecanismo *on-off* através da verificação da mudança de aderência do curativo à ferida. Para isto, primeiramente mediu-se a temperatura diretamente sobre a superfície do curativo, utilizando-se um termômetro a laser como indica a figura 4.38, em seguida retirou-se os curativos com temperatura da pele acima de 32°C (fig. 4.39) e observou-se a aderência do material em contato com a ferida. (fig. 4.40- 4.41).



Figura 4.38: Termômetro à laser para leitura da temperatura da pele.



Figura 4.39: Leitura de temperatura sobre o curativo.



Figura 4.40: Retirada do curativo.

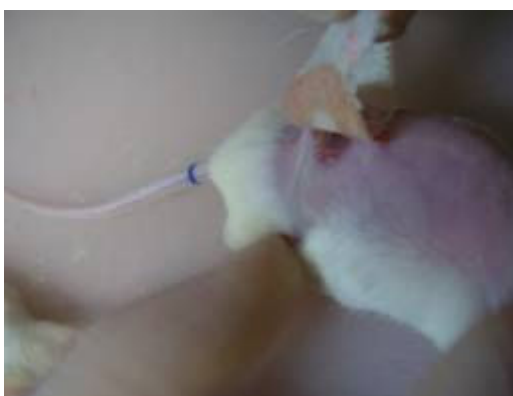


Figura 4.41: Retirada do curativo

Após as observações do mecanismo *on-off* e os animais serem sacrificados, iniciou-se a retirada de amostra da pele retirando-se os tecidos com uma tesoura cirúrgica (fig. 4.42 e fig. 4.43) e o seccionamento da lesão foi feita incluindo área de lesão e área da borda da lesão com tecido normal com auxílio de um punch (8mm) com diâmetro maior que o utilizado para a produção das lesões. (fig. 4.44).



Figura 4.42: Retirada do tecido região das feridas dorso do camundongo.

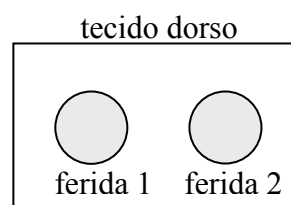


Figura 4.43: Vista das feridas lado interno da pele.e a direita esquema representativo.

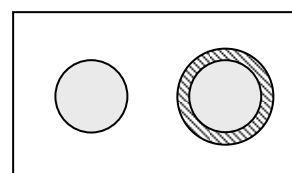


Figura 4.44: Seccionamento com punch , para análises histológicas
8 mm tecido da ferida e 3 mm da borda da ferida

Posteriormente fez-se o corte transversal do tecido (fig. 4.45) e acondicionamento em formalina tamponada (formaldeído a 37-40% 100ml, água destilada 900ml, fosfato de sódio monobásico 4g, fosfato de sódio dibásico (anidro) 6,5g) por 24 horas, (fig.4.46), posteriormente o material foi processado para inclusão em parafina e emblocado. Os blocos foram submetidos à microtomia ($5\mu\text{m}$) e as lâminas montadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E).



Figura 4.45: Preparação para fixação. (A) Feridas sendo seccionadas
(B) Seccionamento do tecido em corte transversal para análises histológicas
C) Esquema representando o corte.



Figura 4.46: Acondicionamento do tecido em formalina (A)
Esquema representativo do corte do tecido a ser embutido e
microtomizado para análises histológicas (B).

Capítulo 5 - Resultados e Discussão

5.1 - Ângulo de Contato.

As medidas do ângulo de contato indicam alterações da superfície do material. Analisando-se os resultados da tabela 5.1, nota-se que o poliuretano puro possui um ângulo de contato de 45° e que todos os tratamentos realizados alteraram a sua superfície. Vale destacar que o melhor tratamento para formação de hidroperóxidos à superfície do poliuretano foi o ataque com luz ultravioleta, que gerou um ângulo de contato de 32° . Tal resultado indica que este tratamento poderia gerar uma densidade de hidroperóxidos por área maior e, conseqüentemente, uma maior densidade de moléculas grafizadas em sua superfície.

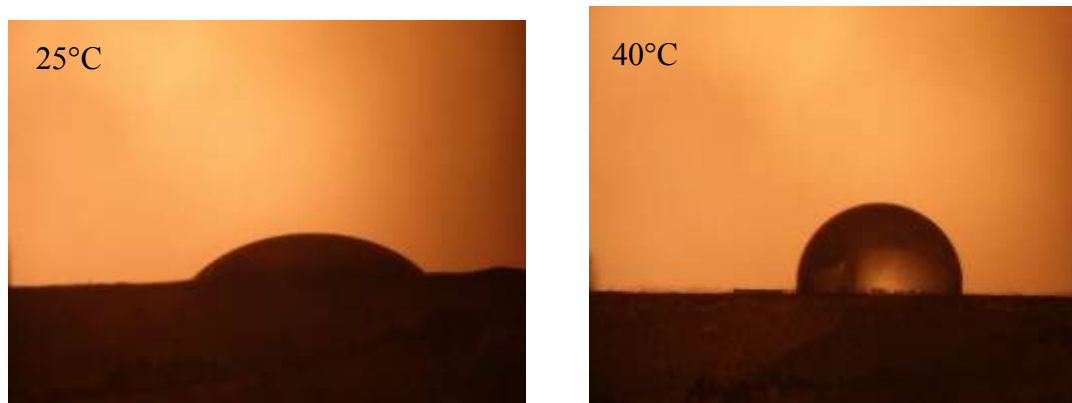


Figura 5.1: Molhabilidade de uma gota de água deionizada sobre a superfície do PU graftizado com P-N-IPAAm

A figura 5.1 são fotos de gotas de água deionizada que estão sobre a superfície do poliuretano enxertado com P-N-IPAAm em duas situações a 25 e 40°C. Nota-se que a 25°C a água molha muito mais a superfície do polímero, o que indica que o estado da superfície é mais hidrófilo e a 40°C a molhabilidade é inferior, o que indica um estado hidrofóbico, os ângulos de medida podem ser verificados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Ângulo de contato entre água deionizada e material.

Filme de poliuretano	Ângulo de contato
Sem tratamento (25°C)	45° (± 2°)
Tratamento Ultra Violeta (25°C)	32° (± 2°)
Tratamento Corona ao ambiente (25°C)	42° (± 2°)
Tratamento Corona atmosfera controlada e rarefeita (25°C)	38° (± 2°)
PU com grafts P-N-IPAAM (25°C)	28° (± 2°)
PU com grafts P-N-IPAAM (40°C)	74° (± 2°)

As mudanças do ângulo de contato com o tratamento corona em poliuretano foram bem menos expressivos do que o tratamento por radiação ultravioleta, o que indica que o tratamento UV foi mais eficiente na formação de grupos reativos na superfície do PU. A figura 5.2 representa o efeito da luz UV na superfície do material polimérico, na formação de hidroxilas, carbonila e epoxies. Cada novo grupo formado é consequência da oxidação da superfície do poliuretano, na presença de radiação que é a fonte energética destas reações.

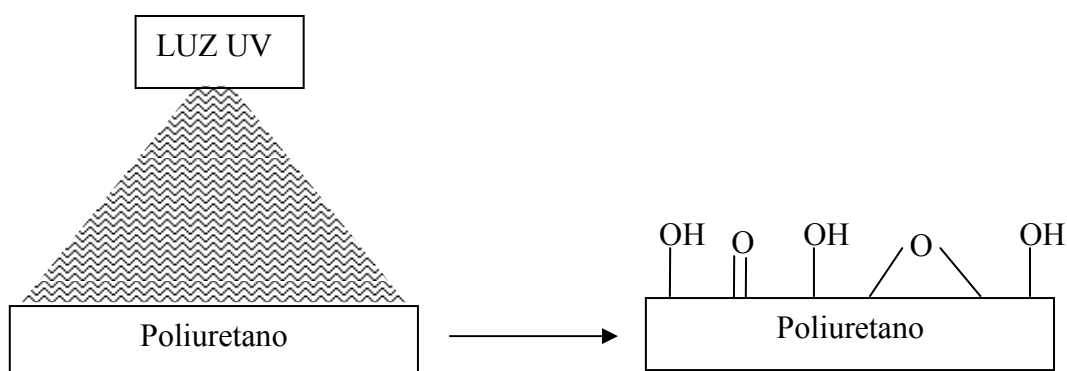


Figura 5.2: Esquema representativo da formação de grupos hidroxilas, carbonila e epoxies, quando da exposição de PU à radiação UV

Os resultados de ângulo de contato dos filmes graftizados se referem à graftização usando-se o tratamento por ultravioleta. As medidas demonstram claramente o comportamento da superfície abaixo e acima da transição LCST ($T=32^{\circ}\text{C}$) resultando um ângulo de 28° na temperatura abaixo de 32°C e o ângulo de 74° para temperatura acima de 32°C . Mostrando assim uma forte alteração do ângulo de contato, quando este material ultrapassa a LCST do P-N-IPAAm, o que indica variação do comportamento hidrofílico para hidrofóbico. O estado hidrofóbico da superfície do PU graftizado, pode favorecer a adesão de proteínas insolúveis ou que tenha baixa solubilidade em água.

5.1 – Ganho de massa – graftização.

A figura 5.3 representa a graftização tipo *graftization from* da poliacrilamida na superfície de um polímero, utilizando nitrato cérico amoniacal como catalisador, onde o iniciador tem papel fundamental em formar o radical nos grupos hidroxilas e possibilitar a formação dos enxertos, a formação do homopolímero ocorre em paralelo, este é separado depois por lavagem do filme enxertado.

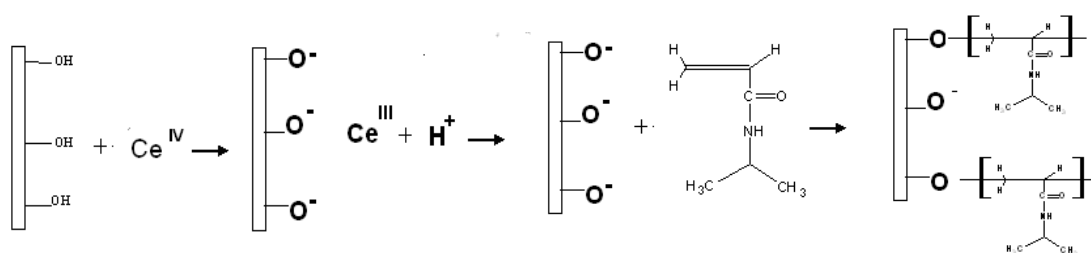


Figura 5.3: Esquema representativo da graftização poli-N-Isopropilacrilamida superfície de poliuretano

Pela tabela 5.2 pode se observar que o tratamento ultravioleta foi muito mais eficiente que o tratamento corona e que o ganho de massa superior dos filmes com poros, foi devido ao aumento da área superficial específica do material.

Tabela 5.2 – Ganho de massa após graftização.

Tipo de pré tratamento do filme	Ganho de massa após a graftização ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Controle	0,0
Tratamento corona Atmosfera rarefeita de argônio (10torr) Distância eletrodos 5 mm (25KV e 3mA) Tempo: 20s	0,3
Tratamento Ultravioleta Filme sem poros Distância do filme 5 cm e tempo 4 horas.	3
Tratamento Ultravioleta Filme com poros Distância do filme 5 cm e tempo 4 horas	6

Se compararmos este resultado com os resultados do ângulo de contato (tabela 5.1) nota-se que os resultados com o tratamento corona e ultravioleta estão coerentes com os resultados de ganho de massa após graftização.

Observa-se também que no grupo controle, ou seja, poliuretano sem nenhum tratamento, não houve nenhum ganho de massa e graftização.

5.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A figura da figura 5.4 é uma eletro micrografia da amostra de poliuretano sem graftização

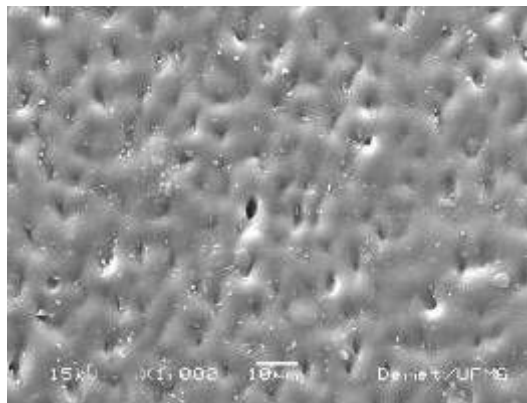


Figura 5.4: Eletro micrografia do poliuretano sem graftização.
Vista da superfície natural

A figura 5.5 mostra a eletro micrografia da superfície de uma amostra de poliuretano graftizado com poli (N-isopropilacrilamida) (P-N-IPAAM), após tratamento corona. Nota-se a presença dos poros na superfície do poliuretano, indicando que a camada de material graftizado é bem delgada. Não foi possível medir a camada graftizada, que se mostrou com uma dimensão incapaz de ser resolvida pela microscopia eletrônica de varredura.

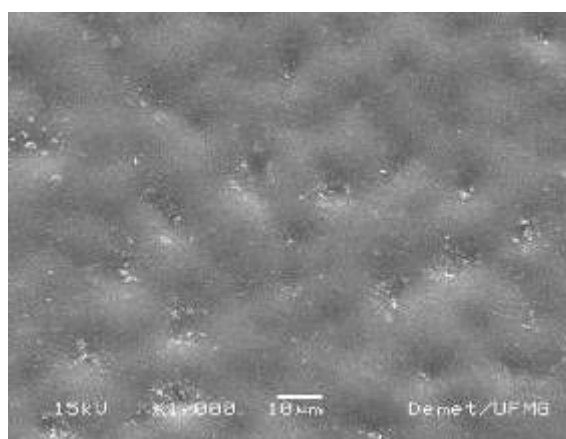


Figura 5.5: Eletro micrografia do PU graftizado após tratamento corona.
Vista da superfície natural

A figura 5.6 é uma eletro micrografia que mostra a superfície de um filme após graftização de poliuretano tratado por luz ultravioleta.

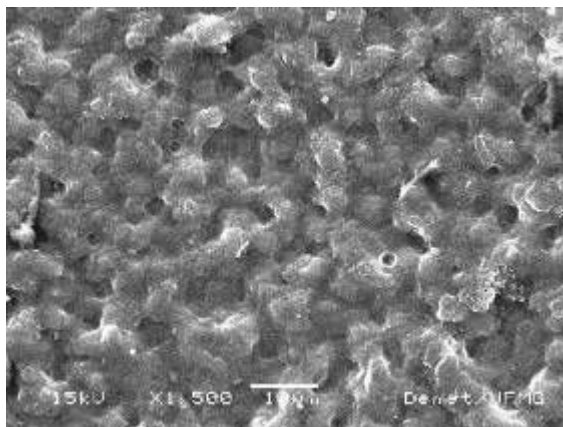


Figura 5.6: Eletro micrografia do poliuretano graftizado com P-N- IPAAm. Após tratamento UV – Vista da superfície natural

A figura 5.7 é a eletro micrografia que mostra a superfície da seção do filme fraturado. Nota-se que não há presença de poros no interior do filme. O processo de espalmagem gera este tipo de estrutura, deixando poucos poros restritos geralmente à superfície do filme. Observa-se também um filme fino na superfície, melhor visualizado na figura 5.8.

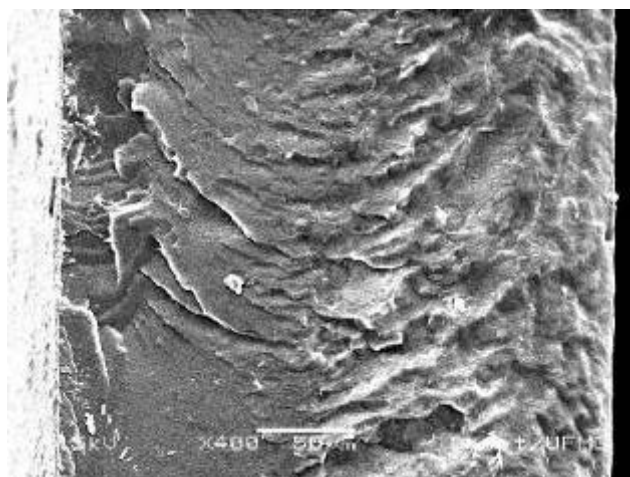


Figura 5.7: Eletro micrografia do poliuretano graftizado com P-N-IPAAm. Após tratamento UV – Vista da superfície de fratura

A figura 5.8 é a eletro micrografia que revela corte transversal do filme da figura 5.6 em diferentes aumentos. A camada de polímero modificada através do tratamento e UV e de graftização foi medida com um aumento de 7500x, e registrou uma espessura de $1,8\mu\text{m}$.

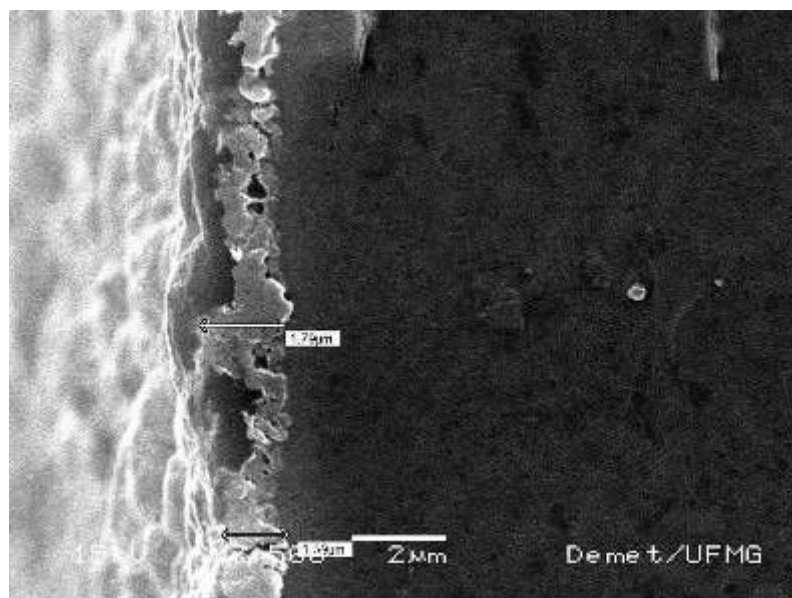


Figura 5.8: Eletro micrografia do poliuretano graftizado com P-N-IPAAm. Após tratamento UV - Vista da superfície de fratura - 7500x

A figura 5.9 é a eletro micrografia que revela a superfície de uma amostra de poliuretano poroso, preparado através da introdução de cloreto de lítio e posterior extração. O objetivo do incremento na porosidade foi o de proporcionar uma maior adesão e maior permeabilidade do filme ao vapor d'água e ao oxigênio, visando a aplicação como curativo.

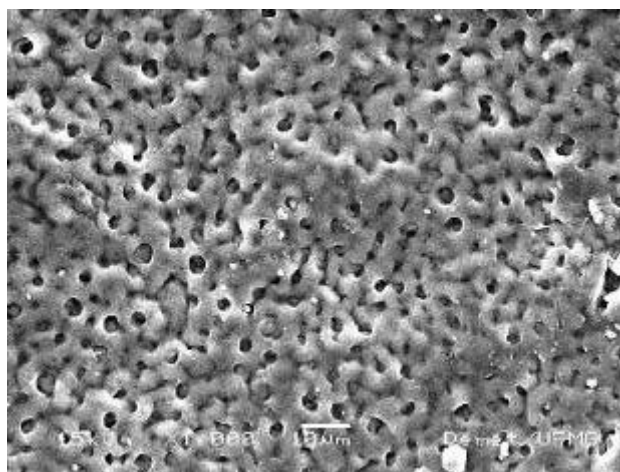


Figura 5.9: Eletro micrografia do poliuretano poroso sem *grafts*
Vista da superfície natural

Pode-se observar o aumento de porosidade do filme pelo aspecto da superfície quando comparada à exibida na figura 5.4 (filme produzido sem cloreto de lítio). O cloreto de lítio foi retirado do filme, após a sua obtenção, por limpeza em água, o que é relativamente fácil, pois o cloreto de lítio é extremamente solúvel em água.

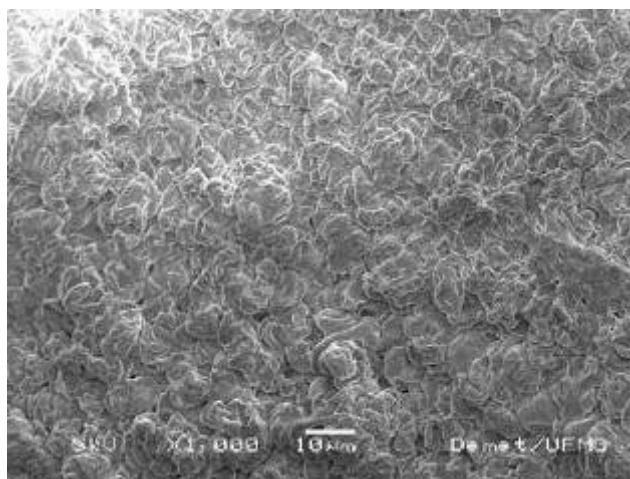


Figura 5.10: Eletro micrografia do poliuretano poroso com *grafts*.
Após tratamento UV – Vista da superfície natural

A figura 5.10 é a eletro micrografia que mostra a superfície da amostra da figura 5.9 após graftização com P-N-IPAAm, através de tratamento com luz ultravioleta. Nota-se

nitidamente o aspecto diferente da superfície, com total desaparecimento dos poros e com a formação de escamas, o que indica que a camada graftizada é espessa.

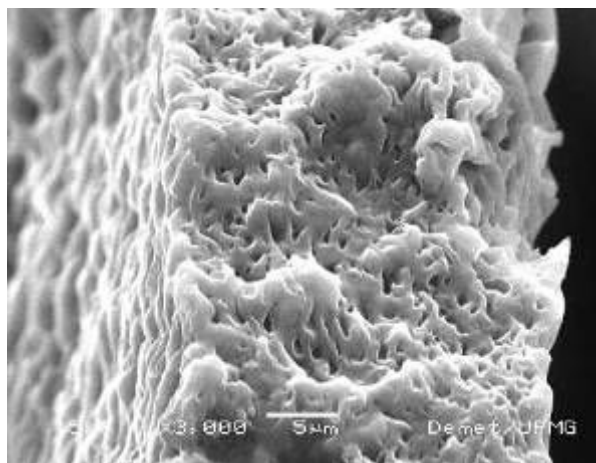


Figura 5.11: Eletro micrografia do poliuretano poroso sem graft.
Vista da superfície fraturada

A figura 5.11 é a eletro micrografia que diz respeito à amostra da figura 5.9 (superfície da secção fraturada). Nota-se que os poros são uniformes e distribuídos por toda a espessura do filme, o que é interessante, pois aumentará a permeabilidade do material. Estes poros têm em média o de diâmetro 5 μm.

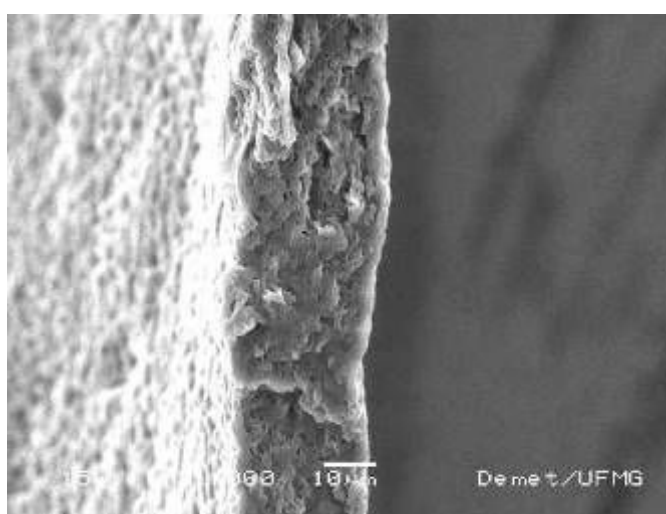


Figura 5.12: Eletro micrografia do poliuretano poroso com graft.
Vista da superfície fraturada

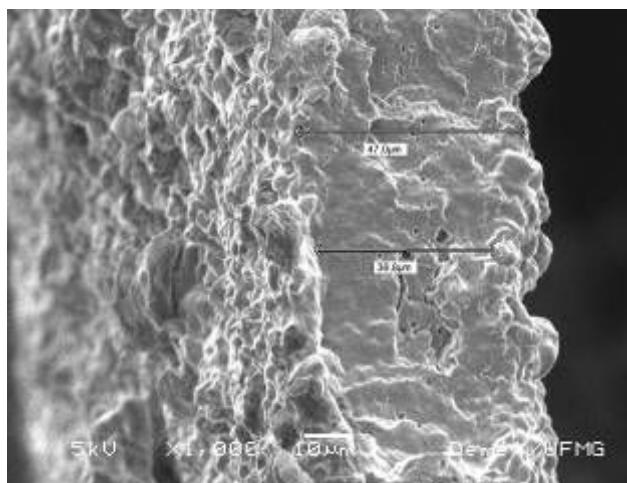


Figura 5.13: Eletro micrografia do poliuretano poroso graftizado. Após tratamento UV – Vista da superfície fraturada

As figuras 5.12 e 5.13 são eletro micrografias da superfície fraturada do PU poroso graftizado após tratamento UV. Pode-se perceber que os poros do poliuretano foram parcialmente ocupados pelo P-N-IPAAm, indicando que há uma boa penetração do material nos poros, dificultando até a medida da espessura da camada da superfície modificada que foi estimada em $5\mu\text{m}$.

5.4 - Transição LCST

A temperatura de transição do P-N-IPAAm graftizado sobre a superfície do poliuretano foi medida observando-se a mudança de transparência do filme, conforme esquema representativo da figura 4.32. O efeito visual da transição de temperatura pode ser observado nas figuras 5.14 e 5.15 que retratam o filme de PU graftizado submetido às temperaturas abaixo e acima de 32°C . Nota-se que abaixo de 32°C o filme está mais transparente, pois as moléculas do P-N-IPAAm graftizado estão absorvendo água (higroscópico) e sofrem um inchamento proporcionando transparência ao conjunto.

Alguns trabalhos utilizam teste de absorção na espectroscopia UV-Vis. para medida da LCST, que é um método bastante preciso^{83, 127}. No caso deste trabalho, a opacidade do filme devido à elevada espessura da camada graftizada (8 a $10\mu\text{m}$ de espessura) não permitiu a leitura, através de espectrofotômetro. A leitura foi feita por observação

visual.



Figura 5.14: Poliuretano graftizado com P-N-IPAAm. T= 31,7°C.



Figura 5.15: Poliuretano graftizado com P-N-IPAAm T= 32,2°C.

Na figura 5.13, o filme submetido a temperaturas superiores a 32°C se mostra mais opaco, pois as moléculas graftizadas não absorvem água (hidrofóbico) e entraram em colapso (mas ainda permanecem graftizadas a superfície) e com isto ficam mais agrupadas restringindo a transmissão de luz (maior espalhamento).

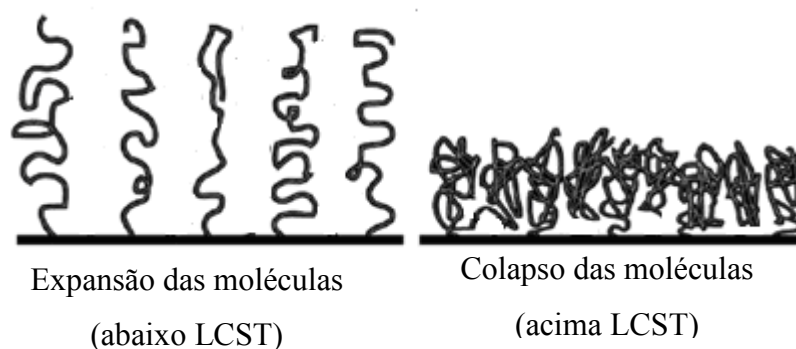


Figura 5.16. Esquema representativo do estado das moléculas

Tendo em vista os possíveis erros de medida de temperatura, pode-se considerar que a LCST do filme graftizado seria em torno de 32°C. Este fenômeno é totalmente reversível e ocorre muito rapidamente.

Cole et al ⁸² fizeram uma revisão ampla sobre este assunto e apontam que não há valores exatos para medida de LCST de polímeros graftizados e sim uma faixa de transição. Os autores indicam que o valor da LCST só é preciso quando se trata de polímeros não graftizados. Eles sugerem também que o LCST pode ter relação com o tamanho, a arquitetura, espessura e densidade dos grafts e que há poucos trabalhos que esclarecem isto.

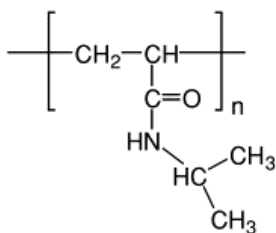
Annaka et al ¹²⁶ apresentaram resultados utilizando micro balança de quartzo para medir a transição LCST para P-N-IPAAm graftizado, em superfície de quartzo, na espessura de 50nm e obtiveram uma variação contínua nos valores, com início de transição em torno de 15°C e final de transição em 50°C. Os autores sugerem que o comprimento dos grafts, assim como o índice de polidispersão desses mesmos grafts e a densidade de grafts sobre a superfície, tem forte influência nos resultados.

O trabalho de Curtia et al ⁷⁸ obtém resultados mais estreitos a respeito da LCST de P-N-IPAAm graftizado na superfície de PET (camada de 30µm de espessura), utilizando ângulo de contato para medir a transição LCST. O resultado aponta o início da transição em torno de 30°C e com término em 35°C. Este resultado se aproxima mais do resultado obtido nesta tese, provavelmente devido à grande espessura da camada

graftizada. Este fato possibilita que o P-N-IPAAm tenha uma densidade elevada de moléculas levando a um comportamento semelhante ao polímero puro não graftizado.

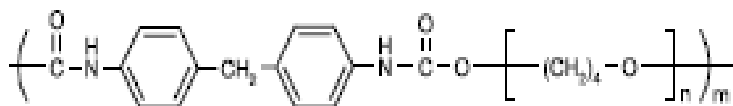
5.5 - Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

Na obtenção dos espectros na região do infravermelho, utilizou-se a técnica ATR (reflexão total atenuada). Este tipo de análise é restrita a superfície do material, sendo útil para investigar as modificações efetuadas no poliuretano.



Banda (cm ⁻¹)	Característica
1604	N-H vibração amida II
1446	C-N estiramento
1650	Estiramento carbonila
1540	N-H Estiramento amida I

Figura 5.17 - Esquema representativo da estrutura química do poli-N-isopropilacrilamida e bandas típicas do espectro infravermelho.



Banda (cm ⁻¹)	Característica
1538	Amida II - deformação - d NH
1724	Amida I - estiramento C=O
3330	Estiramento NH.

Figura 5.18 - Esquema representativo da estrutura química do poliuretano e bandas típicas do espectro infravermelho.

As figuras 5.17 e 5.18 apresentam as principais bandas do espectro infravermelho do P-N-IPAAm e do Poliuretano.

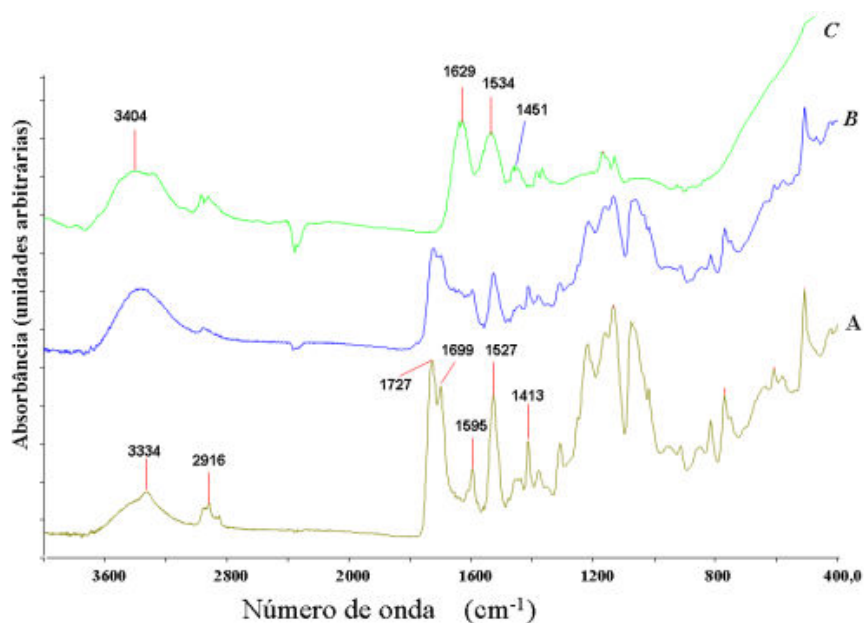


Figura 5.19: Espectros na região do infravermelho de filmes: PU puro sem grafts (A), PU tratado com UV (B), PU graftizado com P-N-IPAAm (C)

A figura 5.19 mostra três espectros: poliuretano puro, poliuretano que foi tratado com radiação ultravioleta e poliuretano que possui moléculas de P-N-IPAAm graftizadas em sua superfície com pré-tratamento com radiação ultravioleta. A principal diferença entre os espectros está na banda à 1639cm^{-1} que é relativo ao grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) (estiramento) pertencente ao grupo amida (CONH) do P-N-IPAAm. A banda em 3334cm^{-1} para o poliuretano puro é relacionada à funcionalidade NH do grupo uretânico e hidroxila. Esta mesma região está mais larga no espectro do poliuretano que sofreu tratamento com radiação ultravioleta (espectro B), provavelmente devido à formação de hidroperóxidos resultantes do ataque por radiação.

As bandas que aparecem em 1727 (amida I - $\text{C}=\text{O}$ estiramento - n) associada aos grupos carbonila da ligação uretânica no espectro do poliuretano puro desaparecem no espectro de poliuretano graftizado com P-N-IPAAm, como resultado da presença das cadeias enxertadas do P-N-IPAAm que atenuam o feixe de infravermelho. Nota-se também que a banda à 1727cm^{-1} relativa aos grupos carbonila sofreram alteração, como conseqüência da oxidação da superfície gerada pela atuação da radiação ultravioleta.

A banda em 3400 cm^{-1} do espectro C possivelmente devido aos grupos OH da água, pois a superfície graftizada é altamente higroscópica.

A figura 5.20 diz respeito a espectros na região do infravermelho relacionados ao tratamento utilizando o efeito corona nos filmes de PU. Nota-se que o poliuretano graftizado teve alterações no espectro semelhantes ao poliuretano graftizado da figura 5.14, com notável aparecimento da banda em 1639 cm^{-1} relacionado à carbonila (C=O) do grupo amida do P-N-IPAAm (estiramento) e alargamento da banda em 3300 cm^{-1} relacionado aos grupos hidroxilas da água

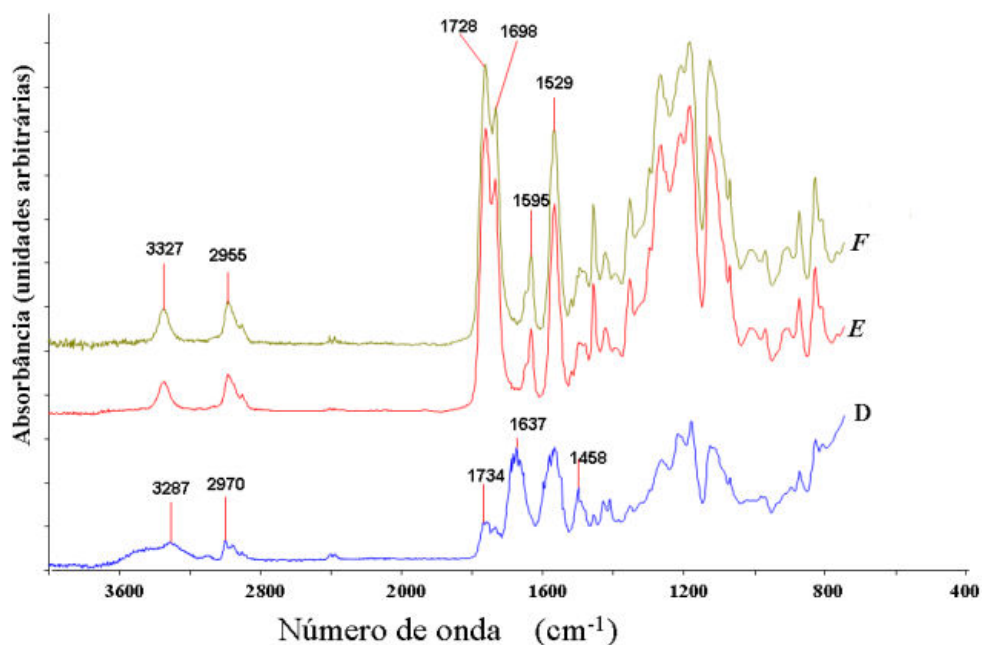


Figura 5.20: Espectros na região do infravermelho de PU tratado corona e graftizado com P-N-IPAAm (D), PU purificado (F) e PU sem grafts (E).

Nota-se que o espectro do poliuretano purificado no extrator Soxhlet é idêntico ao poliuretano sem graft tratado com corona, o que indica que o grau de alteração na superfície (oxidação) foi menor que aquele obtido pelo tratamento UV.

As análises indicam que a graftização ocorreu tanto no tratamento com radiação ultravioleta como no tratamento corona. Nota-se também que o espectro D da figura 5.20 indica que o tratamento corona graftizou uma camada bem delgada de P-N-IPAAm, pois ainda apresenta sinais da banda do espectro do PU a 1727 cm^{-1} diferente

da figura 5.19, onde o espectro C (PU graftizado com UV), não apresenta banda a 1700 cm^{-1} .

5.6 - Testes de adesão com deposição de albumina

O teste *on-off* de adesão de albumina foi realizado em duas condições, acima de $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando o poliuretano graftizado está hidrofóbico e abaixo de $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando este está em condições hidrofílicas. O material que foi utilizado nas duas condições foi o mesmo, ou seja, poliuretano poroso modificado com UV e graftizado com P-N-IPAAm.

O resultado apresentado na figura 5.21 indica que a proteína (albumina) adere melhor à superfície em que foi depositada na condição em que o poliuretano está em condição hidrofóbica, chegando a atingir em média 3,5% do peso inicial do filme. Ao se lavar o filme de poliuretano graftizado em água destilada abaixo da temperatura LCST houve a perda, em parte, de aderência da proteína, chegando a ficar retido ainda 0,5% de proteína. Isto acontece porque quando a superfície do poliuretano passa para a condição hidrofílica as moléculas de proteínas, que estão imobilizadas apenas por interações secundárias perdem a adesão. Provavelmente por que quando os *grafts* da superfície do poliuretano se expandem acontece uma diminuição dos pontos de interações secundárias realizadas anteriormente. Em paralelo os *grafts* absorvem uma grande quantidade de moléculas de água, ou seja, há uma grande competição entre água e albumina, e, logicamente, a superfície hidrofílica prefere se ligar às moléculas de água.

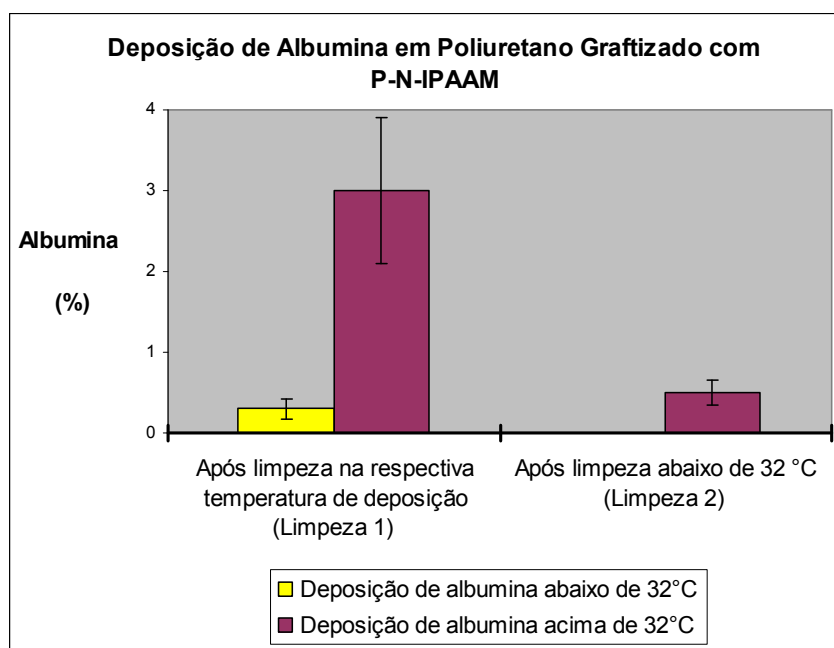


Figura 5.21: Gráfico indicando deposição e adesão de albumina em poliuretano graftizado com P-N-IPAAM.

Isto significa que o mecanismo *on-off* para albumina, em água, foi efetivo. Alguns autores, trabalhando com albumina bovina chegaram a conclusões similares^{83, 87}

O resultado indica também que há uma baixa adesão de proteínas nas condições em que a superfície do poliuretano estaria em uma condição higroscópica (abaixo de LCST), significando que a extensão das cadeias de P-N-IPAAM restringe a penetração das moléculas de proteína.

**Deposição de albumina em
temperatura maior que LCST**

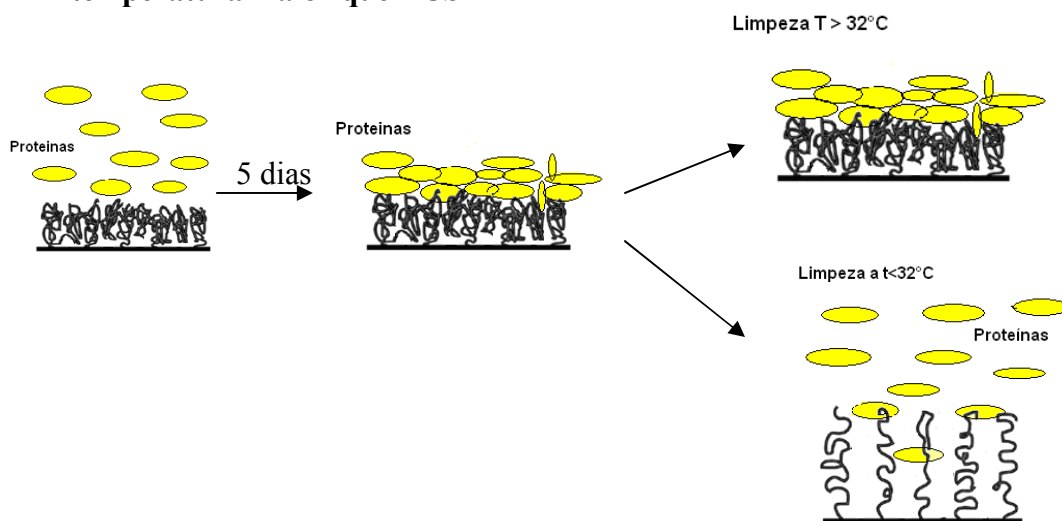


Figura 5.22: Esquema representativo da deposição de albumina, sobre a superfície de poliuretano com grafts de P-N-IPAAm.

5. 7 - Testes *in vivo*

5. 7.1 - Implantes

Os polímeros usados como implantes nos ensaios *in vivo* foram o poliuretano sem graftização, recortado em retângulos de 1,0 x 1,5cm, e o P-N-IPAAm puro, com aproximadamente 0,3mm de altura e 0,5mm de diâmetro. Cada polímero foi implantado sub-cutaneamente na região dorsal de camundongos Swiss e lá permaneceram durante 7 dias. Após esse período os animais foram sacrificados, os implantes retirados e processados rotineiramente para inclusão em parafina. As lâminas histológicas foram preparadas com cortes de tecido a 5 μ m e coradas com hematoxilina-eosina (H&E).

Nos implantes de poliuretano sem graftização observou-se o desenvolvimento de uma cápsula envolvendo todo o implante. Essa cápsula era constituída por tecido conjuntivo mais frouxo (fibras finas e separadas), tecido adiposo, células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) e vasos sanguíneos (Fig. 5.23).

Nos implantes de P-N-IPAAm puro, foram observados tecido conjuntivo com fibras mais espessas e maduras (mais denso) e maior vascularização indicando um processo de reparo mais adiantado (Fig. 5.24). Também havia presença de tecido adiposo, células inflamatórias. Não houve infiltração celular na matriz de nenhum dos implantes e seus poros não foram visíveis pela microscopia óptica até 60X.

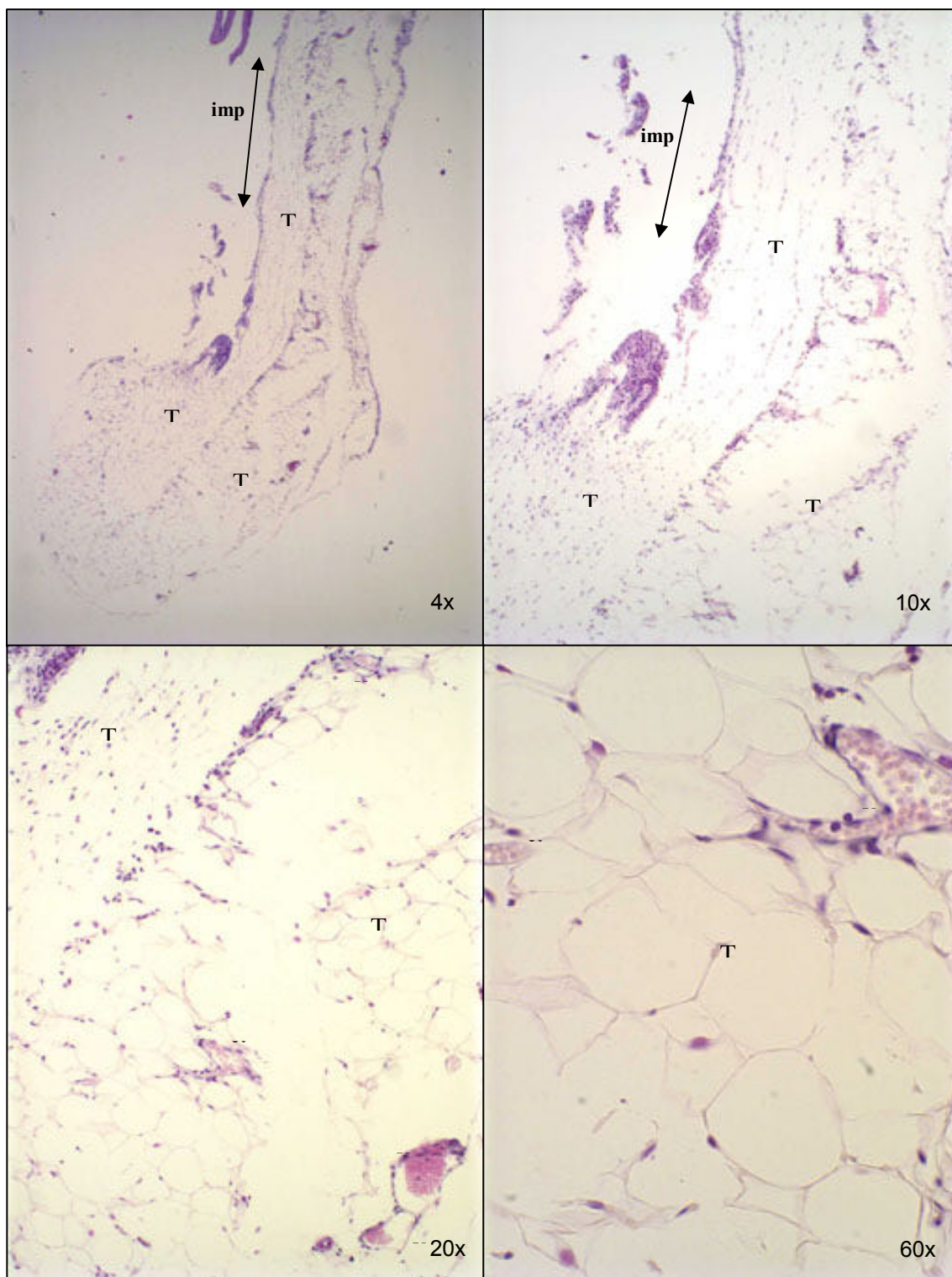


Figura 5.23 – Cortes histológicos de implante de poliuretano sem grafização com 7 dias. A seta, com duas pontas, mostra a região do implante (imp). TC- tecido conjuntivo apresentando fibras finas e frouxas; TA- tecido adiposo; v- vasos sanguíneos. B, C e D representam diferentes aumentos de A. Coloração H&E.

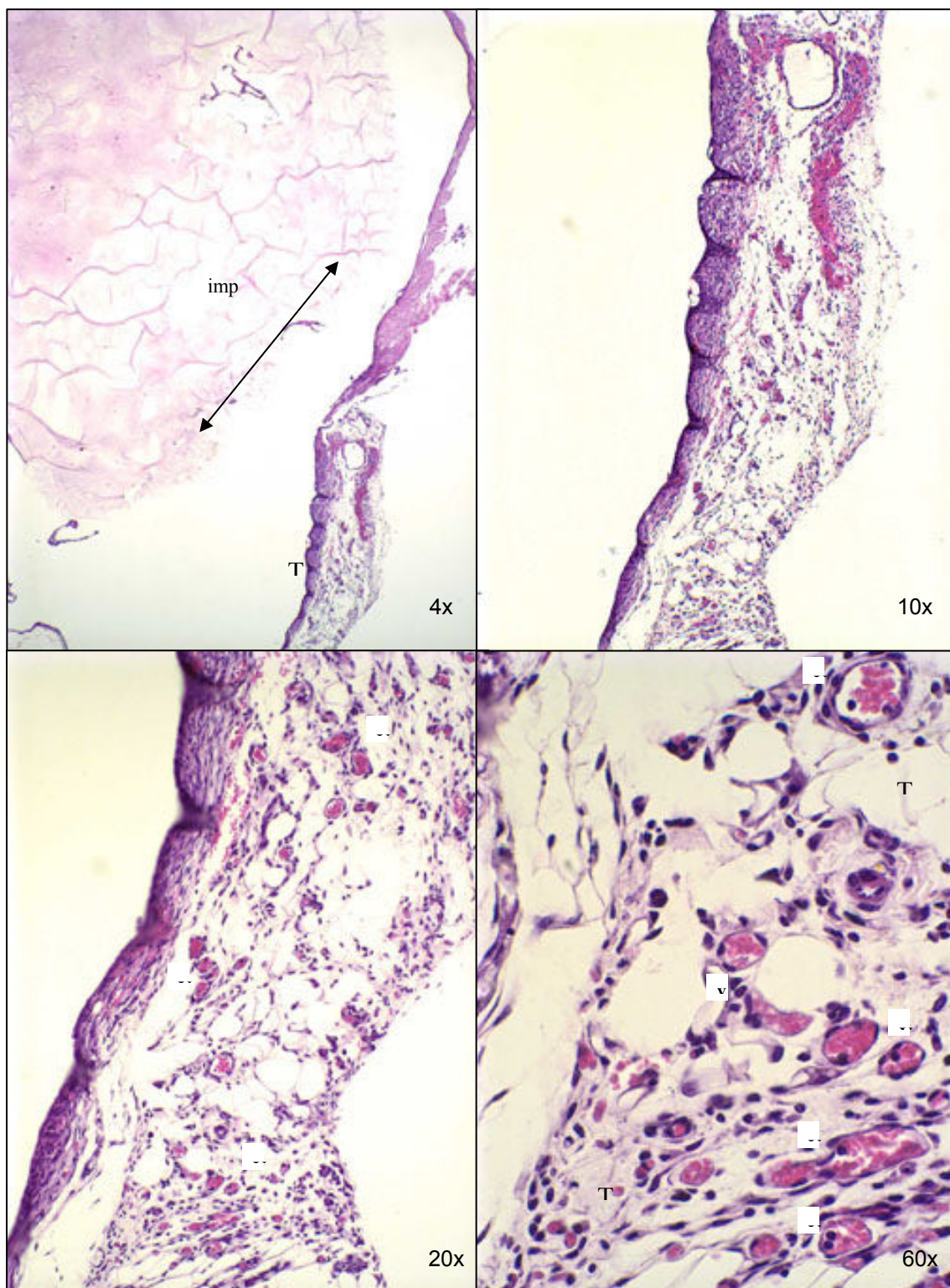


Figura 5.24 – Cortes histológicos de implantes de P-N-IPAAM com 7 dias. A seta, com duas pontas, mostra a região do implante (imp). TC- tecido conjuntivo apresentando fibras mais espessas e densas; TA- tecido adiposo; v- vasos sanguíneos em grande quantidade. B, C e D representam diferentes aumentos de A. Coloração H&E.

Analisando os achados dos implantes de poliuretano e P-N-IPAAm em termos de desenvolvimento e amadurecimento do tecido até sete dias de implantação, observa-se que o processo de reparo no P-N-IPAAm está mais adiantado. A temperatura corporal normal do camundongo varia de 35,2 a 37,9 °C, isto significa que o implante de P-N-IPAAm estava em um ambiente com temperatura acima da LCST cujo valor é de 32°C, isso contribui para um estado hidrofóbico do polímero. É sabido que esse estado favorece a adesão de proteínas e células ^{11, 12, 28, 29, 30}. Isso, aliado a um baixo grau de toxicidade em relação ao poliuretano provavelmente tenha contribuído para um amadurecimento do tecido conjuntivo e o crescimento de vasos gerando um processo mais avançado em torno do P-N-IPAAm.

5.7.2 – Avaliação da cicatrização da ferida cutânea.

A figura 5.25 representa a avaliação do fechamento das fêrias (determinado através da equação 4.4) que estão apresentadas na figura 5.27.

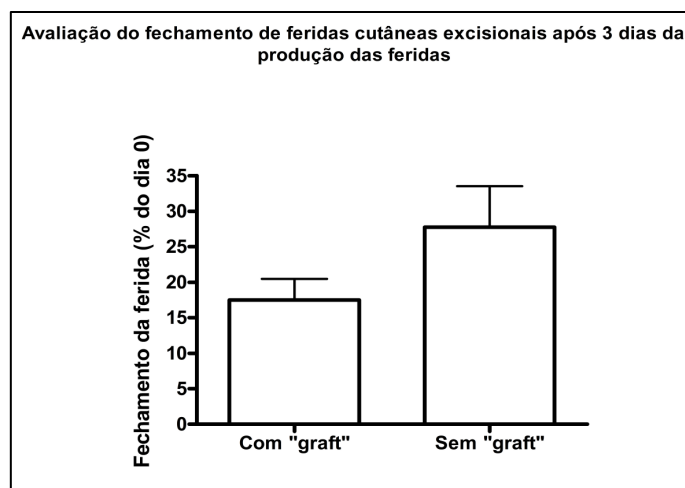


Figura 5.25: Grau de contração das feridas sem e com cobertura

Observando-se o gráfico verifica-se que os valores do grau de contração estão bem próximos e não existe diferença estatística entre feridas cobertas com ou sem *graft*

Na figura 5.26 têm-se as feridas que receberam coberturas. As fotos do lado C também foram realizadas imediatamente após a indução da ferida, enquanto as fotos do lado D são feridas que receberam cobertura durante 3 dias de cicatrização. As feridas com a legenda A receberam cobertura com poliuretano poroso graftizado com P-N-IPAAm e as fotos com legenda B receberam poliuretano poroso sem graftização. A idéia de se colocar um grupo controle (B) ao lado do grupo em análise (A) foi para eliminar a variação de resultados de animal para animal.

Estas feridas até o terceiro dia ainda estão em processo de auto limpeza e inflamação, e iniciando o processo de reparo e proliferação^{1, 2, 3, 4, 35, 38}, portanto ainda não se verifica a presença acentuada de novas células e de tecido neoformado. Mesmo assim tiveram fechamento em torno de 20%, provavelmente devido em parte ao início do reparo e em

parte devido às tensões centrípetas que são comuns nas feridas abertas^{5, 7} e que ainda permanece em feridas fechadas.

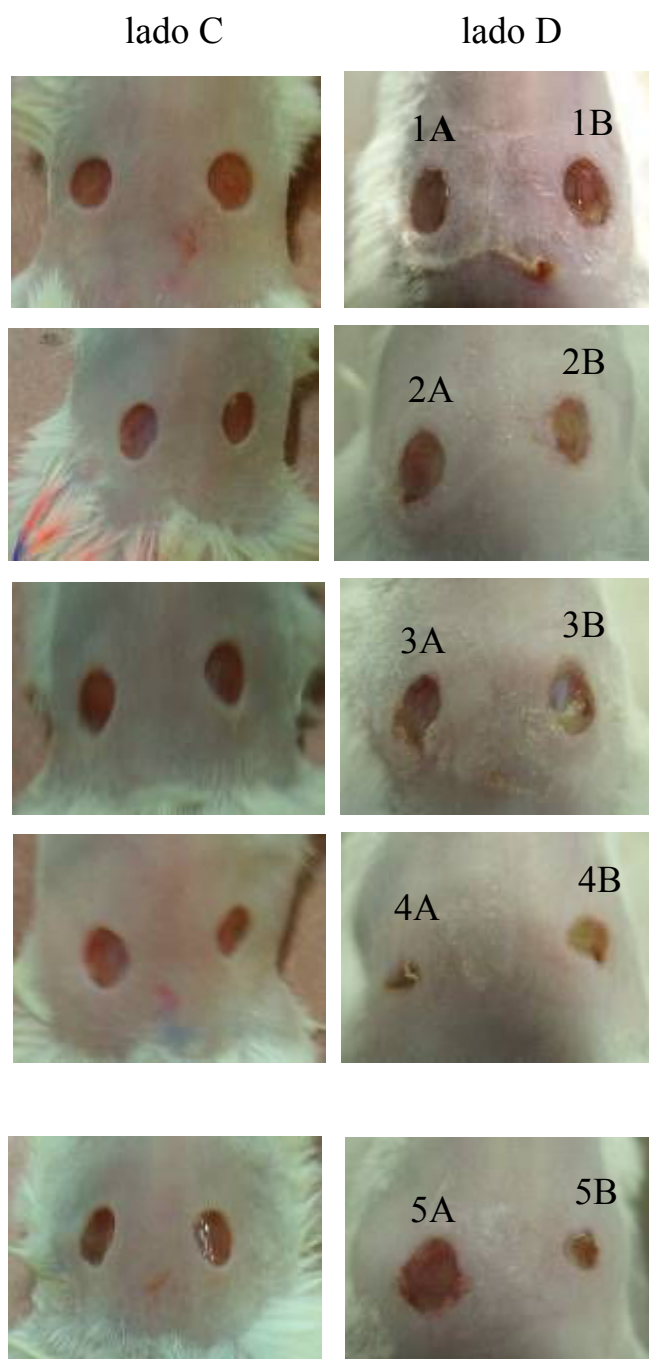


Figura 5.26: Feridas excisionais em camundongos
Fotos lado C feridas recentes.
Fotos lado D feridas após 3 dias de cicatrização
(Feridas com cobertura)

5. 7. 3 – Teste do mecanismo *on-off*



Figura 5.27: Testes *on-off* para verificação de aderência do tecido na superfície dos materiais.

Os testes *on-off* realizados diretamente na ferida foram feitos e registrado como na figura 5.27. O teste era simplesmente verificar a aderência acima da LCST e a não aderência abaixo da LCST. O resultado indicou que todos os curativos colocados nos camundongos não apresentaram aderência. Analisando as condições no momento da retirada dos curativos, notou-se que havia uma incerteza da temperatura da pele do camundongo, pois após a anestesia houve hipotermia no camundongo e conseqüentemente houve queda temperatura da pele, registrada em 28°C que é abaixo da LCST (32°C). Portanto houve a necessidade de garantir que a temperatura da pele se sustentasse acima da LCST e o teste não foi conclusivo. Para solucionar este problema, pode se manipular os grafts de P-N-IPAAm de maneira a abaixar a LCST do curativo.

Não se pode deixar de considerar que este teste foi realizado até o terceiro dia de cicatrização, nestas condições, o tecido ainda não está em fase de proliferação plena, portanto, é de se esperar que a aderência seja também restrita. Os cortes histológicos indicaram que houve uma pequena reepitelização e isto tenha contribuído para que facilitasse a retirada do curativo. Portanto há ainda a necessidade de se expandir os testes para 7 e 14 dias de cicatrização.

Foi observado, também que o crescimento de pelos do animal pode interferir na aderência do material à superfície da lesão, pois os pelos estariam levantando o curativo. Há duas maneiras que poderiam resolver este problema: a primeira seria usar camundongos *hairless* que não possuem pelos ou utilizar uma ferida maior para que os pelos não interferissem tanto e o mecanismo ficaria também mais fácil de se observar.

5.7. 4 - Cortes histológicos

Os cortes histológicos que serão aqui apresentados são dos processos de cicatrização e na figura 5.28 este representado o esquema dos cortes das lesões. Após a retirada do tecido lesionado, fez-se um corte transversal, em seguida foram fixados em formalina, onde permaneceu até serem colocados em parafina e cortados conforme o esquema abaixo.

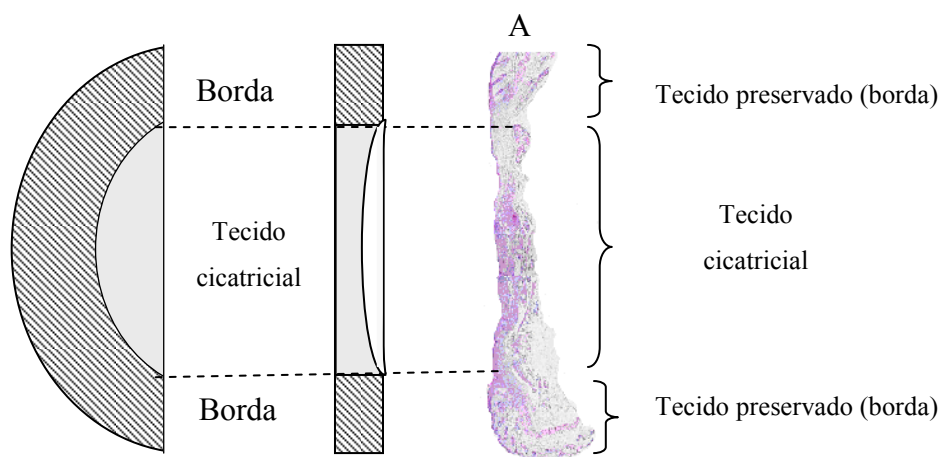


Figura 5.28: Esquema representativo do corte do tecido
 Vista lateral indicando as bordas preservadas e o tecido em recuperação
 À direita foto de corte histológico (A).

5.7.5 – Influencia dos polímeros no processo de reparo tecidual

A habilidade do corpo em substituir células lesionadas ou mortas e reparar tecidos após inflamação é crítica à sobrevivência. Quando os agentes lesivos danificam as células e os tecidos, o hospedeiro responde desencadeando uma série de eventos com o objetivo de eliminar esses agentes, conter o dano e preparar as células sobreviventes para a replicação. O reparo do tecido danificado por ressecção cirúrgica, ferimentos e diversos tipos de lesão pode ser dividido em dois processos: regeneração e cicatrização. A regeneração resulta na restituição dos tecidos perdidos; a cicatrização pode restaurar as estruturas originais, porém envolve a deposição de colágeno e a formação de cicatriz. Os ferimentos superficiais, como um ferimento cutâneo que danifica somente o epitélio, sofrem reparo por regeneração epitelial. Os ferimentos cutâneos incisionais que danificam a derme sofrem reparo através da formação de uma cicatriz de colágeno. A regeneração requer uma arquitetura de tecido conjuntivo intacto. Ao contrário, a cicatrização ocorre se a estrutura da matriz extracelular estiver danificada, causando alterações na arquitetura tecidual.¹²⁸

Com o objetivo de investigar a contribuição dos polímeros no processo de reparo tecidual, lesões na pele de camundongos Swiss foram feitas com o auxílio de um

vazador o qual removiu uma área circular de tamanho padronizado da pele do dorso do animal, em 2 áreas distintas. Em um grupo, a lesão foi deixada exposta (sem cobertura) e em outros dois grupos usou-se como cobertura o poliuretano (poroso) sem graft e o poliuretano graftizado com P-N-IPAAm. O processo cicatricial dessas lesões foi observado durante o período de 3 dias após o qual os animais foram sacrificados e a pele (lesão mais uma borda intacta) foi removida para estudo histológico. A pele normal da região dorsal do camundongo é dividida em duas regiões, a epiderme e a derme. A epiderme é constituída de células epiteliais de revestimento formando um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, enquanto a derme é formada por tecido conjuntivo onde se encontram vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, folículo piloso e glândulas sebáceas. Abaixo da derme observam-se tecidos adiposo e muscular Fig.5.29.

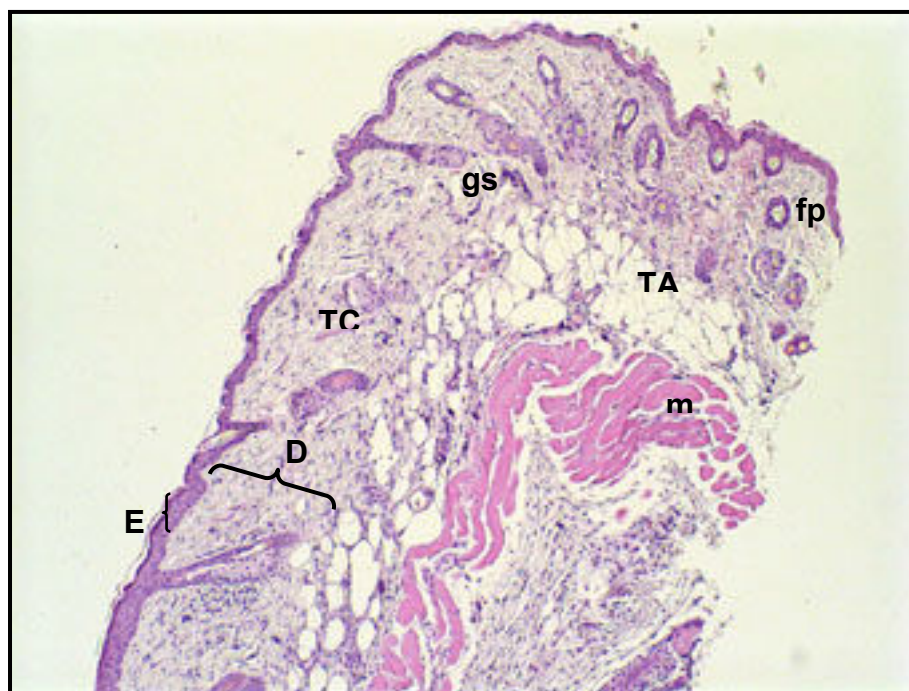


Figura 5.29 – Corte de pele normal de camundongo Swiss mostrando epiderme (E) com queratina, derme (D) constituída por tecido conjuntivo (TC), com folículo piloso (fp), glândula sebácea (gs) e tecidos adiposo (TA) e muscular (m). H&E. Aumento de 4x.

Nas lesões de pele sem cobertura observa-se extensa área de necrose superficial, com presença de tecido de granulação logo abaixo. Esse tecido está constituído por um conjuntivo frouxo com fibras muito finas, delicadas e separadas, vasos sanguíneos neoformados e células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) Fig.5.30A e B.

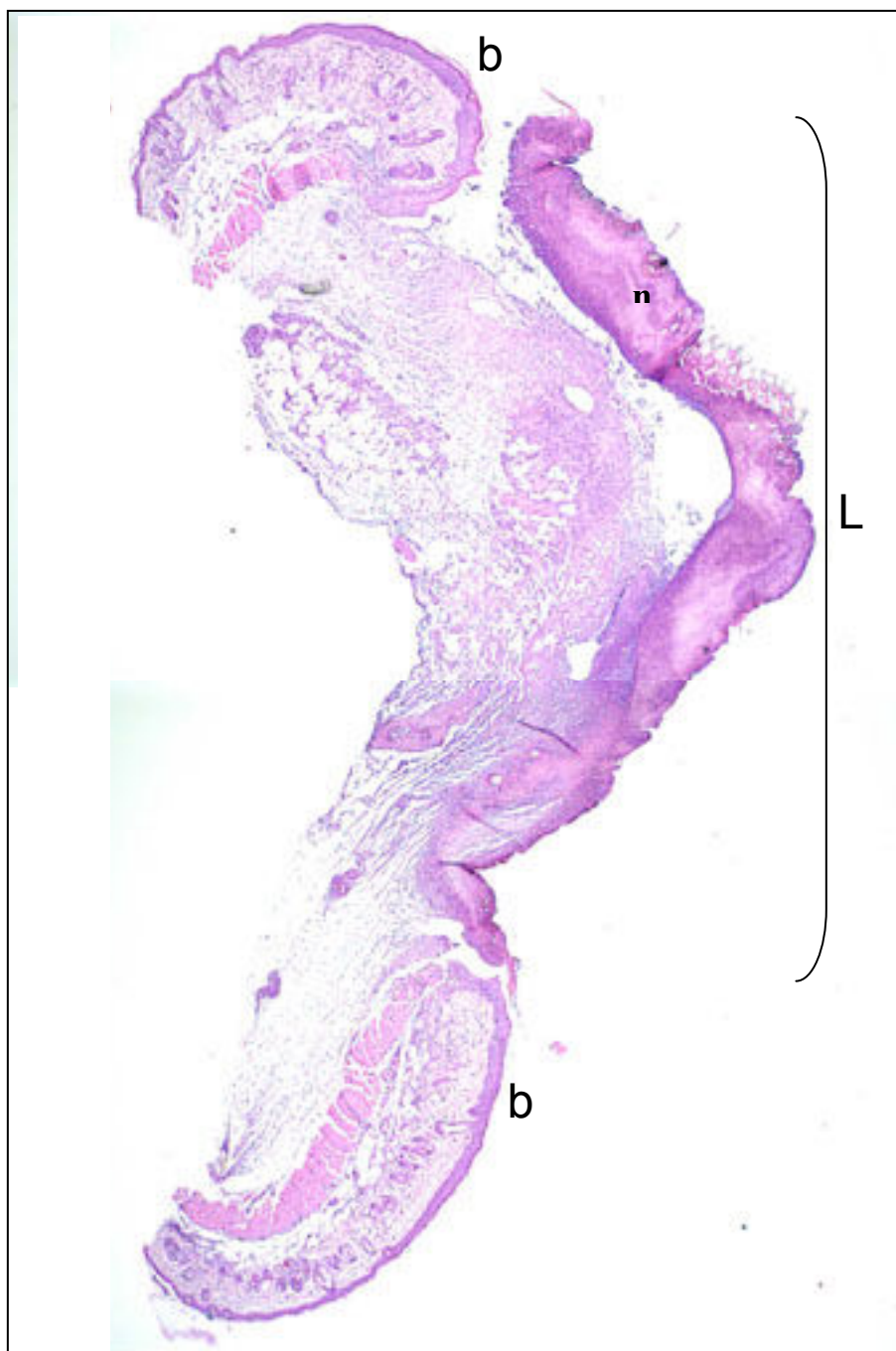


Figura 5.30A – Pele de camundongo mostrando área de lesão (L) e a borda intacta (b). Na superfície da lesão observar área de necrose (n) Ferida sem cobertura. Coloração H&E.

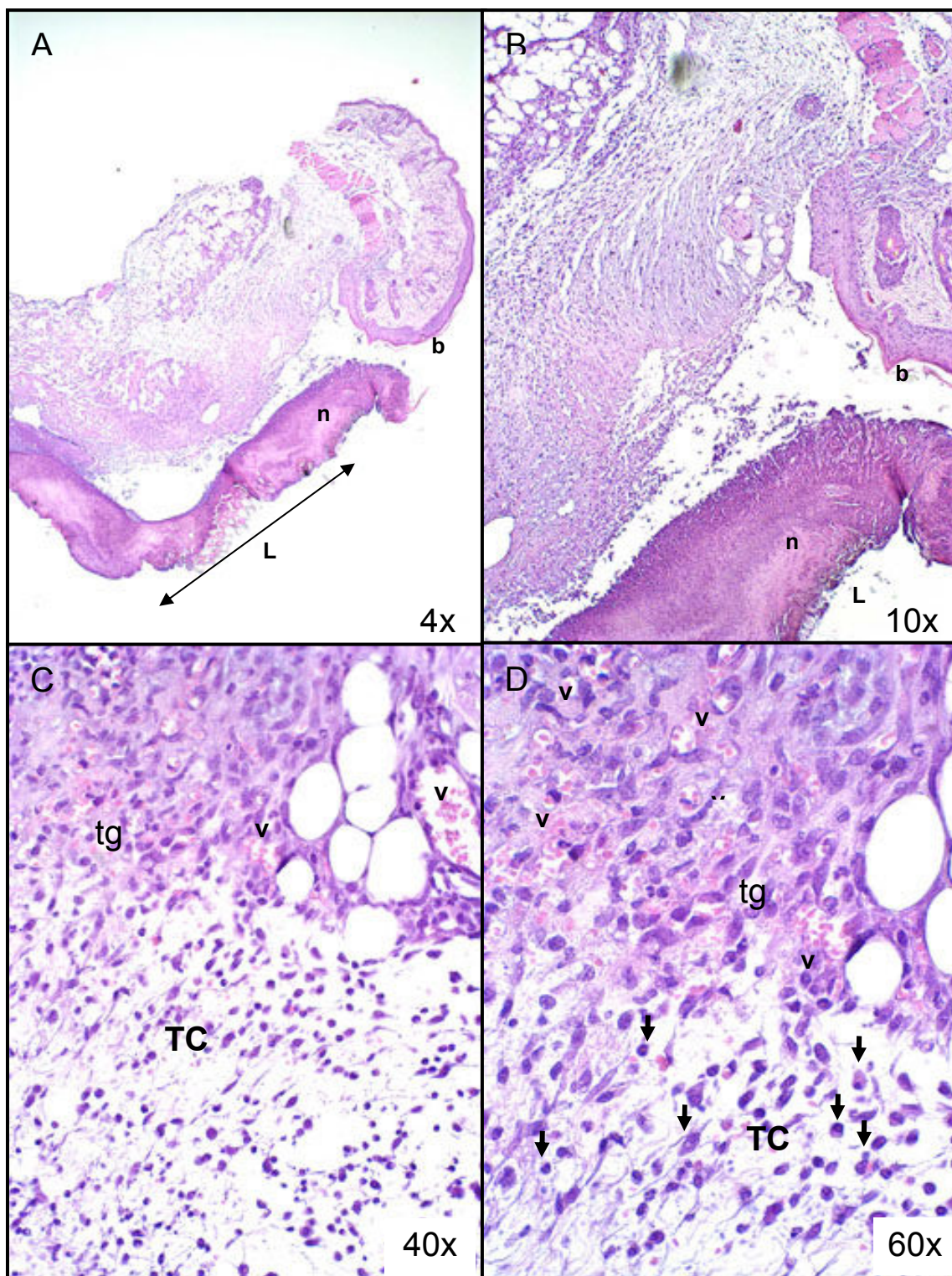


Figura 5.30B – Pele de camundongo mostrando área de lesão (L) e a borda intacta (b). Ferida sem cobertura. Na superfície da lesão observar área de necrose (n). Próximo à borda da lesão observa-se área de tecido conjuntivo (TC) frouxo, com vasos sanguíneos (v) neoformados e muito infiltrado inflamatório (setas) correspondendo ao tecido de granulação (tg) ou tecido cicatricial jovem. B, C e D representam diferentes aumentos de A. Coloração H&E.

Nas lesões de pele com cobertura de poliuretano graftizado com P-N-IPAAm observa-se ausência de área de necrose superficial, presença de tecido de granulação constituído por conjuntivo mais denso (fibras espessas) indicando um processo mais evoluído, vasos sanguíneos e células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) Fig.5.31A e B.

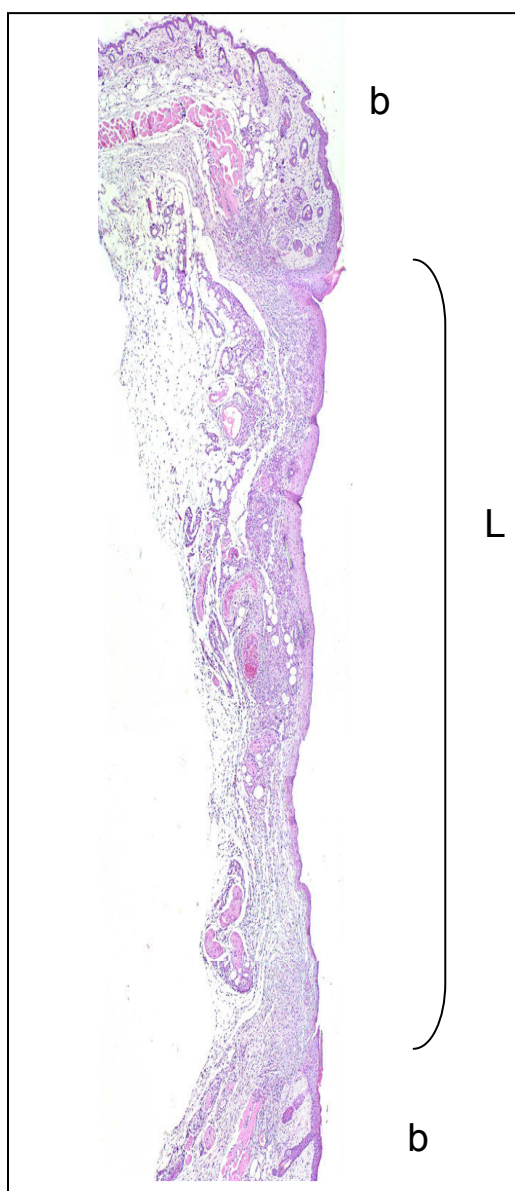


Figura 5.31A.- Pele de camundongo mostrando área de lesão (L) e a borda intacta (b) Ferida com cobertura de PU com grafts. Coloração H&E.

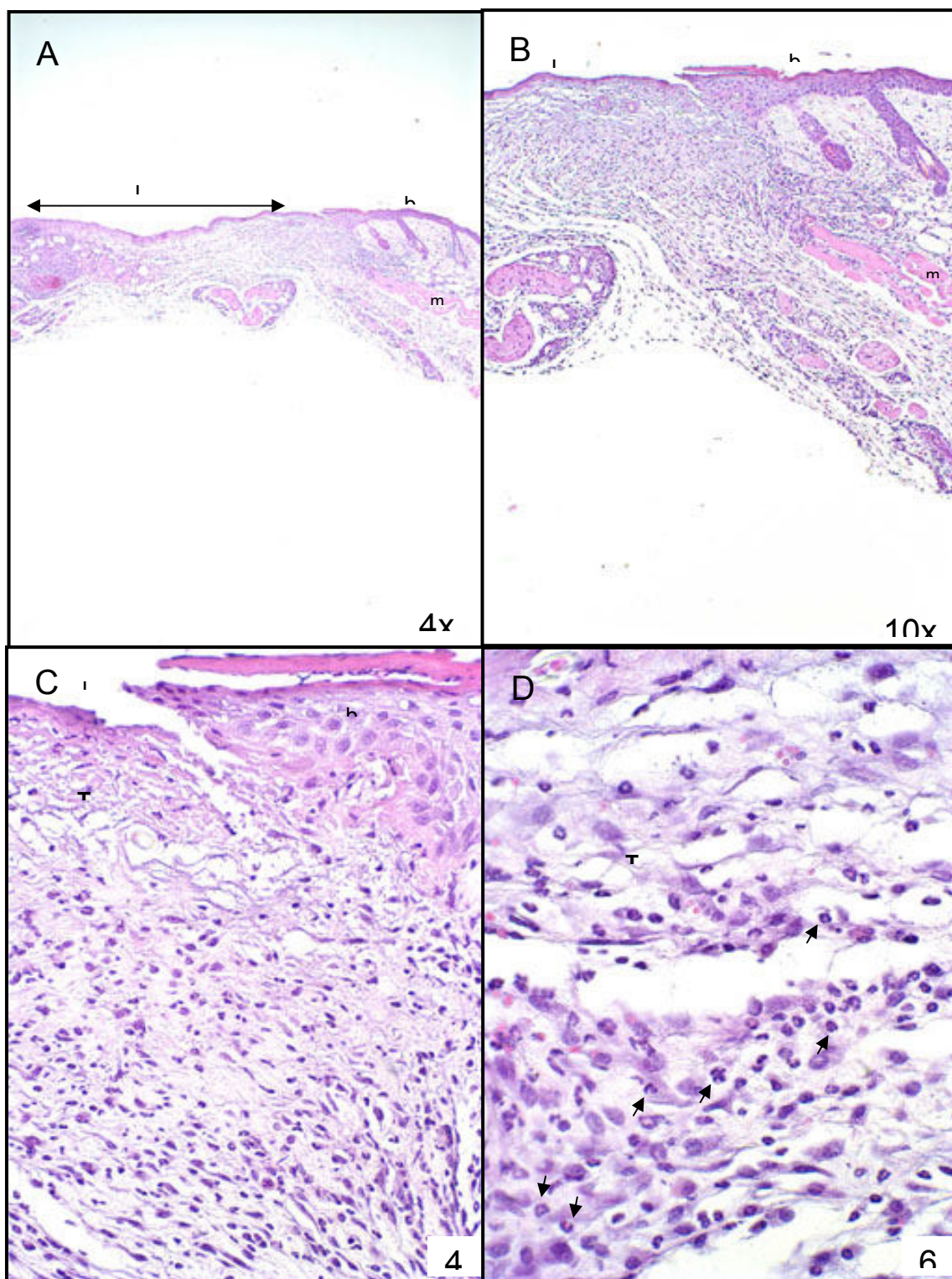


Figura 5.31B.- Pele de camundongo mostrando área de lesão (L) e a borda intacta (b). Ferida com cobertura de PU com grafts de P-N-IPAAm. Próximo à borda da lesão observa-se área de tecido conjuntivo (TC) mais denso e infiltrado inflamatório (setas) correspondendo ao tecido de granulação (tg) ou tecido cicatricial jovem. B, C e D representam diferentes aumentos de A. Coloração H&E.

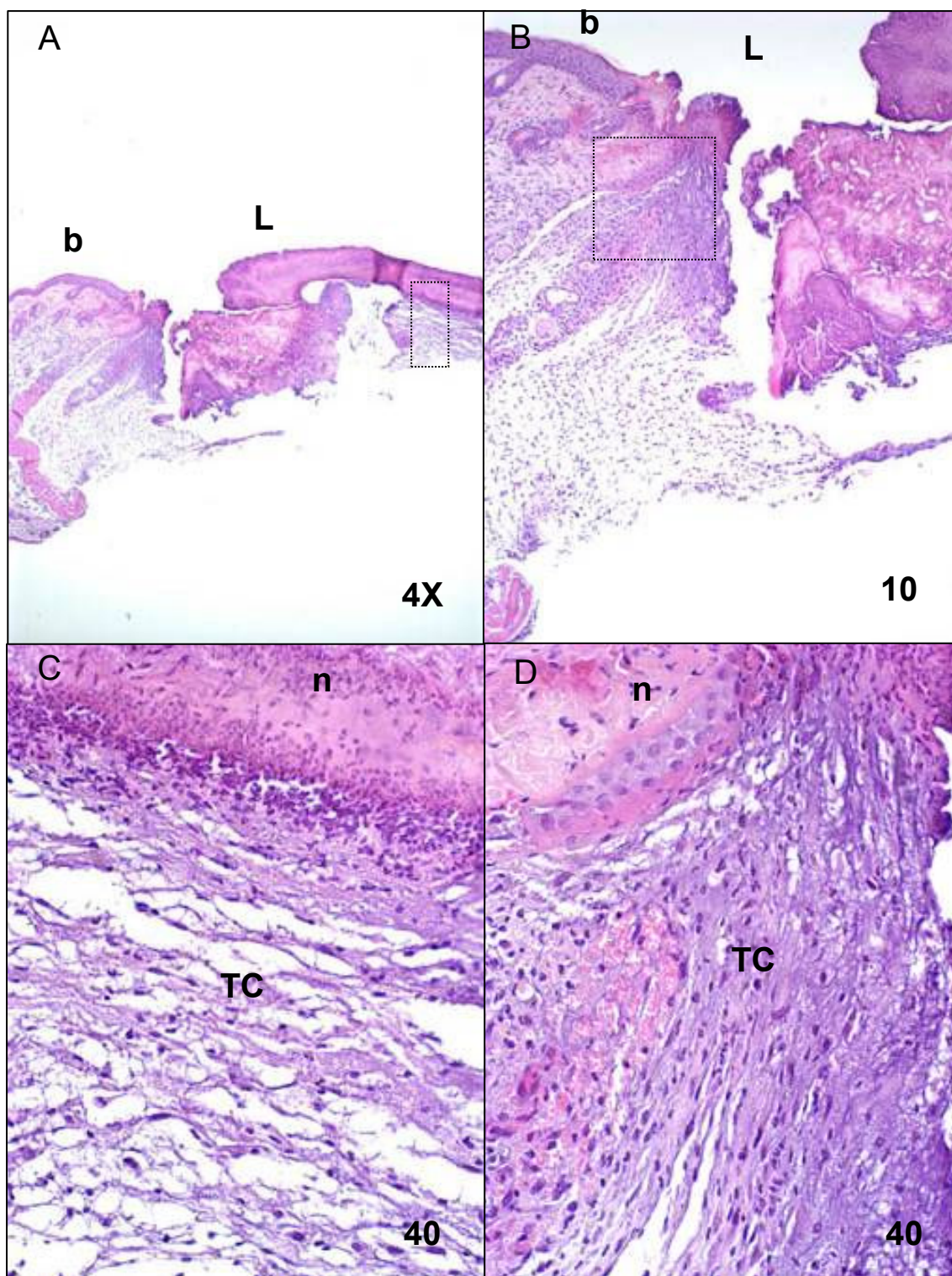


Figura 5.32 – Pele de camundongo mostrando área de lesão (L) e a borda intacta (b) de ferida com cobertura de poliuretano e sem graft. Na superfície da lesão observa-se área de necrose (n). Próximo à borda da lesão há área de tecido conjuntivo (TC) denso. C e D representam diferentes aumentos de A e B respectivamente. Coloração H&E.

Nas lesões de pele com cobertura de poliuretano sem graft observa-se área de necrose superficial menos intensa em relação às lesões sem cobertura, presença de tecido de granulação constituído por tecido conjuntivo com fibras mais espessas e densas, vasos sanguíneos e menos células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos). O processo de reparo nessa lesão apesar da presença de necrose encontra-se bem mais evoluído do que o observado na lesão sem cobertura Fig.5.33.

As análises histológicas apesar de terem sido realizadas em amostras de feridas até o terceiro dia de recuperação, já apontam que o processo de cicatrização é mais organizado, tem menor processo inflamatório, menor necrose, menor contração e não apresenta saliência na borda da ferida quando esta recebe uma cobertura.

As coberturas que possuem P-N-IPAAm graftizado na superfície do poliuretano, apresentaram uma ligeira melhora no processo de cicatrização, promovendo reepitelização e angiogênese. A temperatura corporal normal do camundongo varia de 35,2 a 37,9 °C, isto significa que o implante de P-N-IPAAm estava em um ambiente com temperatura acima da LCST (nome da sigla) cujo valor é de 32°C, isso contribui para um estado hidrofóbico do polímero. É sabido que esse estado favorece a adesão de proteínas e células^{11, 12, 28, 29, 30}. Isso, aliado a um baixo grau de toxicidade em relação ao poliuretano provavelmente tenha contribuído para um amadurecimento do tecido conjuntivo e o crescimento de vasos gerando um processo mais avançado em torno do P-N-IPAAm.

Capítulo 6 - Conclusão

O tratamento por luz ultravioleta se mostrou mais simples e eficiente que o tratamento corona para alteração da superfície do poliuretano através da inserção de grupos polares.

Foi possível graftizar o poli (N-isopropilacrilamida) em superfícies de poliuretano modificado por tratamentos corona e com radiação ultravioleta.

Foi demonstrada a viabilidade de se modular o grau de molhamento de superfícies de PU através de processos de oxidação baseados em radiação UV ou processo corona e através de enxertia de poli (N-isopropilacrilamida) na superfície do PU.

Foi detectada a transição LCST do P-N-IPAAm enxertado em substrato PU.

Foi demonstrada a possibilidade de se manipular o grau de molhamento de superfícies de PU contendo cadeias enxertadas de poli (N-isopropilacrilamida) através da alteração da temperatura.

A alteração da temperatura acima ou abaixo da temperatura de transição LCST do poli (N-isopropilacrilamida) se mostrou adequada para viabilizar o mecanismo on-off e assim permitir o controle sobre o processo *in vitro* de adsorção e dessorção de albumina.

Os testes de verificação do mecanismo on-off para três dias de cicatrização em feridas de segunda intenção, não foram conclusivos, porque não havia certeza da temperatura, no momento da retirada dos curativos.

As feridas com cobertura apresentam processos inflamatórios menos intensos e tecido conjuntivo mais denso do que as feridas sem cobertura.

As feridas com cobertura com grafts apresentaram sinais de reepitalização e angiogênese, mais intensos que as feridas com poliuretano sem grafts. .

Capítulo 7- Referências Bibliográficas

- 1 Arnold Jr, H.L.; Odom, R.B.; James, W.D., A pele: estrutura básica e função; Doenças básicas da pele de Andrews: Dermatologia clínica, 8° ed. São Paulo: Manole, 1994, cap. 1, p.1-14.
- 2 Borges, E. L., Castro, B. F. L. de; Souza, R. L. de, Lima, V. L. de A. N., Projeto de Extensão: Atendimento ao portador de ferida crônica, Anais do 7° encontro de extensão da UFMG, Área temática: Saúde, Belo Horizonte, 2004.
- 3 Dealey, Carol, Cuidando de Feridas: um guia para as enfermeiras. 1°ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 256p.
- 4 Mandelbaum, Samuel Henrique; DI SANTIS, Érico Pampado; Mandelbaum, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. An. Bras. Dermatol, Rio de Janeiro, v.78, n.4, 2003.
- 5 Borges E. L.; Chianca, T.C.M.; Tratamento e cicatrização de feridas – parte 1. Nursing, São Paulo, n.21, p.24 –29, 2000.
- 6 Moryson, M. Leg Ulcers. In: Moryson M. Nursing Management of chronic wounds. 2°ed. London: Mosby, 1998, Cap. 10, p.177-220.
- 7 Coelho, Maria Cristina Oliveira; Rezende, Cleuza Maria de Faria; TENORIO, Ana Paula Monteiro. Contraction of wound after cover with temporally skin substitutes. Ciência. Rural. Santa Maria, v.29, n.2, 1999.
- 8 Draye, J.P.; Delaey, B.; Van de Voorde A.; Van Den Bulcke A.; De Reu B.; Schacht E. In vitro and in vivo biocompatibility of dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel. Biomaterials, v.19, p.1677-87, 1998.
- 9 Shibata H.; Shioya, N.; Kuroyanagi Y. Development of new wound dressing composed of spongy collagen sheet containing dibutyl cyclic AMP. J Biomater Sci Polym Edn, v.8, n.8, p.601-21, 1997.
- 10 Jones, Annie; Vaughan, David. Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review, Journal of Orthopaedic, Nursin, v.8, 9 Suppl. 1 SI-S11, 2005.
- 11 Martineau, Lucie; Shek, Pang N. Evaluation of a bi-layer wound dressing for burn care II. In vitro and in vivo bactericidal properties, Burns, v.32, p.172-179, 2006.
- 12 Cho, Yong-Woo; Cho, Yong-Nam; Chung, Sang-Hun; Yoo, Gyeol; Ko, Sohk-Won. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator, Biomaterials, v.20, p.2139-2145, 1999.
- 13 Kawaia, Katsuya; Suzukib, Shigehiko; Tabatac, Yasuhiko; Nishimura. Yoshihiko.

Accelerated wound healing through the incorporation of basic fibroblast growth factor impregnated gelatin microspheres into artificial dermis using a pressure-induced decubitus ulcer model in genetically diabetic mice, *British Journal of Plastic Surgery*, v.58, p.1115-1123, 2005.

14 Ulubayram, K.; Cakar, A. N.; Korkusuz, P.; Ertan, C.; Hasirci, N. EGF containing gelatin-based wound dressings. *Biomaterials*, v.22, p.1345-1356, 2001.

15 Lavallea, Philippe; Boulmedais, Fouzia; Ballb, Vincent; Muttererc, Jerome; Schaafb, Pierre; Voegel, Jean-Claude. Free standing membranes made of biocompatible polyelectrolytes using the layer by layer method, *Journal of Membrane Science*, v.253, p.49–56, 2005.

16 Okano, T.; Yamada, N.; Okuhara, M.; Sakai, H.; Sakurai, Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic- hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*, v.16, p.297-303, 1995.

17 Edahiro, Jun-ichi; Sumaru, Kimio; Tada, Yuichi; Ohi, Katsuhide; Takagi, Toshiyuki; Kameda, Mitsuyoshi; Shinbo, Toshio; Kanamori, Toshiyuki; Yoshimi, Yasuo. In Situ Control of Cell Adhesion Using Photoresponsive Culture Surface, *Biomacromolecules*, v.6, p.970-974, 2005.

18 Ohyaa, S.; Kidoakib, S.; Matsudab T. Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel surfaces: interrelationship between microscopic structure and mechanical property of surface regions and cell adhesiveness. *Biomaterials*, v.26, 2005.

19 Neff, J.A.; Tresco!, P.A.; Caldwell, K.D. Surface modification for controlled studies of cell ligand interactions *Biomaterials*, v.20, p.2377-2393, 1999.

20 Joerg Lahann, Samir Mitragotri, Thanh-Nga Tran Hiroki Kaido, Jagannathan Sundaram, Insung S. Choi, Saskia Hoffer, Gabor A. Somorjai, Robert Langer. A Reversibly Switching Surface, *Science*, v.299, n.17, p.371-376, 2003

21 Motornov, Mikhail. Fabrication and Study of Switchable Polymer Layers with Hydrophobic/Hydrophilic Behavior), Klimovsk, Russland, Fachbereich Chemie der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden, 1974, 122p (Tese, doutorado am Fachbereich Chemie).

22 Cole, M. A.; Voelcker, N. H.; Thissen, H.; Griesser, H. J.; Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein–surface and cell–surface interactions, *Biomaterials*, v.30, p.1827-1850, 2009.

23 Ohya, Shoji; Nakayama, Yasuhide; Matsuda, Takehisa. Material design for an artificial extracellular matrix: cell entrapment in poly (isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel, *J Artif Organs*, v.4, p.308-314, 2001.

24 Dalkas, Georgios; Pagonis, Konstantinos; Bokias, Georgios. Control of the lower

critical solution temperature type cononsolvency properties of poly(N-isopropylacrylamide) in water-dioxane mixtures through copolymerisation with acrylamide, *Polymer*, v.47, p.243-248, 2006

25 Silva, Fábio Peixoto. Síntese e Caracterização de Hidrogéis de Poli (N-Isopropilacrilamida)-Co-(Ácido Metacrílico) e sua aplicação como sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos, Belo Horizonte, 2006, UFMG, Departamento de Engenharia Química, 174p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).

26 Cesaretti, I.U.R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. *Pelle Sana*, v.2, p.10-2, 1998.

27 Costa, M. P.; Sturtz, G.; Pereira, F. P.; Ferreira, M., Filho, T. E. P. B. Epidemiologia Tratamento de Úlceras de Pressão – Experiência de 77 casos. *Acta Ortop. Bras.* v.13, n.3, p.124-132, 2005

28 Bergonse, F. N.; Rivitti, E. A. Evaluation of arterial circulation using the ankle/brachial blood pressure index in patients with chronic venous ulcers. *An. Bras. Dermatol*, Rio de Janeiro, v.81, n.2, 2006.

29 Aguiar, E.T. de Pinto, L. J.; Figueiredo, M.A.; Savino, N. S. Úlcera de Insuficiência Venosa Crônica, Diretrizes sobre Diagnóstico, Prevenção e Tratamento. Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculare (SBACV), *J Vasc Br*, v.4, p.195-200, 2005.

30 Margolis, D.J.; Berlin, J.A.; Strom, B.L. Risk factors associated with the failure of a venous leg ulcer to heal. *Arch Dermatol*, v.135, p.920-6, 1999.

31 Dallan, Paula Rulf Marreco. Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Peles. Campinas: Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, 2005. 212p (tese, Doutorado em Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos)

32 Ragonha, A.C. O. Microbiological evaluation of 1% silver sulfadiazine dressings. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.*, Ribeirão Preto, v.13, n.4, 2005.

33 Gentilhomme, E.; Neveux, Y.; Lebeau, J.; Desmouliere, A.; Bergier, J.; Schmitt, D.; Haftek, M. Modulation of a fibrotic process. induced by transforming growth factor beta-1 in dermal equivalents. *Cell Biol Toxicol* 1999; v.15, n.4, p229-38; cap. 4, p. 68-89; cap. 9, p. 200-207.

34 Cândido, L.C. Nova abordagem no tratamento de feridas. São Paulo: Senac, 2002, 282 p.

35 Diegelmann, R.F.; Cohen, I.K.; Kaplan, A.M. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast Reconstr. Surg*, v.68, p.107-114, 1981.

- 36 Winter, G.D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*, v.193, p.293-302 , 1962.
- 37 Christopher, E. Kinetic aspects of epidermal healing. *Epidermal wound healing*. St Louis: Mosby, 1972, 427p.
- 38 Van Winkle, W. The fibroblast in wound healing. *Surg Ginecol Obstet*, v.124, p.369-79, 1967.
- 39 Jorge S. A. Dantas. *Abordagem multiprofissional de tratamento de feridas*, SP: Atheneu, 2003. 378p.
- 40 Pereira, Ângela lima. *Revisão Sistemática da Literatura Sobre Produtos Usados no Tratamento de Feridas*. Goiânia: Faculdade de Enfermagem da UFG, 2006. 131p. (Dissertação, Mestrado em Enfermagem)
- 41 Ulijn, Rein V.; Bibi, Nurguse; Jayawarna, Vineetha; Thornton, Paul D.; Todd, Simon J.; Mart, Robert J.; Smith, Andrew M.; Gough, Julie E. Bioresponsive Hydrogel, *Materialstoday*, v.10, n.4, p.40-49, 2007.
- 42 Ma, Zuwei; Gao, Changyou; Gong, Yihong; Shen, Jiacong. Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growthfactor, *Biomaterials*, v. 26, p.1253-1259, 2005.
- 43 Yoona, Jun Jin,; Songa, Soon Ho; Doo Leeb, Sung; Tae Parka, Gwan. Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gás foaming/salt leaching method, *Biomaterials*, v.25, p.5613-5620, 2004.
- 44 Lin, Dong-Tsamn; Young, Tai-Horng; Fang, Yu. Studies on the efect of surface properties on the biocompatibility of polyurethane membranes, *Biomaterials*, v.22, p.1521-1529, 2001.
- 45 Guana, Jianjun; Fujimotoa, Kazuro L.; Sacksa, Michael S., Wagner, William R. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications, *Biomaterials*, v.26, p.3961-3971, 2005.
- 46 Shimizu, T.; Yamato, M.; Kikuchi, A.; Okano, T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, v.24, p.2309-2316, 2003.
- 47 Wei, Hua; Zhan, Xian-Zheng, Zhou, Ying; Cheng, Si-Xue; Zhuo, Ren-Xi. Self-assembled thermoresponsive micelles of poly (N-isopropylacrylamide-b-methyl methacrylate), *Biomaterials*, v.27, p.2028-2034, 2006.
- 48 Ding, Hong; Wu, Fang; Huang, Yuan; Zhang, Zhi-rong. Synthesis and characterization of temperature-responsive copolymer of PELGA modified poly (N-isopropylacrylamide), *Polymer*, v.47, p.1575-1583, 2006

49 Hasan, E.; Zhang M.; Muller, A. H. E.; Tsvetano, Ch. B. Thermoassociative Block Copolymers of Poly (N-Isopropylacrylamide) and Poly (Propylene Oxide), *Journal Of Macromolecular Science*, v.A41, N.5, p. 467-486, 2004.

50 Chenga, Nan; Liua, Wenguang; Caoa, Zhiqiang; Jia, Weihang.; Liangb, Dongchun; Guob, Gang; Zhangb, Jingyu. A study of thermoresponsive poly (N-isopropylacrylamide)/polyarginine bioconjugate non-viral transgene vectors, *Biomaterials*, v.27,p. 4984-4992, 2006.

51 Kima, Ji Hye; Leea, Sang Bong; Kimb, Seon Jeong; Leea, Young M^o. Rapid temperature/pH response of porous alginate-g-poly(Nisopropylacrylamide) hydrogels, *Polymer*, v.43, p.7549-7558, 2002.

52 Mahdavinia, G.R.; Pourjavadi, A; Hosseinzadeh, H.; Zohuriaan, M.J. Modified chitosan Superabsorbent hydrogels from poly (acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties, *European Polymer Journal*, v.40, p.1399-1407, 2004.

53 Tanaka, T. Polymers hydrogels poly-n-sioporpylacrylamide, *Phys. Rev. Lett.*, v.40, p. 820-32, 1978.

54 Cole, C.A.; Schreidner, S. M.; Preist, J. M.; Monji, N.; Hoffman, R.S. Measurement LCST of polymers, *ACS Symp. Ser*, v.1, p. 245-350, 1987.

55 Han, C.K.; Bae, Y.H. Inverse thermally reversible gelation of aqueous N-isopropylacrylamide copolymer solution. *Polymer*, v.39, p. 2809-14, 1998.

56 Escobar, J.L.; García, D.M.; Valerino, A.; Zaldivar, D.; Hernáez, E; Katime, I. Influencia de la Temperatura y la Composición de Los Copolimeros sobre el processo de Hinchamiento en Hidrogeles de Poli (n-Isopropilacrilamida-Co-NN-Dimetilacrilamida. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.4, n.4, 2003.

57 Teixeira, Luciana Akissue de Camargo. Investigação calorimétrica da interação entre poli n isopropilacrilamida e surfactantes iônicos. Campinas: Instituto de Química da Unicamp, 2004. 76p. (Dissertação, mestrado em físico-química)

58 Gil, E. S.; Hudson, S. M. Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymers Science*, v.29, p.1173-1222, 2004.

59 Ganachaud, F.; Monteiro M. J.; Gilbert, R.G.; Dourges, M. A.; Thang, S. H.; Rizzardo, E. Molecular Weight Characterization of Poly (N-isopropylacrylamide) Prepared by Living Free-Radical Polymerization. *Macromolecules*, v.33, p. 6738-45, 2000.

60 Convertine, Anthony J.; Ayres, Neil; Scales, Charles W.; Lowe, Andrew B.; McCormick, Charles L. Facile, Controlled, Room-Temperature RAFT Polymerization

of N- Isopropylacrylamide; *Biomacromolecules*, v.5, p.1177-1180, 2004.

61 Zhang, X.; Zhuo, R.; Yang, Y. Using mixed solvent to synthesize temperature sensitive poly (N-isopropylacrylamide) gel with rapid dynamics properties. *Biomaterials*, v-23, p.1313-18, 2002.

62 Nitschke, M.; Götze, T.; Gramml, S.; Werner, C. Detachment of human endothelial cell sheets from thermo-responsive poly (NIPAAM-co-DEGMA) carriers, *Express Polymer Letters* V.1, N.10, p.660-666, 2007.

63 Harris, A.K.; Wild, P.; Stopak, D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, v.208, p.177-9, 1980.

64 Liu, Q.; Zhang, P.; Qing, A.; Lan, Y.; Lu, M. Poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels with improved shrinking kinetics by RAFT polymerization. *Polymers*, v. 47, p.2330-2336, 2006.

65 Panayiotou, M.; Freitag, R. Influence of the synthesis conditions and ionic additives on the swelling behaviors of thermo-responsive polyalkylacrylamide hydrogels. *Polymer*, v.46, p. 6777-85, 2005.

66 Zhaoa, Jianqing; Geuskens, Georges. Surface modification of polymers VI. Thermal and radiochemical grafting of acrylamide on polyethylene and polystyrene, *European Polymer Journal*, v.35, p.2115-2123, 1999.

67 Choia, Ho-Suk; Kima, Young-Sun; Zhanga, Yan; Tanga, Shen; Myunga, Sung-Woon; Shinb, Byung-Cheol. Plasma-induced graft co-polymerization of acrylic acid onto the polyurethane surface, *Surface and Coatings Technology*, v.182, p.55-64, 2004.

68 Kingshott, Peter; Thissen, Helmut; Griesser, Hans J. Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins, *Biomaterials*, v. 23, p.2043-2056, 2002.

69 Richey, T.; Iwata, H.; Oowaki, H.; Uchida, E.; Matsuda, S.; Ikada, Y. Surface modification of polyethylene balloon catheters for local drug delivery, *Biomaterials*, v.21, p.1057-1065, 2000.

70 Wong, Joyce Y.; Leach, Jennie B.; Brown, Xin Q.. Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell–biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response, *Surface Science*, v.570, p.119-133, 2004.

71 Hamerli, P.; Weigel, Th.; Groth,, Th.; Paul, D. Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma coated polyethylenterephthalat membranes, *Biomaterials*, v.24, p.3989-3999, 2003.

72 Dinga, Zhi; Chena, Jiangning; Gaoa, Shuying; Changa, Jianbing; Zhang, Junfeng ; Kang, E.T. Immobilization of chitosan onto poly-l-lactic acidfilm surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells, *Biomaterials*, v.25, p.1059-1067, 2004.

73 Zhao, B.; Brittain, W.J. Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules. *Prog. Polymers. Sci.*, v-25, p.677-710, 2000.

74 Torres, G.B.; Sinézio, J. C.C. Tratamento Corona e Medidas de Ângulo de Contato em Embalagens Poliméricas Pós-Consumo. *Anais VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Campinas*, 2005.

75 Zhu, Li-Ping; Zhu, Bao-Ku; Li Xu, Feng, Yong-Xiang; Fu Liu, You-Yi Xu. Corona-induced graft polymerization for surface modification of porous polyethersulfone membranes. *Applied Surface Science*, v.253, p.6052-6059, 2007.

76 Jingxin Lei, Xia Liao. Surface graft copolymerization of acrylic acid onto LDPE film through corona discharge, *European Polymer Journal*, v.37, p.771-779, 2001.

77 Ebara, Mitsuhiro; Hoffman, John M.; Stayton, Patrick S.; Hoffman, Allan S.; Surface modification of micro fluidic channels by UV-mediated graft polymerization of non-fouling and 'smart' polymers; *Radiation Physics and Chemistry*, v.76, p.1409-1413, 2007.

78 Curtia, P. S.; Moura, M.R. de; Veigab, W.; Radovanovica, E.; Rubira, A. F.; Muniz E. C.; Characterization of P-N-IPAAm photografted on PET and PS surfaces; *Applied Surface Science*, v.245, p.223-233, 2005.

79 Quirk, Robin A.; Chan, Weng C.; Davies, Martyn C. Tendler, Sal, J. B.; Shakeshe, Kevin M. Poly (L-lysine)}GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid), *Biomaterials*, v. 22, p.865-872, 2001.

80 Suh, Hwal; Hwang, Yu-Shik; Lee, Jong-Eun; Han, Chang Dong; Park, Jong-Chul. Behavior of osteoblasts on a type I telocollagen grafted ozone oxidized poly L-lactic acid membrane, *Biomaterials*, v.22, p.219-230, 2001.

81 Caia, Kaiyong; Yaoa, Kangde; Cuia, Yuanlu; Yangb, Zhiming; Lib, Xiuqiong; Xieb, Huiqi; Qingb, Tingwu; Gao, Laibao. Influence of different surface modification treatments on poly (d,l-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro, *Biomaterials*, v.23, p.1603-1611, 2002.

82 Cole, M. A.; Voelcker, N. H.; Thissen, H.; Griesser, H. J.; Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein–surface and cell–surface interactions, *Biomaterials*, v.30, p.1827-1850, 2009.

83 Liu, Guangming; Yan, Lifeng; Chen, Xi; Zhang. Guangzhao. Study of the kinetics of mushroom-to-brush transition of charged polymer chains, *Polymer*, v.47, p.3157-3166,

2006.

84 Guowei Zhao, Yashao Chen, Xiaoli Wang, Surface modification of polyethylene film by acrylamide graft and alcoholysis for improvement of antithrombogenicity, *Applied Surface Science*, v.253, p.4709-4714, 2007.

85 Zhang, Jun; Yuan, Jiang; Yuan, Youling; Zang, Xiaopeng; Shen, Jian, Lin, Sicong. Platelet adhesive resistance of segmented polyurethane film surface grafted with vinyl benzyl sulfo monomer of ammonium zwitterions, *Biomaterials*, v.24, p.4223-4231, 2003.

86 Xu, Jianmin; Yuan, Youling; Shan, Bing; Shen, Jian; Lin, Sicong. Ozone-induced grafting phosphorylcholine polymer onto silicone film grafting 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine onto silicone film to improve hemocompatibility, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.30, p.215-223, 2003.

87 Santos, Liana Rita dos. Estudo Eletroquímico das Características Trombogênicas de Hidrogéis Poliméricos, Campinas, Unicamp, Engenharia Mecânica, 2002, 122p, (tese, doutorado em Engenharia Mecânica).

88 Hoffman, Allan S. Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.43, p.3-12, 2002.

89 Yanga, Joseph; Yamatoa, Masayuki; Kohnoa, Chinatsu; Nishimotob, Ayako; Sekinea, Hidekazu; Fukaib, Fumio; Okano, Teruo. Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds, *Biomaterials*, v.26, p.6415-6422, 2005.

90 Tessmara, Jorg; Mikosb, Antonios; G.opferich, Achim. The use of poly(ethylene glycol)-block-poly(lactic acid) derived copolymers for the rapid creation of biomimetic surfaces, *Biomaterials*, v.24, p.4475-4486, 2003.

91 Ma, Zuwei; Gao, Changyou; Ji, Jian; Shen, Jiacong. Protein immobilization on the surface of poly-L-lactic acid films for improvement of cellular interactions, *European Polymer Journal*, v. 38, p.2279-2284, 2002.

92 Yang, Jian; Bei, Jianzhong; Wang, Shenguo; Enhanced cell affinity of poly (d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen Anchorage *Biomaterials*, v.23, p.2607-2614, 2002.

93 Freij-Larsson, Christina; Jannasch, Patric; Wesslen, Bengt. Polyurethane surfaces modified by amphiphilic polymers: effects on protein adsorption, *Biomaterials*, v.21, p.307-315, 2000.

94 Pasche, S.; Textor, M.; Meagher, L.; Spencer, N.D.; Griesser, H.J. Relationship between interfacial forces measured by colloid-probe atomic force microscopy and protein resistance of poly (ethylene glycol)-grafted poly (L-lysine) adlayers on niobia surfaces. *Langmuir*, v.21, n.14, p.6508-6520, 2005.

95 Cho, E.C.; Kim, Y.D.; Cho, K. Thermally responsive poly (N-isopropylacrylamide) monolayer on gold: synthesis, surface characterization, and protein interaction/adsorption studies. *Polymer*, v.45, n.10, p.3195-3204, 2004.

96 Cho, E.C.; Kim, Y.D.; Cho, K. Temperature-dependent intermolecular force measurement of poly (N-isopropylacrylamide) grafted surface with protein. *J Colloid Interface Sci*, v.286, n.2, p.479-486, 2005.

97 Ishida, N.; Kobayashi, M. Interaction forces measured between poly(N-isopropylacrylamide) grafted surface and hydrophobic particle. *J Colloid Interface Sci*, v.297, n.2, p.513-519, 2006.

98 Kidoaki, S.; Ohya, S.; Nakayama, Y.; Matsuda, T. Thermoresponsive structural change of a poly(N-isopropylacrylamide) graft layer measured with an atomic force microscope. *Langmuir*, v.17, n.8, p.2402-2407, 2001.

99 Pasche, S.; Voros, J.; Griesser, H.J.; Spencer, N.D. Textor M. Effects of ionic strength and surface charge on protein adsorption at PEGylated surfaces. *J Phys Chem. B*, v.109, n.37, p.17545-17552, 2005.

100 Cole, M.A.; Thissen, H.; Losic, D.; Voelcker, N.H.; A new approach to the immobilization of poly (ethylene oxide) for the reduction of non-specific protein adsorption on conductive substrates. *Surf Sci.*, v.601, n.7, 1716-1725, 2007.

101 Plunkett, K.N.; Zhu, X.; Moore, J.S.; Leckband, D.E. PNIPAM chain collapse depends on the molecular weight and grafting density. *Langmuir*, v.22, n.9, p.4259-4266, 2006.

102 Huber, D.L.; Manginell, R.P.; Samara, M.A.; Kim, B.I.; Bunker, B.C. Programmed adsorption and release of proteins in a microfluidic device, *Science*, v.301, n.5661, p.352-354, 2003.

103 Mizutani A, Kikuchi A, Yamato M, Kanazawa H, Okano T. Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells. *Biomaterials*, v.29, n.13, p.2073-2081, 2008.

104 Duracher, D.; Veyret, R.; Elaissari, A.; Pichot, C. Adsorption of bovine serum albumin protein onto amino-containing thermosensitive core-shell latexes. *Polym Int.*, v.53, n.5, p.618-626, 2004.

105 Pelham R.J.; Wang Y.L. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate exibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.94, p.13661-5, 1997.

106 Canavan H. E.; Cheng X. H.; Graham D. J.; Ratner B. D.; Castner D. G. Surface characterization of the extracellular matrix remaining after cell detachment from a

thermoreponsive polymer. *Langmuir*, v.21, p.1949-1955, 2005.

107 Mizutani, Aya; Kikuchi, Akihiko; Yamato, Masayuki; Kanazawa, Hideko; Okano, Teruo; Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells, *Biomaterials*, v.29, p.2073-2081, 2008.

108 Yakushiji, T.; Sakai, Kiyotaka; Kikuchi, Akihiko; Aoyagi, Takao; Sakurai, Yasuhisa Okano, Teruo, Graft Architectural Effects on hermoreponsive Wettability Changes of Poly (N-isopropylacrylamide)-Modified Surfaces, *Langmuir* v.14, p. 4657-4662, 1998.

109 Volpe, C. D.; Cassinelli, C.; and Morra, M. W. Plate Measurements on Poly (N-isopropylacrylamide)-Grafted Surfaces. *Langmuir*, v.14, n.16, p. 4650-4656, 1998.

110 Ulrica Edlund, Martina Kallrot, and Ann-Christine Albertsson, Single-Step Covalent Functionalization of Polylactide Surfaces, *Surfaces, J. Am. Chem. Soc.*, v.9, n.127, p.8865-8871, 2005.

111 Guimond, Sebastien; Radu, Sebastien, Ion; Czeremuszkina, Gregory; Carlsson, David J.; Wertheimer, Michael R. Biaxially Oriented Polypropylene (BOPP) Surface Modification by Nitrogen Atmospheric Pressure Glow Discharge (APGD) and by Air Corona, *Plasmas and Polymers*, v. 7, n.1, 2002.

112 Lei, Jingxin; Liao. Xia. Surface graft copolymerization of acrylic acid onto LDPE Film through corona discharge, *European Polymer Journal*, v.37, p.771-779, 2001.

113 Bhowmika, S.; Jana, P.; Chakia, T.K., Ray, S. Surface modification of PP under different electrodes of DC glow discharge and its physicochemical characteristics, *Surface & Coatings Technology*, v.185, p. 8-91 2004.

114 Sellin, Noemi. Análise de Superfície de Polímeros Pós Tratamento Corona. Campinas, Unicamp, 2002, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 124p. (Tese, doutorado em Ciência e Tecnologia dos Materiais)

115 Su, Cherng-Yuh; Lin, Chung-Kwei, Lin, Chii-Ruey; Lin, Chao-Hsing. Polymerization-like grafting of thermoplastic polyurethane by microwave plasma treatment, *Surface & Coatings Technology*, v.200, p.380-3384, 2006.

116 Wan, Yuqing; Tu, Chifeng; Yang, Jian; Bei, Jianzhong; Wang. Shenguo. Influences of ammonia plasma treatment on modifying depth and degradation of poly (L-lactide) scaffolds, *Biomaterials* v.27, p.2699-2704, 2006.

117 Hirotsu, Toshihiro; Castillo, Martin; Nakayama, Kazuo; Tsuruta, Shuichi; Suzuki, Hiroaki. Surface wetting phenomena of plasma polymer-coated sheets of poly (L-lactic acid)/poly(butylene succinate), *Thin Solid Films*, p.1-5, 2006.

118 Kang, Inn-Kyu; Kwon, Oh Hyeong; Lee, Young Môo; Sung, Yong Kiel. Preparation and surface characterization of functional group-grafted and hepk-immobilized polyurethanes by plasma glow discharge, *Biomaterids*, v.17, p.641-847, 1996.

119 Chua,, P.K; Chena, J.Y.; Wanga, L.P.; Huangb, N. Plasma-surface modification of biomaterials, *Materials Science and Engineering*, v.R 36, p.143-206, 2002.

120 Ryua, Gyu Há; Yanga, Won-Sun; Roha, Hye-Won; Leec, In-Seop; Kimd, Jeong Koo; Lee, Gun Hwan; Leeb, Dong Hee; Parkb, Bong Joo; Leeb, Min Sub; Park, Jong-Chul. Plasma surface modification of poly (d,l-lactic-co-glycolic acid) (65/35) film for tissue engineering, *Surface & Coatings Technology*, v.193, p.60- 64, 2005.

121 Oehr, Christian. Plasma surface modification of polymers for biomedical use, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v.B208, p.40-47, 2003.

122 Liang, Liang; Feng, Xiangdong; Peurrung, Loni; Viswanathan, Vish. Temperature-sensitive membranes prepared by UV photopolymerization of N-isopropylacrylamide on a surface of porous hydrophilic polypropylene membranes, *Journal of Membrane Science*, v.162, p. 235-246, 1999.

123 Ra, Bengt; Surface modification and lamination of polymers by photografting, *International Journal of Adhesion & Adhesives*, v.19, p.337-343, 1999

124 Hu, Shuwen; Ren, Xueqin; Bachman, Mark; Sims, Christopher E.; Li, G. P.; Allbritton, Nancy. Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices by Ultraviolet Polymer Grafting, *Anal. Chem.*, v.74, n.16, p.4117-4123, 2002.

125 Mori, Ryoichi; Shaw , Tanya J.; Martin, Paul. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring, *JEM* © The Rockefeller University Press, v.205, n.1, p.43-51, 2008.

126 Annaka, Masahiko; Yahiro, Chie; Nagase, Kenichi; Kikuchi, Akihiko; Okano, Teruo. Real-time observation of coil-to-globule transition in thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) brushes by quartz crystal microbalance, *Polymer*, v.48, p.5713-5720, 2007.

127 Wang, Li-Qun; Tu, Kehua; Li, Yuping; Zhang, Jie; Jiang, Liming; Zhang, Zhihua. S synthesis and characterization of temperature responsive graft copolymers of dextran with poly (N-isopropylacrylamide) *Reactive & Functional, Polymers*, v.53, p.19-27, 2002.

128 (Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. Robbins e Cotran *Patologia – Bases patológicas das doenças*. 7ª edição. Editora Elsevier. 2005).