

PROPIEDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* DE POLÍMEROS EPOXÍDICOS MODIFICADOS CON DILUYENTE REACTIVO

Álvaro C.F. Silva¹, Pedro P. Ortega², F. González García^{1*}, A.A.A. de Queiroz¹,
Olga Z. Higa³, Fernando J.C. Baratéla³ y Alexandre Z. Simões²

1. Instituto de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, 37500-903, MG, Brasil. Correo electrónico:

fili@unifei.edu.br

2. Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, 05508-900, SP, Brasil

3. Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, 12516-410, SP, Brasil

Recibido: Febrero 2016; Aceptado: Mayo 2016

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se describen las propiedades biológicas *in vitro* de tres polímeros epoxídicos modificados con diluyente reactivo. Las interacciones biológicas entre los materiales y la sangre fueron estudiadas por ensayos biológicos *in vitro*. Los estudios de adsorción de proteínas, adhesión de plaquetas, actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) y las propiedades de tromboresistencia son presentados y discutidos. Los ensayos de adsorción de proteínas mostraron que los polímeros adsorben más albúmina que fibrinógeno. Los resultados relacionados a la adhesión de plaquetas, actividad de lactato hidrogenasa y las propiedades de tromboresistencia indicaron que los materiales DGEBA/IPD y DGEBA/3DCM exhiben un comportamiento hemocompatible. De esta manera, asumimos que estos materiales epoxídicos son compatibles con la sangre.

Palabras claves: adsorción protéica, adsorción de plaquetas, hemopatibilidad, polímeros epoxídicos.

ABSTRACT

This paper describes the *in vitro* biological properties of three epoxy networks modified with reactive diluent. The biological interactions between epoxy polymers and blood were studied by *in vitro* assays. Studies of the protein adsorption, platelet adhesion, lactate dehydrogenase (LDH) activity and thromboresistance properties are presented and discussed. The protein adsorption assays onto polymeric surfaces showed that the epoxy polymers adsorbed more albumin than fibrinogen. The results about platelet adhesion, lactate dehydrogenase (LDH) activity and thromboresistance properties indicated that the materials based on DGEBA/IPD and DGEBA/3DCM show hemocompatible behavior. In this way, we can assume that these polymers are blood compatible materials.

Keywords: blood compatibility, epoxy polymers, platelet adhesion, protein adsorption.

INTRODUCCIÓN

Datos de la organización mundial de la salud (OMS) indican que las enfermedades cardiovasculares (DCVS) continúan siendo una de las principales causas de muerte en el mundo [1]. Particularmente, en Brasil la DCVS tiene un impacto considerable en la mortalidad de la población, y representa actualmente una de las mayores causas de muerte [2]. Dentro de las DCVS destacase la enfermedad arterial coronaria, cuyo tratamiento terapéutico es realizado a través del implante de un dispositivo conocido por stent, que consiste en una endoprótesis de estructura tubular metálica la cual es expansible, y cuando implantada en el interior de una arteria evade o impide la obstrucción del flujo de sangre en el local [3–4]. Sin embargo, la literatura enfatiza que ocurre un elevado índice de reestenosis, lo que significa, que ocurre el estrechamiento posterior de los vasos dilatados por el stent, y ocurre el aumento de la incidencia de inflamación, trombosis y proliferación fibromuscular [5–6].

En la fabricación de los stents metálicos, el acero inoxidable 316L es ampliamente utilizado, y en general, este material es considerado biocompatible, más es propenso a la corrosión cuando está en contacto con medios biológicos, y ocurre la liberación gradual de iones metálicos, tales como; cromo, níquel, hierro, etc., en el tejido circundante y que compromete la integridad mecánica del dispositivo. Este proceso corrosivo desencadena intensa respuesta inmune local, y reacción inflamatoria las que inducen intensa proliferación celular [7–9].

Para solucionar este problema corrosivo muchos investigadores consideran como alternativa el revestimiento de la superficie del stent metálico con un filme fino de material polimérico. La literatura es vasta en este sentido, por ejemplo: copolímeros acrílicos cargados con compuestos que inhiben la adhesión de plaquetas [10]. Filmes poliméricos de alilamina polimerizada via plasma que resultaron con buenas propiedades adhesivas y cohesivas al sustrato metálico [11]. Copolímeros de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(etilenglicol) (PEG), y carboxi-caprolactona (cPCL) los que resultaron compatibles con dos tipos de células de arteria coronaria humana [12]. Copolímeros de dextrana-graft-poli(butil-metacrilato) los que resultaron en la formación de un filme fino en la superficie metálica, la que no se rompe después que el dispositivo fue sometido a la expansión, y a la descompresión posterior (dimensión natural) durante el proceso de implante, además de no afectar el crecimiento de las células endoteliales [13].

La biocompatibilidad y citotoxicidad de diferentes monómeros epoxídicos, y de polímeros epoxídicos [14–18] ha sido divulgada en la literatura científica; pero hasta la fecha no han sido divulgados estudios relacionados a la utilización de este tipo de polímeros para aplicaciones cardiovasculares. Estudios recientes de nuestro grupo de investigación, mostraron que algunos polímeros epoxídicos presentan buenas propiedades antitrombogénicas y no manifiestan indicios de citotoxicidad, lo que sugiere que estos materiales poseen propiedades biológicas favorables para aplicaciones en dispositivos cardiovasculares [14,19].

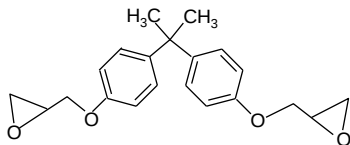
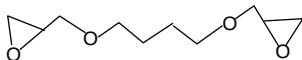
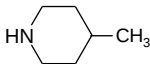
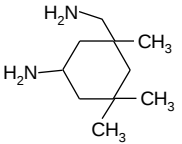
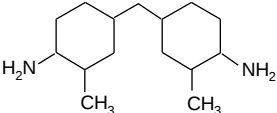
El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades biológicas de tres formulaciones epoxídicas preparadas en nuestros laboratorios, especialmente desarrolladas para el revestimiento de stents cardiovasculares. Para este objetivo, fue seleccionado como monómero epoxídico el éter diglicidílico del bisfenol A (DGEBA), y como comonómeros diferentes aminas cicloalifáticas, debido a que este tipo de agente de curado manifestó buenas propiedades antitrombóticas y de citotoxicidad. [14,19] La incorporación de un diluyente reactivo en las formulaciones tenía varias intenciones, por una parte disminuir la viscosidad y el ángulo de contacto, lo que resulta conveniente para aplicaciones de revestimiento, y por otra parte para obtener materiales finales más flexibles. Además la selección de tres aminas cicloalifáticas tenía el objetivo de obtener materiales poliméricos con diferentes propiedades biológicas, mecánicas, adhesivas y de absorción de agua en

ambiente fisiológico (37°C). Los resultados de estos estudios están en proceso de edición y/o enviados a publicar. En este trabajo presentamos los resultados de los estudios de las interacciones biológicas *in vitro* entre la superficie de estos materiales con la sangre humana.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. Los polímeros preparados y estudiados fueron formulados a base del monómero epoxídico del tipo éter diglicidílico del bisfenol A (DGEBA) modificado con el diluyente reactivo éter diglicidílico del 1,4-butanodiol (DGEBD), compuestos que tienen una masa equivalente de grupos epoxídicos de 185,5 y de 123,4 g·eq⁻¹, respectivamente lo que fue determinado por valoración ácida [20]. Los comonómeros utilizados fueron tres aminas cicloalifáticas; isoforona diamina (IPD), 4,4'-diamino-3,3'-dimetil-diciclohexilmetano (3DCM) y 4-metilpiperidina (4MPip). Las aminas IPD y 3DCM con una masa equivalente de grupos hidrógeno-amina de 42,6 y 59,6 g·eq⁻¹, respectivamente lo que fue determinado por titulación potenciométrica [21]. Características tales como: estructura química, proveedor, pureza, masa molecular y funcionalidad de los diferentes productos utilizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características químico-físicas de los productos utilizados.

Productos	Estructura química	Proveedor	M g. mol ⁻¹	F
Éter diglicidílico del bisfenol A (DGEBA)		Dow Chemical DER 331	~371.00	2
Éter diglicidílico del 1,4-butanodiol (DGEBD)		Aldrich (60.0%)	202.25	2
4-Metilpiperidina (4MPip)		Aldrich (96.0%)	98.17	1
Isoforona diamina (IPD)		Aldrich (99.0%)	170.30	4
4,4'-Diamino-3,3'-dimetil-diciclohexilmetano (3DCM)		Aldrich (99.0%)	238.41	4

M: masa molecular, F: funcionalidad.

Preparación de las muestras. Todas las formulaciones fueron preparadas por la adición del diluyente reactivo al monómero epoxídico usando una concentración de 30 phr (30 g de DGEBA para cada 100 g de DGEBA). Las formulaciones a base de 3DCM y IPD fueron preparadas considerando la masa de monómero epoxídico en la mezcla con el diluyente, fueron usadas cantidades estequiométricas (grupos epoxi/grupos hidrógenos amina e/a = 1). Las formulaciones a base de 4MPip fueron preparadas usando una concentración de comonómero de 5 phr (5 g de 4MPip para cada 100 g de DGEBA). Todas las formulaciones fueron cuidadosamente homogenizadas usando agitador magnético durante 5 minutos, a 25°C. En seguida, la mezcla líquida fue desgasificada a vacío durante 10 minutos a temperatura ambiente (25°C) para eliminar las burbujas de aire, después vertida en moldes de poli(etileno) (cilíndricos) y sometidas a 60°C durante 4 horas en estufa de laboratorio con circulación de aire. Las muestras a base de 3DCM y IPD con un curado incompleto en los moldes de poli(etileno) fueron removidas y transferidas para moldes de vidrio (cilíndricos), y posteriormente sometidas a una etapa de post-curado de 180 y 160°C durante 2 horas, respectivamente. Para la formulación a base 4MPip fue utilizado un programa de curado de dos etapas, la primera a 60°C durante 30 minutos, y la segunda a 120°C durante 16 horas. Terminado el programa de curado, todas las muestras fueron dejadas enfriar lentamente en la estufa hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras (cilindros) fueron removidas de los moldes, y maquinadas para alcanzar las dimensiones finales. De esta forma fueron producidas muestras en la forma de discos con dimensiones de 1,5 cm·1,5 cm, las que fueron sometidas posteriormente a tratamiento mecánico para alcanzar el acabado superficial requerido. La superficie de estos discos fue sometida a pulido mecánico, primeramente fueron usados discos de carburo de silicio de 230, 300, 400, 500, 600, y 1.200, y posteriormente fueron utilizadas dispersiones de pulido a base de óxido de aluminio de 0,5 μm y de 0,3 μm . Durante cada etapa de tratamiento mecánico de pulido los discos fueron lavados con agua destilada para eliminar los residuos. Finalmente, las muestras en forma de discos con una de las superficies pulidas, fueron secadas con papel absorbente, y almacenadas en desecador con sílica gel hasta su utilización.

CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

Espectroscopia de infrarrojo (FTIR). Las muestras después del proceso de curado fueron inicialmente caracterizadas por medio de espectroscopia de infrarrojo (FTIR) con un equipo *Perkin Elmer* modelo *Spectrum 100* con accesorio universal para ATR de ZnSe. Los espectros fueron registrados en un intervalo espectral de 4.000 a 650 cm^{-1} , y resolución de 4 cm^{-1} .

Calorimetria diferencial de barrido (DSC). La temperatura de transición vítrea (T_g), y el

calor residual (ΔH_R), de las muestras después del proceso de curado fueron determinadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro Shimadzu, modelo DSC 60 en atmósfera de nitrógeno. Las muestras (~10,0 mg) fueron analizadas desde 37 hasta 115°C a una velocidad de calentamiento de 10 grado·min⁻¹ y un flujo de nitrógeno de 50 mL·min⁻¹. Fue considerado el valor de la temperatura de transición vítrea (T_g) en el inicio de la caída del cambio de la capacidad calórica (*on set*).

Ensayos biológicos *in vitro*.

Comportamiento trombogénico. La compatibilidad con la sangre fue evaluada por el ensayo de adhesión plaquetaria en condiciones estáticas utilizando sangre humana [22]. La sangre fue colectada de donantes saludables, de acuerdo con la *Declaración de Helsinki* [23] y aprobado por un comité de ética local.

Para los estudios de adhesión de plaquetas, discos con dimensiones de 1,5 cm·1,5 cm de cada muestra después del programa de curado, y del tratamiento mecánico de pulido fueron incubados durante 1 hora en tampón de fosfato salino (PBS, 0,1 M, pH 7,4), a 37°C. El ensayo fue realizado depositando 2 mL de sangre fresca en cada una de las superficies de las muestras. Después de un tiempo de contacto de 180 s a 37°C, las superficies fueron lavadas suavemente con tampón PBS para remover las plaquetas no adheridas y en seguida fueron fijadas usando solución de glutaraldehído (2,0%). A continuación, las muestras fueron sumergidas en solución salina tampón (PBS, pH 7,4) y lavadas por 15 minutos por tres veces para eliminar las plaquetas no adheridas a las superficies poliméricas. La deshidratación de las muestras fue realizada por inmersión en cada una de las disoluciones de concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90, 95, y 100%) durante 15 minutos. El estudio de la morfología de las plaquetas adheridas sobre la superficie de las muestras fue realizado por microscopia electrónica de barrido (MEV) usando un microscopio Jeol, modelo JSM-7401F. En este estudio fue utilizado el vidrio como control positivo.

La cantidad de plaquetas adheridas en la superficie de los polímeros después de la exposición con la sangre fue evaluada a través de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) [24]. Sangre humana fue colectada de un voluntario saludable en un tubo con anticoagulante de citrato de sodio (citrato de sodio 3,2% en la proporción de 9 partes de sangre para 1 parte de anticoagulante) la que fue posteriormente centrifugada a 1.500 rpm durante 15 minutos para preparar el plasma rico en plaquetas (PRP). Fue depositado 1 mL de PRP en cada una de las superficies de los polímeros e incubado a 37°C por 1 hora. Después de este período las superficies poliméricas fueron lavadas con solución tampón PBS (0,1 M; pH 7,4) para remover las plaquetas que no quedaron adheridas a la superficie de los polímeros. La etapa siguiente fue adicionar sobre la superficie de cada muestra 50 µL de solución Triton-X100 (1% v/v) dejando esta solución en contacto con el material durante 5

min a la temperatura ambiente (25°C) para desprender las plaquetas adheridas, e inmediatamente evaluar la actividad LDH a través de medidas de la absorción óptica a 340 nm. Las medidas de absorbancia fueron realizadas a intervalos de 1 minuto y la actividad LDH fue calculada de acuerdo con el procedimiento indicado en el kit utilizado.

Tromboresistencia. La tromboresistencia de las superficies de los materiales fue evaluada por el método adaptado de la cinética del tiempo de coagulación [25,26]. La sangre fue colectada de un voluntario saludable y adicionada 0,5 mL sobre la superficie de cada material. Después de un período predeterminado comprendido entre 5 y 60 minutos, los materiales fueron transferidos para placas de *Petri* con 20 mL de PBS, pH 7,4, y fueron incubados durante 5 minutos a 37°C. Las células rojas de la sangre, que no quedaron adheridas en la superficie del material fueron hemolisadas, y la hemoglobina libre foi dispersada en agua destilada a 25°C. La concentración de hemoglobina libre fue medida a través de la espectroscopia UV-Vis por medidas de la absorbancia a 540 nm. Los valores de absorbancia fueron graficados en función del tiempo de contacto con la sangre. Los resultados obtenidos corresponden al valor medio de tres medidas ($n = 3$).

Adsorción protéica. Para este ensayo fueron utilizadas las proteínas séricas, albúmina humana (HSA) y fibrinógeno humano (HFb) (*Sigma-Aldrich*). Inicialmente fueron preparadas soluciones de las proteínas HSA y HFb de concentración 0,1 mg/mL en solución tampón PBS (10 mM, pH 7,4).

En células de adsorción de *Teflon*[®] con la muestra polimérica fue inyectada inicialmente la solución de PBS, para desplazar el aire y produzir un ambiente fisiológico para el estudio de la interacción entre las proteínas séricas y las superficies sintéticas. En seguida las células fueron termostatzadas a temperatura fisiológica (37°C). Una bomba peristáltica fue utilizada para la introducción de las soluciones protéicas en la célula de adsorción utilizando una velocidad de 500 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ con el objetivo de determinar la cinética de adsorción de las proteínas séricas en las superficies de los polímeros. Fueron utilizadas células individuales para cada proteína (HSA y HFb). La cinética del processo de adsorción fue estudiado durante tiempos predeterminados de 10, 30, 60, 90, y 120 minutos. Después de cada intervalo de tiempo fue extraída una alícuota de 50 μL de la solução de proteína contenida en la célula de adsorción. Las soluciones extraídas fueron mezcladas con 2 mL de solución de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB-G250) para el análisis cuantitativo de acuerdo con el método de *Bradford* [27]. La concentración de cada proteína en las células de adsorción después el contacto con las superficies poliméricas fue calculado utilizando una curva de calibración. La cantidad de proteína adsorbida en las superficies de los polímeros fue determinada por la substración de la concentración de proteína inicialmente adicionada a la concentración de proteína en el intervalo de tiempo de adsorción previamente establecido. Las

mediciones fueron realizadas por triplicado y analizadas estadísticamente utilizando el teste t de Student. La significancia estadística fue considerada en un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los materiales

Espectroscopia de infrarrojo (FTIR). Los materiales después del proceso de curado fueron inicialmente caracterizadas por medio de espectroscopia de infrarrojo. La Figura 1 muestra los espectros de FTIR de los polímeros. Los datos espectrales indican estructuras semejantes entre de los tres materiales y son observadas las bandas de adsorción características para este tipo de polímeros encontradas en la literatura [28]. Por ejemplo, bandas de adsorción en 3.387 cm^{-1} pertenecientes a la vibración del grupo hidroxilo —OH , y las bandas de adsorción en 2.911 y 2.865 cm^{-1} asociadas a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C—H del tipo sp^3 . Banda asociada al anillo cicloalifático en 1.451 cm^{-1} . Bandas de adsorción en 1.605 , 1.580 , y 1.508 cm^{-1} y en 827 cm^{-1} atribuidas al anillo aromático y a la sustituição 1.4. Las bandas de adsorción en 1.453 , 1.380 , 1.360 y 1.294 cm^{-1} asociadas a los grupos metilo y metileno. Bandas asociadas al grupo éter C—O—C en 236 y 1.031 cm^{-1} . Algo importante por mencionar es que no aparece la banda en 915 cm^{-1} que corresponde a la vibración fundamental del grupo epoxi. Estos resultados espectrales indican que todos los polímeros alcanzaron alta conversión, y que no son detectadas diferencias significativas entre los espectros de los polímeros.

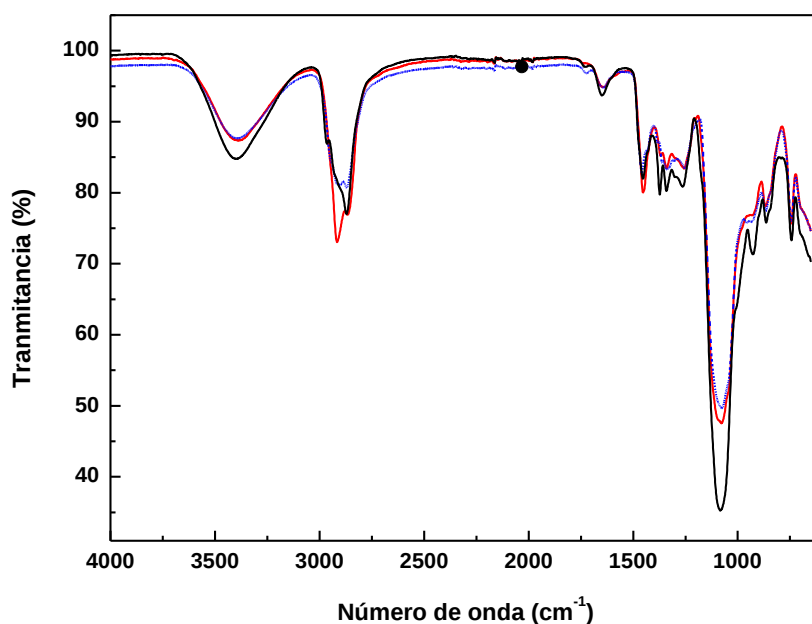


Figura 1. Espectros FTIR de los polímeros epoxídicos. DGEBA/3DCM (—), DGEBA/IPD (—) y DGEBA/4MPip (—).

Calorimetria diferencial de barrido (DSC). Las curvas de DSC del material DGEBA/3DCM se muestran en la Figura 2. Fue comprobado que después del primero y del segundo barrido el valor de T_g , (42°C) no cambia, y que no aparece calor residual (ΔH_R). Estos resultados indican que fue alcanzado un curado máximo, o mejor dicho, que la T_g del material llega a su valor máximo. Resultados semejantes se obtuvieron para los otros materiales, los que son mostrados en la Tabla 2. Los resultados espectrales y calorimétricos indican que el programa de curado utilizado para cada polímero resulta adecuado y se alcanza alta conversión.

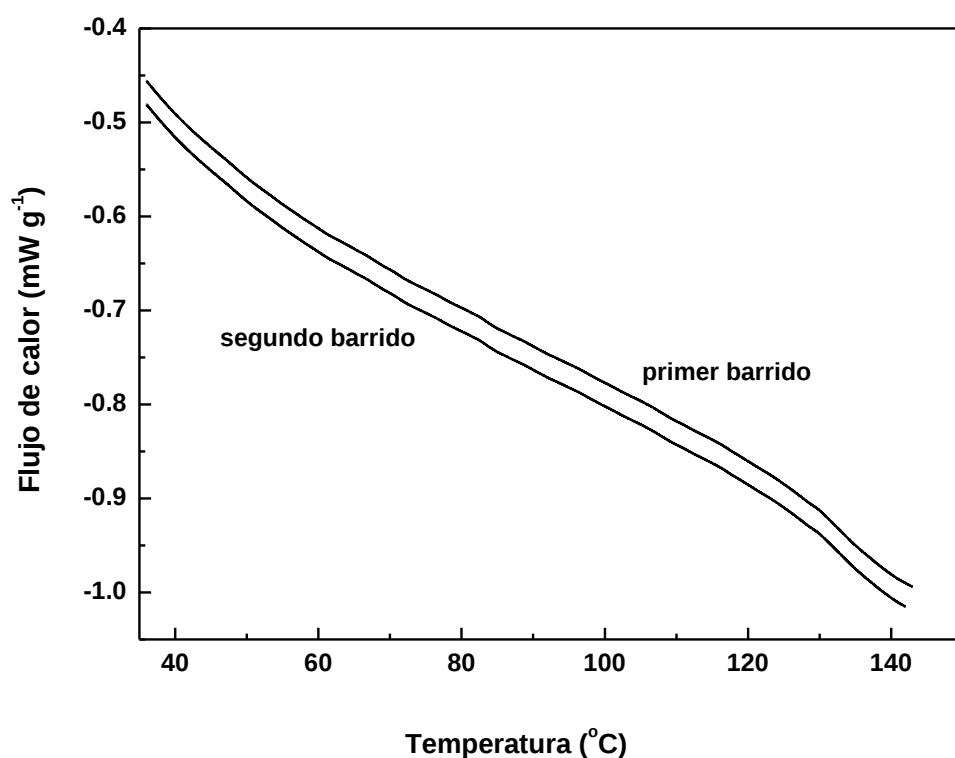


Figura 2. Curvas de DSC para el polímero DGEBA/3DCM, después del programa de curado.

Tabla 2. Temperatura de transición vítrea (T_g) de los poliméricos determinada por DSC, después del programa de curado.

Polímeros epoxídicos	1^{er} barrido $T/^{\circ}\text{C}$	2^{do} barrido $T/^{\circ}\text{C}$
DGEBA/4MPip	55,5	55,3
DGEBA/IPD	100,2	100,3
DGEBA/3DCM	125,0	125,1

Ensayos biológicos *in vitro*

Adhesión de plaquetas y activación. La morfología de las plaquetas observadas en las

imagenes obtenidas por MEV usando ampliaciones de 1.000 y 3.000X son mostradas en las Figuras 3 y 4. La superficie del vidrio (Figura 3A y 3B) mostró el mayor número de plaquetas activas no dejando dudas de la presencia y agregación de plaquetas, gran número de mallas de fibrina y grande formación de trombos cuando comparada con la morfología de las superficies de los polímeros. Este resultado era esperado, pues el vidrio fue utilizado como control en estas experiencias, debido a sus propiedades trombogénicas bien conocidas [29,30].

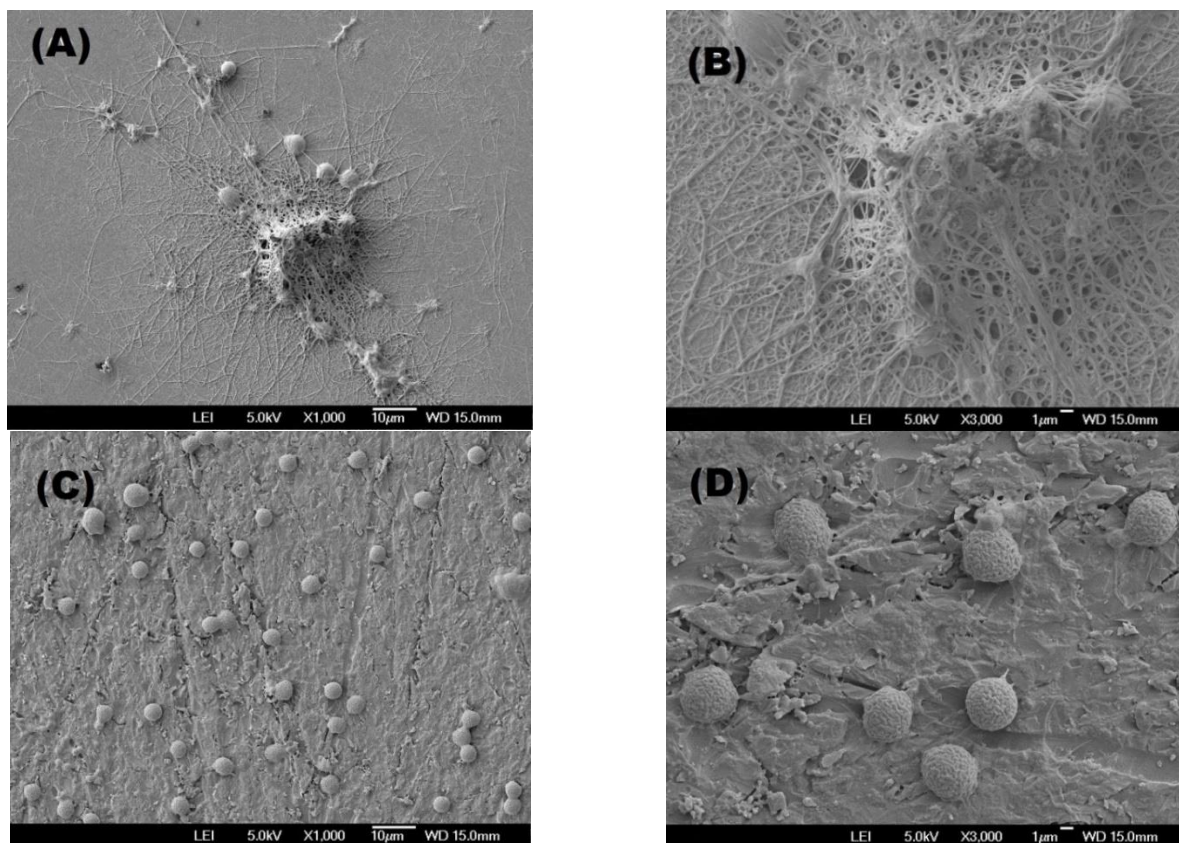
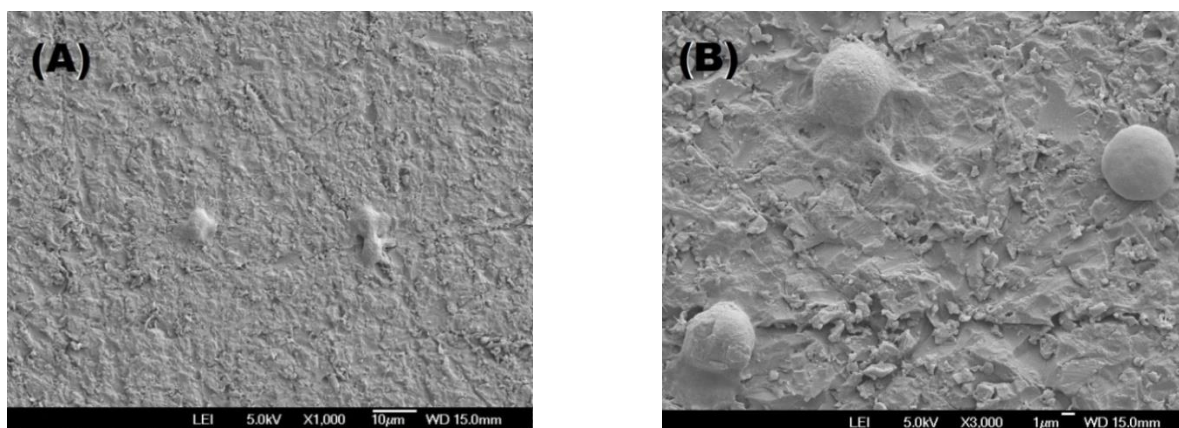


Figura 3. Micrografías MEV de las superficies del vidrio y del polímero DGEBA/IPD después de un tiempo de incubación de 180 s con la sangre: (A y B) – Vidrio y (C y D) – polímero DGEBA/IPD.



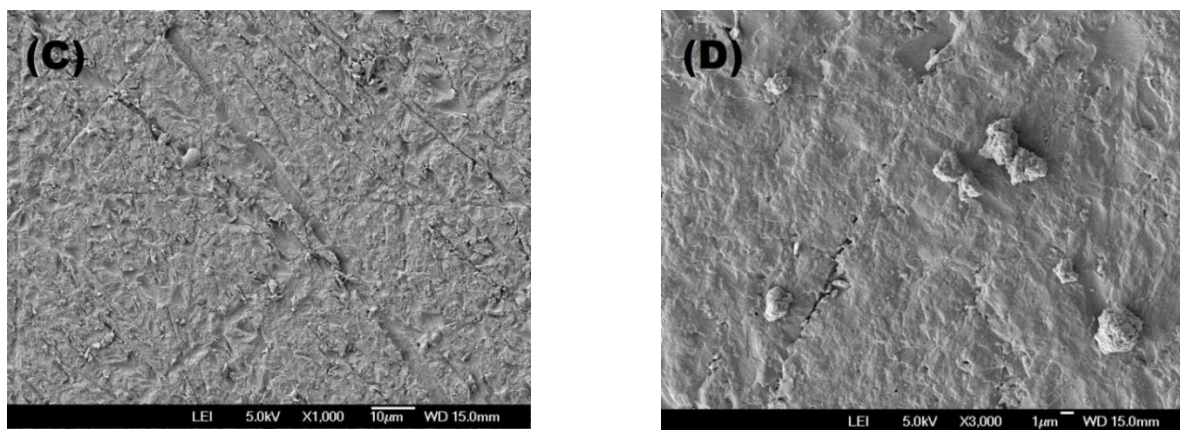


Figura 4. Micrografías MEV de las superficies de los polímeros DGEBA/4MPip, y DGEBA/4MPip después de un tiempo de incubación de 180 s con la sangre: (A y B) – polímero DGEBA/4MPip, y (C y D) – polímero DGEBA/3DCM.

La microscopia eletrónica de barrido de las superficies de los materiales DGEBA/IPD (Figura 3C y 3D) y DGEBA/3DCM (Figuras 4A y 4B) después del contacto con la sangre sugiere que estas superficies poliméricas presentan las propiedades más adecuadas de hemocompatibilidad considerando que las plaquetas adheridas exhiben morfologías con forma esférica, lo que indica una menor activação de su citoesqueleto. Las plaquetas de la sangre humana presentan de modo natural una estructura de forma discoidal. Después de la activación por el contacto con una superficie sintética, manifiestan una progressión de morfologías de formas discóides para esféricas, y después para dendríticas enteramente propagadas, como mencionado en la literatura [31–35].

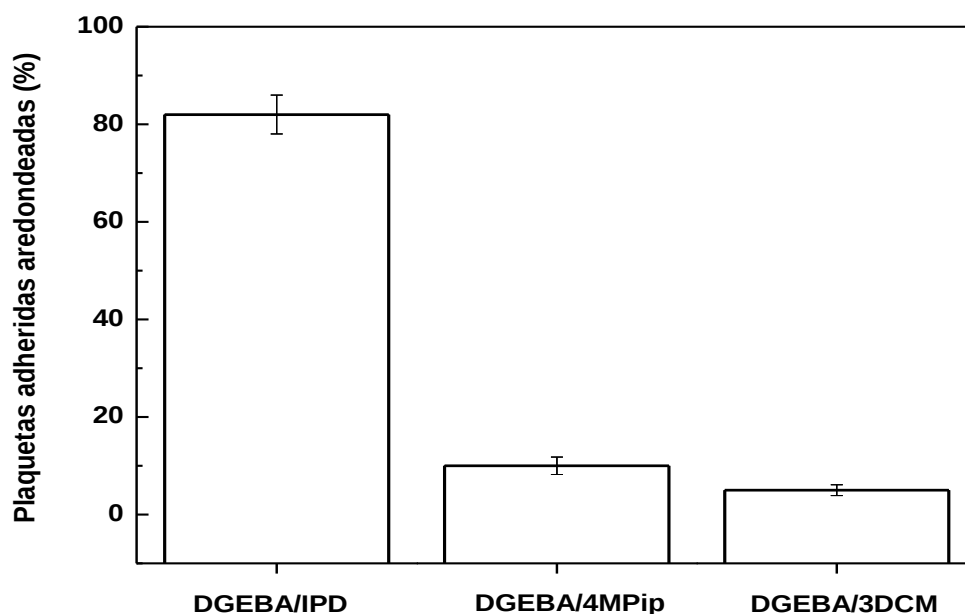


Figura 5. Porcentaje de plaquetas adheridas en la superficie de los polímeros con morfologías redondeadas después del contacto con la sangre.

La Figura 5 muestra el porcentaje de plaquetas adheridas con morfologías del tipo discóides/esféricas que son las más convenientes desde el punto de vista de una mayor hemocompatibilidad de una superficie sintética con la sangre [36]. El número total de plaquetas en cada imagen fue obtenido por la suma del número de plaquetas con estas morfologías, y los valores calculados son el resultado de la media de más de seis imágenes obtenidas de las superficies de cada material. Fue observado que el porcentaje de plaquetas con estas morfologías siempre fue mayor para el polímero DGEBA/IPD, lo que indica que este material presenta la mayor potencialidad de compatibilidad con la sangre.

Las plaquetas adheridas en las superficies de los materiales fue también evaluada por la actividad del lactato deshidrogenasa (LDH) con el objetivo de investigar el potencial de las superficies de los polímeros para capturar y activar las plaquetas. Niveles elevados de LDH están asociados a la adhesión de plaquetas y a la formación de agregados [37]. Los resultados de este ensayo son mostrados en la Figura 6.

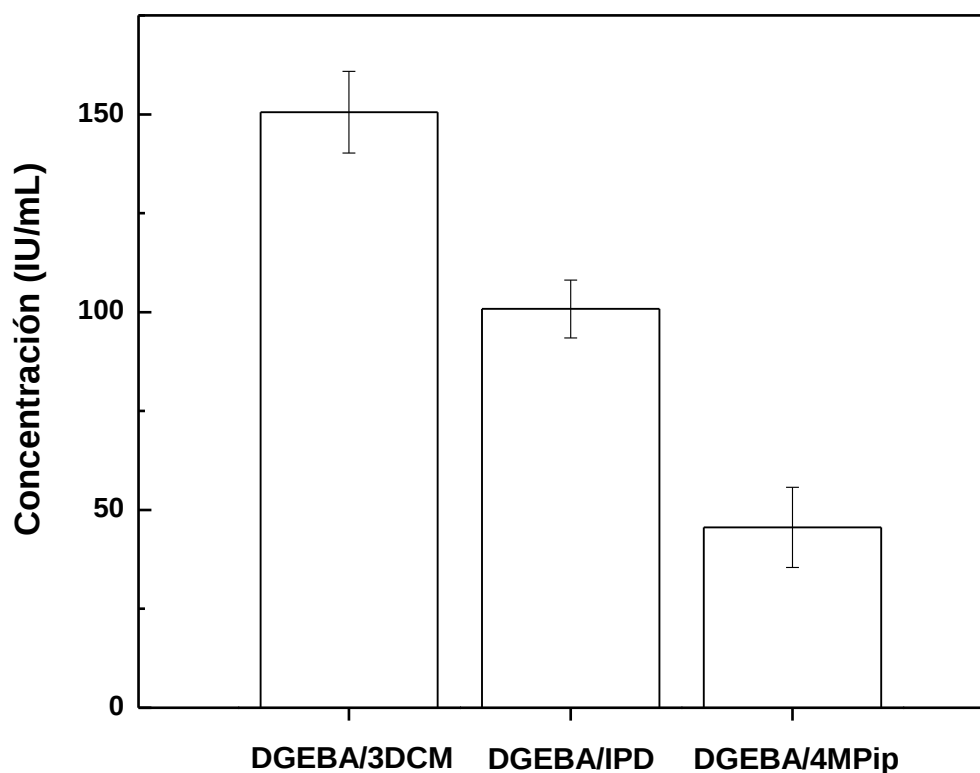


Figura 6. Plaquetas adheridas en las superficies de los polímeros. Determinado por el ensayo LDH.

La respuesta de la superficie de los materiales poliméricos determinada por el ensayo LDH indicó una mayor adsorción de plaquetas para los polímeros DGEBA/IPD y DGEBA/3DCM. En particular, la superficie del polímero DGEBA/4MPip mostró menor actividad. Sin embargo, esta superficie exhibe mayor activación y adhesión de plaquetas, lo que sugiere que este material es menos hemocompatible.

La topografía de las superficies de los materiales sintéticos ha sido considerada como un factor que afecta los niveles de adhesión de plaquetas. Superficies ásperas exhiben un aumento en la adsorción de fibrinogeno y adhesión de plaquetas inclusive en contacto con la sangre en cortos intervalos de tiempo [38]. La adhesión de plaquetas y la actividad (LDH) que exhiben los materiales DGEBA/IPD y DGEBA/3DCM no puede ser totalmente atribuida a su topografía, y puede estar relacionada a las características intrínsecas de cada material tales como; composición química, cristalinidad, hidrofobia y energía libre superficial [39].

La Figura 7 muestra el comportamiento de la coagulación de la sangre en las superficies de los polímeros y del vidrio utilizado como control. La absorbancia de la solución de hemoglobina hemolisada cambia con el tiempo de contacto, y cuanto mayor es el valor de absorbancia mayor es el trombo o coágulo formado. El tiempo de coagulación fue definido en el momento en que la absorbancia es igual a 0,1, y la observación de un tiempo de coagulación mayor indica mejor hemocompatibilidad.

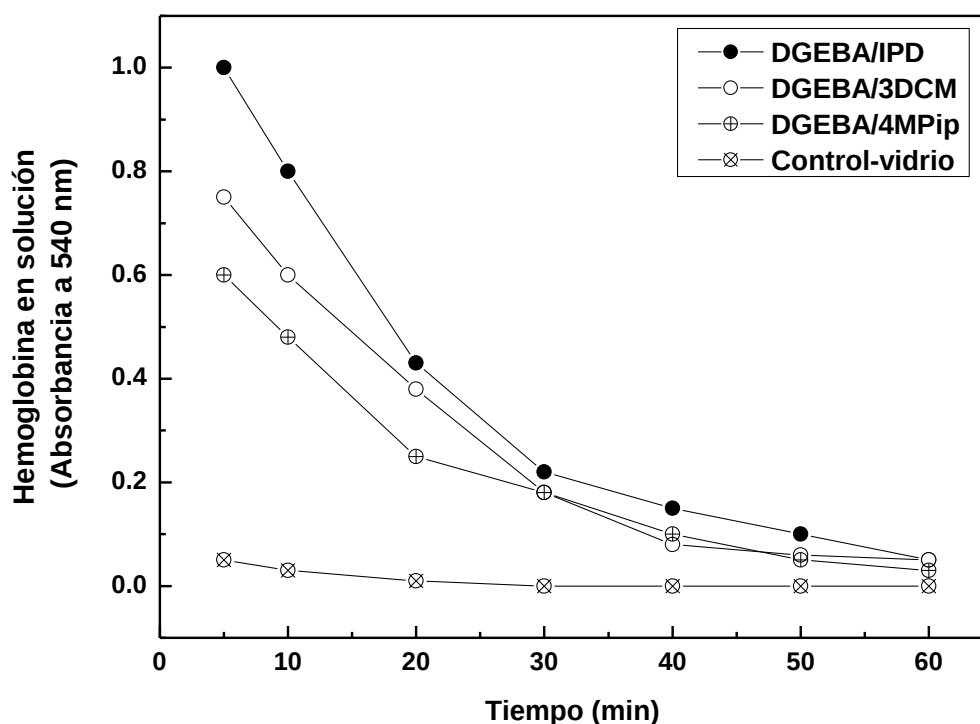


Figura 7. Formación de trombos en función del tiempo de exposición de la sangre en las superficies de los polímeros y del vidrio.

Los tiempos de coagulación de las superficies de los materiales DGEBA/IPD y DGEBA/3DCM resultaron mayores que el tiempo de coagulación de la superficie del material DGEBA/4MPip, indicando que la coagulación de estos dos materiales poliméricos resultan más lentas, lo que significa que son menos trombogénicos, o sea, más hemocompatibles. Estos resultados también indican que los materiales DGEBA/IPD y DGEBA/3DCM exhiben menor potencial para la activación por la vía extrínseca.

Adsorción de proteínas. Los resultados de este ensayo son mostrados en la Figura 8. La adsorción de las proteínas albúmina humana (HSA) y fibrinógeno humano (HFb) en la superficie de los materiales fueron estudiadas con el objetivo de examinar en las superficies poliméricas sintéticas la extensión de las interacciones con las proteínas séricas en solución fisiológica (PBS, pH 7,4). Cuando la superficie de un material sintético es colocada en contacto con la sangre, el primer evento que ocurre es la adsorción de las proteínas del plasma sobre la superficie, seguido de la adhesión de plaquetas y la activación [39,40].

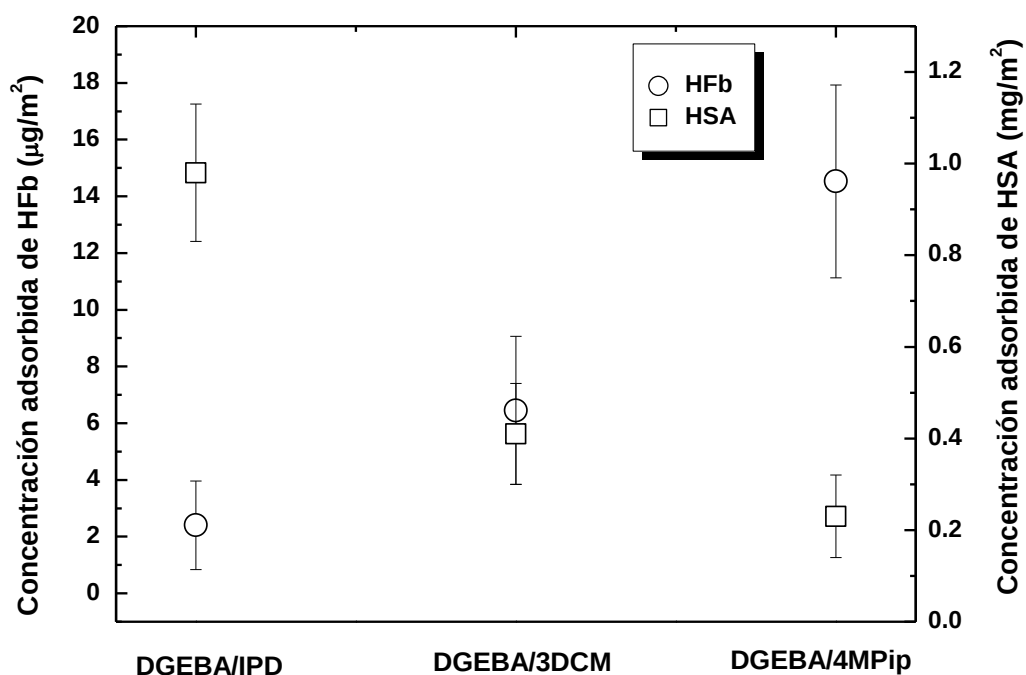


Figura 8. Concentración adsorbida de HSA y HFb en la superficie de los materiales poliméricos.

En la superficie del material DGEBA/IPD se ha observado una mayor adsorción de HSA cuando comparada a la adsorción de HFb, lo que sugiere un comportamiento notrombogénico [41]. La superficie del material DGEBA/3DCM mostró también una mayor adsorción de HSA cuando

comparada a la adsorción de HFb, más en este caso menos significativa cuando comparada a la adsorción del material DGEBA/IPD lo que sugiere un menor comportamiento notrombogénico. El material DGEBA/4MPip exhibe baja adsorción de HSA y mayor adsorción de HFb, lo que indica que este material presenta el comportamiento más trombogénico de los materiales estudiados.

La concentración y el tipo de proteínas de la sangre adsorbidas en la interface biomaterial/sangre, controla en gran parte la activación de las plaquetas sanguíneas inducidas por el contacto con el material sintético [42]. La adsorción de HFb en las superficies de los materiales sintéticos es conocida por acelerar la adhesión y la activación de las plaquetas, que por otra parte, la adsorción de albúmina (HSA) ayuda a inhibir la activación de plaquetas inicialmente adsorbidas en la superficie sintética, inhibiendo así la formación de coágulos o trombos [44]. Una mayor adsorción de HSA cuando comparada a la adsorción de HFb en la superficie de los materiales epoxídicos puede ser indicativo de una baja adhesión y activación de plaquetas por la superficie de estos polímeros. Los resultados obtenidos en este trabajo están en perfecto acuerdo con los estudios anteriores de nuestro grupo usando polímeros termorrígidos a base del monómero epoxídico del tipo éter diglicidílico del bisfenol A (DGEBA) curado con aminas alifáticas tales como, isoforona diamina (IPD) y 1-(2-aminoetil) piperazina (AEP) sin la adición del diluyente reactivo [14].

CONCLUSIONES

Fueron preparadas e evaluadas tres formulaciones epoxídicas modificadas con 30 phr de diluyente reactivo para evaluar sus propiedades biológicas en la intención de producir materiales para aplicaciones cardiovasculares. Los resultados de FTIR y DSC evidenciaron que con el programa de curado utilizado los polímeros alcanzan alta conversión. Los resultados de las interacciones biológicas *in vitro* entre la superficie de los polímeros sintéticos con la sangre mostraron alta adsorción de albúmina y baja adsorción de fibrinógeno, así como la supresión de activación de plaquetas, actividad del lactato deshidrogenasa (LDH) y buenas propiedades de tromboresistencia para los materiales DGEBA/IPD y DGEBA/3DCM indicando que estos polímeros son promisoros para aplicaciones cardiovasculares.

Agradecimientos. Los autores agradecen el financiamiento recibido por *FAPEMIG* a través de los Proyectos, No. APQ. 01736–11 y No. APQ. 00073–13, y el financiamiento recibido por *CNPq* a través del Proyecto; proceso No. 446735/2014–0.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cardiovascular diseases mortality. World Health Organisation, 2014. Tomada de http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/ncd/mortality/cvd/atlas.html.

- [2] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Prevenção clínica de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006
- [3] Park SJ, Park DW. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, **2**, 59 (2009)
- [4] Jakub P. *Journal of Rare Cardiovascular Diseases*, **1**, 28 (2013)
- [5] Belkacemi A, Agostino P, Voskuil M, Doevendans P, Stella P, *Interventional Cardiology*, **6**, 157 (2011)
- [6] Mani G, Felman MD, Patel D, Agrawa DC. *Biomaterials*, **28**, 1689 (2007)
- [7] Al-Mangour B, Mongrain R, Yue S. *Materials Sciences and Applications*, **4**, 606 (2013)
- [8] Kajzer W, Ktause A, Walke W, Marcianiak J, *J. Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, **31**, 247 (2008)
- [9] Köster R, Vieluf D, Kiehn M, Sommeaueuer M, Kähler J, Baldus S, Meinertz T, Hamm CW, *Lancet*, **356**, 1895 (2000)
- [10] Rodriguez G, Fernández-Gutiérrez M, Parra J, López-Bravo A, Honduvilla NG, Bujá J, Molina M, Duocastella L, *Biomacromolecules*, **11**, 2740 (2010)
- [11] Gallino E, Massey S, Tatoulian M, Mantovani D, *Surface and Coatings Technology*, **205**, 2461 (2010)
- [12] Crowder SW, Gupta MK, Hofmeister LH, Zachman AL, Sung HJ, *Acta Biomaterialia*, **8**, 559 (2012)
- [13] Bakhshi R, Darbyshire A, Evans JE, You Z, Lu J, Seifalian AM. *Colloids and Surfaces Part B: Biointerfaces*, **86**, 93 (2011)
- [14] González García F, Leyva ME, De Queiroz AAA, Higa OZ, *J. Appl. Polym. Sci.*, **112**, 1215 (2009)
- [15] Berreuet R, Vinard E, Calle A, Tighzert HL, Chanbert B, Magloire H, Eloy R. *Biomaterials*, **8**, 162 (1987)
- [16] Geckeler K, Wacker R, Maetini F, Hack A, Aicher W, *Celullar Physiology and Biochemistry*, **13**, 155 (2003)
- [17] Nischi C, Nakajima N, Ikada Y, *J. Biomedical Materials Research: Part A*, **29**, 829 (1995)
- [18] Kostoryz EL, Tong PY, Chappelow CC, Eick JD, Glaros AG, Yourtee DM, *Dental Materials*, **15**, 363 (1999)
- [19] González García F, Vicente TA, De Queiroz AAA, Higa OZ, Baratéla FJC, *Revista Matéria*, **21**, 118 (2016)
- [20] ASTM D 1652. Standard test methods for epoxy content of epoxy resins. American Society for Testing and Materials, 1997
- [21] González García F, Silva PM, Soares BG, Rieumont J. *Polymer Testing*, **26**, 95 (2007).
- [22] De Queiroz AAA, Barrak RB, Gil HAC, Higa O.Z. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, **8**, 667 (1997)
- [23] Forster HP, Ezekiel E, Grady C. *Lancet*, **358**, 1449 (2001)
- [24] Tamada Y, Kulik EA, Ikada Y. *Biomaterials*, **16**, 259 (1995)
- [25] Imai Y, Nose Y. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, **6**, 165 (1972)
- [26] Chena JY, Lenga YX, Tiana XB, Wanga LP, Hunga N, Chua PK, Yang P, *Biomaterials*, **23**, 2545 (2002)
- [27] Bradford M. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248 (1976)
- [28] Lee H, Neville K “Characterization of epoxy–resin curing–agent systems” en “*Handbook of Epoxy Resins*”, chapter 6, McGraw–Hill, 1967
- [29] Ruckenstein E, Marmur A, Rakower SR. *Thrombosis and Haemostasis*, **36**, 334 (1976).
- [30] Packham MA, Evans G, Glynn MF, Mustard JF, *J. Laboratory & Clinical Medicine*, **73**, 686 (1969)
- [31] Gemmell C, Ramirez S, Yeo E, Sefton M, *J. Laboratory and Clinical Medicine*, **125**, 276 (1995)
- [32] Allen RD, Zacharski LR, Widirstky ST, Rosenstein R, Zaitlin LM, Burgess DR. *The Journal of Cell Biological*, **83**, 126 (1979)
- [33] Goodman SL, Grasel TG, Cooper SL, Albrecht RM, *J. Biomedical Materials Research: Part A*, **23**, 105 (1989)
- [34] Goodman SL, Lelah MD, Lambrecht LK, Cooper SL, Albrecht RM, *Scanning Electron Microscopy*, **1**, 279 (1984)
- [35] De Queiroz AAA, Higa OZ, Alaves SB. *Artificial Organs*, **27**, 444 (2003)
- [36] Weisenberg BA, Mooradian DL, *J. Biomedical Materials Research*, **60**, 283 (2002)
- [37] Bagheri–Khoukenjani S, Mirzadeh H, *Progress in Biomaterials*, **1**, 1 (2012)
- [38] Nair MB, Varma HK, John A. *J. Tissue Engineering: Part A*, **15**, 1619 (2009)
- [39] Govindarajan T, Shandas R. *Polymer*, **6**, 2309 (2014)
- [40] Ratner BD, *J. Biomaterials Science Polymer Edition*, **11**, 1107 (2000)
- [41] Brash JL, *J. Biomaterials Science Polymer Edition*, **11**, 1135 (2000)
- [42] Xu L–Ch, Soman P, Agnihotri A, Siedlecki CA “Atomic force microscopy methods characterizing protein interactions with microphase–separated polyurethane biomaterials”, en Puleo DA, Bizios R

(editores.), Biological Interactions on Materials Surface: Understanding and Controlling Protein, Cell and Tissue Response, chapter 3, Springer Publishers, 1999

[43] Wolf MF, Anderson MJ “*Practical approach to blood compatibility assessments: General considerations and standards*” en Boutran JP (editor), Biocompatibility and Performance of Medical Devices, chapter 8, Whoodhead Publishers, 2012