



## MEMBRANAS DO TIPO FIBRAS OCAS DE POLI(ÉTER IMIDA) PARA APLICAÇÃO EM HEMODIÁLISE

Alana Melo dos Santos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: Alberto Claudio Habert  
Helen Conceição Ferraz

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2018

MEMBRANAS DO TIPO FIBRAS OCAS DE POLI(ÉTER IMIDA) PARA APLICAÇÃO  
EM HEMODIÁLISE

Alana Melo dos Santos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM  
ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof. Alberto Claudio Habert, Ph.D.

---

Prof<sup>a</sup>. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Dra. Maria Elizabeth Ferreira Garcia, D.Sc

---

Prof. Tiago Albertini Balbino , D.Sc.

---

Prof. Maurício Younes-Ibrahim, Ph.D.

---

Prof<sup>a</sup>. Sônia Maria Malmonge, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL  
DEZEMBRO DE 2018

Santos, Alana Melo dos

Membranas do Tipo Fibras Ocas de Poli(éter imida) para Aplicação em Hemodiálise/ Alana Melo dos Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XVII, 204 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Alberto Claudio Habert

Helen Conceição Ferraz

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 162-182.

1. Hemodiálise. 2. Fibras ocas. 3. Heparina. 4. Hemocompatibilidade. I. Habert, Alberto Claudio, *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

# AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo dom da vida, por me dar forças diante às dificuldades e por ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas que tornaram possível a concretização desse trabalho.

Agradeço a meus pais, José Benedito e Maria Margareth, pelo apoio, incentivo, carinho e amor incondicionais. Ao meu irmão Luiz Arthur, que sempre foi um espelho para mim, por sua inteligência em diversas áreas de conhecimento. Ao meu namorado, Gustavo Nunes, pelo apoio e incentivo, mesmo à distância em muitos momentos.

Aos meus orientadores, Claudio Habert e Helen Conceição, por acreditarem no meu trabalho e por toda orientação recebida durante mais de seis anos, entre mestrado e doutorado. Pela disposição em ajudar e por não terem desistido do trabalho quando passei para o regime parcial e a finalização da tese pareceu distante.

À professora Andrea Rodas, da Universidade Federal do ABC, pela disponibilidade e ajuda com a metodologia das análises de compatibilidade sanguínea. Sem nem me conhecer, tirou diversas dúvidas sempre com muito boa vontade. Ao professor Carlos Arthur Almeida, do Laboratório de Diagnósticos de Doenças Complexas e Terapia Celular/ Hematologia Clínica (LADITEC), da Universidade Federal de Alagoas, por viabilizar a realização das análises de hemocompatibilidade, por ajudar na execução das mesmas e por toda a ajuda nessa parte do trabalho, que fugia do meu conhecimento prévio. Palavras não são suficientes para agradecê-lo e sem dúvidas que este momento só foi possível graças ao seu apoio. Muito obrigada! Não posso deixar de agradecer também aos alunos do LADITEC por toda ajuda prestada, aos Laboratórios de Bioquímica e Fisiologia, de Farmacognosia, de Tecnologia e Controle de Medicamentos e de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas – TecNano pelo uso de equipamentos e a todos os alunos desses laboratórios, que ajudaram direta e indiretamente para que tudo desse certo.

À professora Sônia Malmonge, ao professor Tiago Balbino, ao professor Maurício Younes-Ibrahim e à Beth Garcia por aceitarem fazer parte da banca examinadora, mesmo com as diversas atividades de final de ano.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Processos com Membranas (PAM): Mariana Paixão, Rui Carlo, Roberto Bastos (Bob), Vivianne Rufino, Marcela Angarita, Flávia Monteiro, Caroline Fioravante, Maíra Andrade, Marcos Giro. Obrigada pela amizade e pelos momentos vividos no laboratório.

Às amigas Cátia Regina, Omayra Ferreiro e Karla Licon por tornarem sempre mais leve cada viagem ao Rio e por toda ajuda na reta final do trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos Betânia Vieira, Cícera Iva, João Victor Nicolini, Paola Borda, Sandra Cao, Aiany e Élder Bendinelli, Rafael Marinho e Lúgia Gonzaga, que estiveram presentes em tantos momentos e sempre torceram pelo meu sucesso.

Agradeço a Rejane e Ricardo Garcia por me hospedarem tantas vezes depois da mudança para Suzano, sempre com muito carinho e cuidado, e à Aline Marques e Rafael Marinho, por tantas caronas. Aqui também devo muito agradecimento à Karla Licona e à Omayra Ferreiro, que sempre estiveram de portas abertas a me receber. Muito obrigada!

Ao Grupo de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT), pelas análises de ângulo de contato, de potencial zeta e pelo uso do espectrofotômetro. Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Varredura e Microanálise, do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da COPPE e ao Instituto Nacional de Tecnologia (INT), pelas análises de microscopia.

Aos colegas professores do IFSP – Suzano pela ajuda na reta final do trabalho, em especial ao Rodrigo Marcon, coordenador do curso de Processos Químicos, pelo apoio quando cheguei no Instituto e pela flexibilidade no horário das aulas atribuídas para que possibilitasse a dedicação aos experimentos da tese.

Agradeço aos meus mais fiéis companheiros, Carioca e Nega (meus gatos), melhor presente da temporada no Rio de Janeiro. Participaram da dissertação e agora da tese e acompanharam tão de perto a etapa de escrita, que devem ter um conhecimento amplo sobre membranas e hemodiálise.

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

## MEMBRANAS DO TIPO FIBRAS OCAS DE POLI(ÉTER IMIDA) PARA APLICAÇÃO EM HEMODIÁLISE

Alana Melo dos Santos

Dezembro/2018

Orientadores: Alberto Claudio Habert  
Helen Conceição Ferraz

Programa: Engenharia Química

A hemodiálise é o tratamento mais utilizado em casos de doenças renais crônicas. Apesar de consolidado, ainda apresenta algumas limitações, como a baixa remoção de moléculas de tamanho médio e a baixa biocompatibilidade das membranas utilizadas durante o procedimento. Portanto, esta tese objetiva a síntese e caracterização de membranas na geometria fibra oca, hemocompatíveis, visando à sua aplicação em hemodiálise. Foram avaliados os efeitos de variáveis operacionais e condições de síntese na obtenção fibras ocas de poli(éter imida) e poli(vinil pirrolidona) (PEI/PVP), e realizada sua modificação superficial, através da ligação covalente de heparina. Foram obtidas fibras ocas funcionalizadas com propriedades de transporte comparáveis às dos dialisadores comerciais de alto fluxo, com permeabilidade hidráulica de 63,8 L/h.m<sup>2</sup>.bar, e com melhor remoção de solutos de média massa molecular. A modificação superficial resultou na obtenção de membranas mais hidrofílicas (ângulo de contato reduziu de 76,5° para 58,5°), com redução da ocorrência de adsorção de proteínas em mais de 50%; em contato com sangue, reduziram a ocorrência de adesão de plaquetas, aumentaram o TTPA de 34 s para 46 s, e não causaram a ativação do sistema complemento. Esses resultados indicam que as membranas modificadas apresentam características antitrombogênicas e de biocompatibilidade, as quais são desejadas para utilização como material de confecção dos filtros de hemodiálise.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

## HOLLOW FIBERS POLYETHERIMIDE MEMBRANES FOR HEMODIALYSIS APPLICATION

Alana Melo dos Santos

December/2018

Advisors: Alberto Claudio Habert  
Helen Conceição Ferraz

Department: Chemical Engineering

Hemodialysis is the most commonly used treatment for chronic kidney disease. Although consolidated, it still presents some limitations, such as the low removal of medium sized molecules and the low biocompatibility of the membranes used during the procedure. Therefore, this study aims at the synthesis and characterization of hemocompatible hollow fiber membranes to application in hemodialysis. The effects of operational variables and synthesis conditions on the production of hollow fibers of polyetherimide and polyvinylpyrrolidone (PEI/PVP) were evaluated and their surface modification was carried out through the covalent attachment of heparin. Transport properties of functionalized hollow fibers were comparable to commercial high flux dialysers, presenting hydraulic permeability of 63,8 L/h.m<sup>2</sup>.bar, with better removal of medium molecular weight solutes. The surface modification resulted in more hydrophilic membranes (contact angle reduced from 76.5° to 58.5°), reducing the occurrence of protein adsorption by more than 50%; in contact with blood, these membranes reduced the occurrence of platelet adhesion, increased APTT from 34 s to 46 s, and did not lead to the complement system activation. These results indicate that the modified membranes have antithrombogenic and biocompatibility characteristics, which are desired for materials of the hemodialysis filters.

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
1.2. OBJETIVOS.....	3
1.3. ORGANIZAÇÃO DA TESE .....	3
<b>CAPÍTULO 2 – PRINCÍPIOS BÁSICOS DE HEMODIÁLISE</b> .....	<b>5</b>
2.1. DOENÇAS RENAIIS .....	7
2.2. TRATAMENTOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM FASE TERMINAL.....	9
<b>2.2.1. Transplante Renal</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.2. Diálise Peritoneal</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.3. Hemodiálise</b> .....	<b>14</b>
2.2.3.1. <i>Transferência de massa em diálise</i> .....	19
2.2.3.2. <i>Transferência de massa em hemodiálise</i> .....	24
2.2.3.3. <i>Toxinas urêmicas</i> .....	26
2.3. MEMBRANAS DE HEMODIÁLISE .....	29
<b>CAPÍTULO 3 – BIOCAMPATIBILIDADE E MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL</b> .....	<b>36</b>
3.1. MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL: AUMENTO DA BIOCAMPATIBILIDADE .....	40
<b>3.1.1. Mistura Física</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1.2. Recobrimento da Superfície</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1.3. Imobilização de Albumina</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1.4. Imobilização de Anticoagulantes</b> .....	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 4 - SÍNTESE DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS</b> .....	<b>58</b>
4.1. O MÉTODO DA INVERSÃO DE FASE .....	58
<b>4.1.1. Mecanismo de formação de membranas</b> .....	<b>60</b>
3.1.1.1. <i>Trajetórias de Precipitação</i> .....	61
<b>4.1.2. Síntese de fibras ocas por imersão-precipitação</b> .....	<b>68</b>
<b>4.1.3. Síntese de membranas de Poli(éter imida)</b> .....	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 5 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>79</b>
5.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS .....	79
5.2. SÍNTESE DE MEMBRANAS .....	80
5.3. SÍNTESE DOS MÓDULOS DE FIBRAS OCAS .....	83
5.4. MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL.....	84
<b>5.4.1 Quantificação de Albumina Imobilizada</b> .....	<b>87</b>
<b>5.4.2. Quantificação da Heparina Imobilizada</b> .....	<b>88</b>
5.5. TESTES DE CARACTERIZAÇÃO .....	89



5.5.1. Análise morfológica .....	89
5.5.2. Permeabilidade hidráulica .....	90
5.5.3. Coeficiente de rejeição de solutos urêmicos, lisozima e albumina .....	92
5.5.4. Remoção de ureia e <i>clearance</i> .....	94
5.5.5. Caracterização das superfícies das membranas .....	96
5.5.5.1. Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) .....	96
5.5.5.2. Hidrofilicidade .....	96
5.5.5.3. Potencial zeta .....	98
5.5.5.4. Adsorção de proteínas .....	100
5.5.6. Análise da hemocompatibilidade .....	100
5.5.6.1. Tempo de protrombina (TP) .....	101
5.5.6.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) .....	103
5.5.6.3. Hemólise .....	105
5.5.6.4. Adesão de Plaquetas .....	107
5.5.6.5. Sistema Complemento .....	109
<b>CAPÍTULO 6 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS OCAS DE POLI(ÉTER IMIDA) PARA HEMODIÁLISE .....</b>	<b>110</b>
6.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	110
6.2. PROPRIEDADES DE TRANSPORTE .....	118
6.2.1. Permeabilidade hidráulica .....	118
6.2.2. Rejeição de solutos urêmicos, lisozima e albumina .....	120
6.2.3. Remoção de ureia .....	123
6.3. CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL .....	126
6.3.1. Adsorção de proteína .....	126
6.4. CONCLUSÕES PRELIMINARES .....	128
<b>CAPÍTULO 7 – MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DAS FIBRAS .....</b>	<b>130</b>
7.1. AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS PROPOSTAS .....	130
.....	134
7.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	134
8.3. QUANTIFICAÇÃO DE HEPARINA IMOBILIZADA .....	135
7.5. REJEIÇÃO DE SOLUTOS URÊMICOS E DE LISOZIMA E ALBUMINA .....	137
7.6. REMOÇÃO DE UREIA e <i>CLEARANCE</i> .....	139
7.7. CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL .....	140
7.7.1. Espectroscopia de Infravermelho (ATR-FTIR) .....	140
7.7.2. Hidrofilicidade .....	143
7.7.4. Potencial zeta .....	147
7.8. HEMOCOMPATIBILIDADE .....	148

7.8.1. Tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).....	148
7.8.2. Atividade hemolítica .....	152
7.8.3. Adesão de Plaquetas .....	153
7.8.4. Sistema Complemento.....	157
7.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	158
<b>CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .</b>	<b>159</b>
8.1. CONCLUSÕES.....	159
8.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	161
<b>CAPÍTULO 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>162</b>
<b>ANEXO A – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE SÍNTESE DAS FIBRAS OCAS ..</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO B - CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZADAS NAS CARACTERIZAÇÕES DAS MEMBRANAS.....</b>	<b>186</b>
B.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA UREIA.....	186
B.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CREATININA.....	186
B.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO FOSFATO .....	187
B.4. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VITAMINA B12 .....	187
B.5. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA LISOZIMA .....	188
B.6. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ALBUMINA .....	188
B.7. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HEPARINA .....	189
<b>ANEXO C – DOCUMENTOS DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA PARA REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES COM SANGUE HUMANO.....</b>	<b>190</b>
C.1. COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO.....	190
C.2. PARECER DE APROVAÇÃO.....	191
C.3. MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO UTILIZADO .....	192
<b>ANEXO D – ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>196</b>

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Esquema dos rins no corpo humano. Fonte: National Cancer Institute (2001) .....	5
<b>Figura 2.2.</b> Esquema do néfron, a unidade funcional do rim, e seus constituintes. Fonte: CNX OpenStax (2013). .....	7
<b>Figura 2.3.</b> Número de transplantes renais realizados no Brasil (2007 – 2017) por milhão de população (pmp). Fonte: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) (2017). *Dados de 2017 obtidos por projeção anual (dados disponíveis até setembro/2017).....	10
<b>Figura 2.4.</b> Esquema da diálise peritoneal. Fonte: Adaptado de Mayo Foundation for Medical Education and Research (2017). .....	11
<b>Figura 2.5.</b> Comparação do número de pacientes tratados por hemodiálise (HD) e diálise peritoneal (PD) nos quinze países com mais pacientes em tratamento dialítico. Fonte: Adaptado de Fresenius Medical Care (2013). .....	13
<b>Figura 2.6.</b> Tratamentos dialíticos de pacientes do Brasil. Fonte: Adaptado de Sesso <i>et al.</i> (2017). *Realizada numa frequência maior que quatro vezes por semana.....	14
<b>Figura 2.7.</b> Esquema do tratamento renal por hemodiálise. Fonte: Mrabet (2008) .....	15
<b>Figura 2.8.</b> Detalhe de um dialisador comercial. Fonte: Vacchi (2012). .....	16
<b>Figura 2.9.</b> Mecanismos de transferência de soluto em hemodiálise (a) difusão de solutos em maior concentração no compartimento do sangue para o do dialisato e do compartimento do dialisato para o do sangue (b) convecção devido à pressão hidrostática aplicada ao compartimento do sangue. Fonte: Adaptado de Yeun e Depner (2010). .....	18
<b>Figura 2.10.</b> Perfil de concentração da diálise sem resistência da camada limite.....	20
<b>Figura 2.11.</b> Perfil de concentração da diálise com resistência das camadas-limite... ..	21
<b>Figura 2.12.</b> Permeabilidade difusiva e coeficiente de reflexão em função da massa molar do soluto para uma membrana de diálise típica. Fonte: HO e SIRKAR (1992)..	23
<b>Figura 2.13.</b> <i>Clearances</i> dos principais solutos urêmicos para membranas de hemodiálise e para o rim normal. Fonte: SANTOS (2014). .....	25
<b>Figura 2.14.</b> Evolução do uso de membranas celulósicas e sintéticas ao longo dos anos. Fonte: Adaptado de Fresenius Medical Care (2014). .....	30
<b>Figura 2.15.</b> Fotomicrografia da seção transversal de uma membrana de hemodiálise de (a) polissulfona e de (b) EVAL. Fonte: Yamashita e Sakurai (2015). ( <i>Reprodução permitida</i> ).....	31

<b>Figura 3.1.</b> Eventos relacionados à exposição do sangue a um material “estranho”. Fonte: SANTOS (2014).....	37
<b>Figura 3.2.</b> Estrutura proposta da superfície da membrana de PAN recoberta com o copolímero dibloco. Fonte: Adaptado de Matsuda e Ito (1994). ....	44
<b>Figura 3.3.</b> Membrana de polissulfona modificada com vitamina E. Fonte: Adaptado de Sasaki (2006).....	46
<b>Figura 3.4.</b> Repulsão estérica de proteínas do plasma em superfície modificadas com polímeros solúveis em água. Fonte: Adaptado de AMIJI e PARK (1993).....	47
<b>Figura 3.5.</b> Esquema da imobilização da albumina na superfície da membrana. Fonte: Adaptado de Liu <i>et al.</i> (2009).....	48
<b>Figura 3.6.</b> Esquema do recobrimento de polidopamina em membrana de PE, seguido da imobilização de albumina. Fonte: Adaptado de Zhu et al. (2011). ....	50
<b>Figura 3.7.</b> Estrutura de anticoagulantes. Fonte: Adaptado de IRFAN e IDRIS (2015). .....	51
<b>Figura 3.8.</b> Esquema da ação anticoagulante da heparina imobilizada. Fonte: Adaptado de Gambro Lundia AB (2010). ....	53
<b>Figura 4.1.</b> Transferência de massa entre solvente e não solvente na técnica de precipitação por imersão ( $J_S$ : fluxo de solvente; $J_{NS}$ : fluxo de não solvente).....	59
<b>Figura 4.2.</b> Esquema do diagrama ternário típico utilizado para descrever a formação de membranas por imersão-precipitação. Fonte: Adaptado de Baker (2004).....	60
<b>Figura 4.3.</b> Diagrama de fases ternário utilizado para descrever o processo de formação de membranas pela técnica de inversão de fases. Fonte: Adaptado de BAKER (2004). .....	62
<b>Figura 4.4.</b> Micrografia eletrônica de membrana plana de poli(éter imida) e poli(vinil pirrolidona) (a) de poros abertos (b) de poros fechados (c) em rede (d) pele densa suportada por camada porosa. Fonte: Arquivo pessoal do autor. ....	64
<b>Figura 4.5.</b> Diagrama ternário e trajetórias típicas na formação de membranas por imersão-precipitação. Fonte: Adaptado de Domingues (2017).....	65
<b>Figura 4.6.</b> Micrografia eletrônica de membrana densa isotrópica de poli(éter imida). Fonte: Acervo pessoal do autor. ....	65
<b>Figura 4.7.</b> Micrografia eletrônica de membrana plana com macrovazios em forma alongada. Fonte: Acervo pessoal do autor.....	66
<b>Figura 4.8.</b> Efeito da concentração de polímero na síntese de membranas de poli(éter imida) (a) 20% (b) 25% (c) 30%. Fonte: Adaptado de Ahmad <i>et al.</i> (2017).....	67

<b>Figura 4.9.</b> Esquema da extrusora com duas saídas concêntricas anulares na síntese de fibras ocas por extrusão da solução. A distância extrusora-banho (DEB) é controlável. ....	69
<b>Figura 4.10.</b> Esquema do equipamento de síntese de fibras por extrusão da solução polimérica. ....	70
<b>Figura 4.11.</b> Fórmula estrutural da resina PEI Ultem 1000®. Fonte: NEUROtiker (2008). ....	72
<b>Figura 5.1.</b> Estruturas dos componentes das soluções poliméricas. ....	79
<b>Figura 5.2.</b> Detalhe da extrusora utilizada no sistema de fiação por extrusão da solução polimérica. ....	81
<b>Figura 5.3.</b> Etapas da síntese de membranas planas por espalhamento. (a) Solução polimérica sendo vertida na placa de vidro; (b) Espalhamento com faca de espessura controlada; (c) Exposição ao ar ambiente; (d) Imersão no banho de precipitação. ....	83
<b>Figura 5.4.</b> Módulo de permeação e detalhe da extremidade cortada para conexão da alimentação. ....	84
<b>Figura 5.5.</b> Esquema proposto para reação de modificação superficial através da Metodologia 1. ....	85
<b>Figura 5.6.</b> Esquema proposto para reação de modificação superficial através da Metodologia 2. ....	86
<b>Figura 5.7.</b> Esquema proposto para a reação de modificação superficial através da Metodologia 3. ....	87
<b>Figura 5.8.</b> Esquema do sistema de permeação para determinação da permeabilidade hidráulica. ....	91
<b>Figura 5.9.</b> Esquema do sistema de permeação das membranas planas. ....	92
<b>Figura 5.10.</b> Esquema do sistema utilizado nos testes de diálise. ....	95
<b>Figura 5.11.</b> Ilustração dos ângulos de contato formados por gotas de líquido em superfície lisas. Fonte: Yuan e Lee (2013). ....	97
<b>Figura 5.12.</b> Goniômetro OCA 15. ....	98
<b>Figura 5.13.</b> Esquema da realização dos testes de tempo de protrombina (a) Controle negativo (b) Plasma + Membrana antes da funcionalização (c) Plasma + Membrana após a funcionalização. ....	103
<b>Figura 5.14.</b> Passo a passo nas análises de TTPA (a) Controle negativo (b) Amostras das membranas antes e após a funcionalização e (c) Avaliação da liberação de heparina pela membrana. ....	105
<b>Figura 5.15.</b> Esquema de montagem do teste de hemólise (a) Controle negativo: Soro fisiológico + Sangue total a 5% (b) Soro fisiológico + Sangue total a 5% + Membrana	

antes da funcionalização (c) (b) Soro fisiológico + Sangue total a 5% + Membrana após a funcionalização (d) Controle positivo: Água Estéril + Sangue total a 5%.....	106
<b>Figura 5.16.</b> Esquema da montagem das membranas para a análise de adesão de plaquetas. Na imagem, M1 refere-se à membrana antes da modificação superficial, enquanto M2 refere-se à membrana após a funcionalização com heparina.....	108
<b>Figura 6.1.</b> Fotomicrografias das membranas do tipo fibras ocas sintetizadas com diferentes soluções poliméricas, utilizando água desmineralizada como líquido interno: (a) F1205A (b) F1210A (c) F1505A (d) F1510A.....	112
<b>Figura 6.2.</b> Fotomicrografias das membranas do tipo fibras ocas sintetizadas com diferentes soluções poliméricas, utilizando água desmineralizada e NMP (1:1 v/v) como líquido interno: (a) F1205AN (b) F1210AN (c) F1505AN (d) F1510AN.....	113
<b>Figura 6.3.</b> Detalhe da pele interna densa de todas as fibras sintetizadas (a) F1205A (b) F1205AN (c) F1210A (d) F1210AN (e) F1505A (f) F1505AN (g) F1510A (h) F1510AN. ....	115
<b>Figura 6.4.</b> Fotomicrografias de fibras ocas de uso clínico de hemodiálise (a) PSf (b) PES. ....	116
<b>Figura 6.5.</b> Rejeição aos solutos de média e alta massa molar das fibras sintetizadas e das fibras comerciais. ....	122
<b>Figura 6.6.</b> Resultados de Remoção de ureia para fibras sintetizadas e comerciais. ....	124
<b>Figura 6.7.</b> Quantidade de albumina adsorvida na superfície das fibras.....	127
<b>Figura 7.1.</b> Fibras ocas quebradiças após modificação com a metodologia EDA_24. ....	132
<b>Figura 7.2.</b> Esquema da reação da poli(éter imida) com poliaminas. Fonte: Albrecht <i>et al</i> (2006). ....	133
<b>Figura 7.3.</b> Esquema da imobilização de heparina na superfície da membrana de Poli(éter imida). Fonte: Adaptado de Ren <i>et al.</i> (2013). ....	134
<b>Figura 7.4.</b> Fotomicrografias das membranas do tipo fibras ocas F1205AN antes e depois da modificação superficial: (a) Antes da modificação (b) Após a modificação. ....	134
<b>Figura 7.5.</b> Rejeição de lisozima e de albumina antes e após a modificação superficial. ....	138
<b>Figura 7.6.</b> Remoção de ureia antes e após a modificação superficial. ....	140
<b>Figura 7.7.</b> Espectro da membrana antes da modificação superficial com heparina. ....	141
<b>Figura 7.8.</b> Espectro da membrana após a modificação superficial com heparina. ..	142
<b>Figura 7.9.</b> Gotas de água formadas na análise do ângulo de contato das membranas antes e após a modificação superficial (a) Antes da modificação (b) Ativada com grupos amino e (c) Após a introdução de heparina.....	144

<b>Figura 7.10.</b> Absorção de água nas membranas do tipo fibra oca antes e após a modificação com heparina. ....	145
<b>Figura 7.11.</b> Adsorção de albumina na superfície das fibras antes e após a introdução de heparina em sua superfície. ....	146
<b>Figura 7.12.</b> Variação do potencial zeta em função do pH da solução de KCl 1 mM das membranas de PEI/PVP antes e após a funcionalização com heparina. ....	147
<b>Figura 7.13.</b> Resultados das análises do tempo de protrombina. Membrana 1: antes da funcionalização e Membrana 2: após a funcionalização com heparina. ....	149
<b>Figura 7.14.</b> Resultados das análises do tempo de tromboplastina parcial ativada. Membrana 1: antes da funcionalização e Membrana 2: após a funcionalização com heparina.....	149
<b>Figura 7.15.</b> Resultados de TTPA no desenho experimental em que a membrana é retirada do plasma antes de induzir à coagulação. ....	151
<b>Figura 7.16.</b> Percentual de hemólise calculado para as membranas. Membrana 1: Antes da modificação superficial e Membrana 2: após a modificação superficial. ....	153
<b>Figura 7.17.</b> Fotomicrografias da superfície de amostras das membranas antes da funcionalização, mostrando que há adesão de plaquetas.....	155
<b>Figura 7.18.</b> Fotomicrografias da superfície de amostras das membranas após a funcionalização, mostrando que adesão de plaquetas é muito reduzida.....	156

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Solutos presentes na solução de diálise. ....	17
<b>Tabela 2.2.</b> Solutos acumulados na uremia e seu efeito de toxicidade no organismo. Fonte: Adaptado de Yeun e Depner (2010). ....	27
<b>Tabela 2.3.</b> Trabalhos reportados na literatura sobre membranas para aplicação em hemodiálise. ....	35
<b>Tabela 3.1.</b> Trabalhos relacionados à modificação de superfícies com imobilização de heparina.....	56
<b>Tabela 4.1.</b> Alguns trabalhos reportados na literatura sobre síntese e aplicação de membranas de Poli(éter imida): 1980 – 2018. ....	77
<b>Tabela 5.1.</b> Condições experimentais utilizadas na síntese das fibras ocas. ....	82
<b>Tabela 5.2.</b> Concentrações e massas molares dos solutos utilizados nos testes de ultrafiltração. ....	93
<b>Tabela 5.3.</b> Conteúdo químico dos kits para determinação da concentração de creatinina e fosfato. ....	93
<b>Tabela 6.1.</b> Nomenclatura e respectivas variáveis de síntese das fibras ocas.....	111
<b>Tabela 6.2.</b> Comparação entre as dimensões das fibras sintetizadas e comerciais..	117
<b>Tabela 6.3.</b> Permeabilidades hidráulicas das fibras ocas sintetizadas e de fibras comerciais de hemodiálise.....	118
<b>Tabela 6.4.</b> <i>Clearances</i> de ureia das membranas sintetizadas e clínicas e respectivas permeabilidades hidráulicas.....	126
<b>Tabela 7.1.</b> Dados de permeabilidade hidráulica e quantidade de albumina imobilizada pelas três metodologias de modificação superficial propostas em membranas planas. ....	131
<b>Tabela 7.2.</b> Propriedades de transporte das fibras ocas antes e após a modificação superficial utilizando a metodologia EDA_24. ....	132
<b>Tabela 7.3.</b> Resultados de imobilização de heparina em superfícies reportados na literatura.....	135
<b>Tabela 7.4.</b> Permeabilidade hidráulica antes e após a modificação superficial com heparina.....	137
<b>Tabela 7.5.</b> Rejeição de lisozima (ou $\beta_2$ -microglobulina) e de albumina reportadas na literatura.....	139
<b>Tabela 7.6.</b> Ângulo de contato das membranas antes e após a modificação superficial. ....	143
<b>Tabela 7.7.</b> Valores médios de absorvância observados no teste de hemólise. ....	152



**Tabela 7.8.** Resultados da análise de ativação do sistema complemento. .... 157

# CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os rins são órgãos essenciais para o funcionamento da saúde humana. Suas funções principais no corpo são a regulação do volume e composição do líquido extracelular, a remoção de produtos residuais na forma de urina e as funções endócrinas. Estas são importantes para a homeostase corporal, como o controle da pressão arterial, a produção de eritropoietina (hormônio que estimula a medula óssea a elevar a produção de células vermelhas do sangue), ativação da vitamina D e a regulação ácido-base (AZAR, 2013).

Quando há uma redução completa ou parcial da função renal, caracterizada pela incapacidade do rim de remover o excesso de água e de produtos residuais metabólitos do corpo, ocorre a chamada disfunção renal, que pode agravar-se, tornando-se uma doença renal crônica. Este é reconhecidamente um grave problema de saúde pública mundial (DELLES e VANHOLDER, 2017; SANTOS *et al*, 2017), estimando-se, que aproximadamente 10% da população mundial tenha doença renal crônica (BELLO *et al.*, 2017). Nestes casos, faz-se necessário o tratamento dos pacientes por terapias substitutivas renais (diálise ou transplante). A implantação de um rim de um doador saudável é a melhor opção, porém não há doadores suficientes e, desta forma, a diálise é o tratamento mais utilizado. A diálise pode ser realizada basicamente de duas formas: através da purificação do sangue dentro do corpo (diálise peritoneal) ou extracorpórea (hemodiálise, principalmente).

A hemodiálise é o tratamento mais utilizado em pacientes com doença renal crônica, conforme verificado em um levantamento realizado em 2014, segundo o qual 89,2% dos pacientes utilizam a hemodiálise, de um total de aproximadamente 2,25 milhões de pacientes dialisados (FRESENIUS MEDICAL CARE, 2014).

No Brasil, segundo dados do Censo Brasileiro de Diálise, da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), o número de pacientes em tratamento dialítico era de mais de 122 mil, em julho de 2016, dos quais 92,1% utilizam a hemodiálise como tratamento e apenas 7,9% eram tratados por diálise peritoneal. Em geral, a fonte pagadora do tratamento é o Sistema Único de Saúde (SUS), responsável por 83% dos tratamentos (SESSO *et al*, 2017).

Conforme observado pelos dados anteriormente descritos, a hemodiálise é um tratamento consolidado e que permite que os pacientes renais crônicos tenham uma vida próxima do normal, porém ainda apresenta algumas limitações a serem superadas,

como a baixa remoção de moléculas de tamanho médio, como a  $\beta_2$  – microglobulina. Seu acúmulo no sangue está associado à ocorrência da amiloidose (acúmulo de proteína anormal em diversos órgãos e tecidos celulares) e à síndrome do túnel cárpico (compressão do nervo mediano, que passa pela região do punho chamada túnel do carpo) (WECHS *et al*, 2014).

Além da ineficiente remoção de moléculas médias, a baixa biocompatibilidade das membranas utilizadas durante o procedimento apresenta como reações adversas os fenômenos de coagulação, devido à ocorrência de adsorção de proteína, que provoca a ativação de enzimas de diferentes sistemas; a agregação e adesão de plaquetas, induzindo à sua ativação e degranulação; a ativação da via alternativa do complemento, com ativação de neutrófilos e monócitos (que fazem parte do sistema imunológico do organismo), havendo a disfunção dessas células, o que potencialmente inibe o combate a infecções. Tudo isto resulta maior mortalidade de pacientes hemodialisados (NETO e SANTOS, 1996). O uso de heparina é a alternativa atual para prevenir a ocorrência de coagulação sanguínea e, conseqüentemente, o entupimento dos dialisadores, porém o uso dessa substância pode ser contraindicado para pacientes que têm reações alérgicas e hemorragias, ou fazem uso de certos medicamentos (MULLICK *et al*, 2014).

Neste cenário, o desenvolvimento de membranas de hemodiálise com melhores características de transporte e de biocompatibilidade tem sido alvo de muitas pesquisas, que envolvem pesquisas em síntese de membranas, de novos materiais e modificações das superfícies, conforme será descrito mais adiante na revisão da literatura. Especificamente o desenvolvimento e fabricação das membranas para hemodialisadores no Brasil poderia levar à redução da dependência de importação, já que atualmente boa parte dos insumos para o procedimento de hemodiálise é importada pelo Ministério da Saúde. A autossuficiência de dialisadores no país pode tornar o tratamento mais acessível, possibilitando oferta de tratamento de melhor qualidade e evitando a reutilização do dispositivo. Assim, o governo brasileiro tem investido em ciência e tecnologia na área de saúde para a produção de fármacos, medicamentos e equipamentos que deem ao Brasil não apenas capacidade, mas também soberania e independência científica e tecnológica para cuidar de sua população (PORTAL BRASIL, 2015).

Esta tese foi desenvolvida principalmente no Laboratório de Processos de Separação com Membranas (PAM), do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, onde o interesse sobre membranas de hemodiálise remonta à década de 1980, com os trabalhos de Logarezzi (1984), Santos (1988) e Silva (1991). Várias

investigações foram conduzidas com diferentes materiais poliméricos no intuito de melhorar desempenhos de membranas e eventualmente colaborar no esforço de nacionalização das mesmas em projetos conjuntos com empresas. Novos desenvolvimentos em processos de fabricação desenvolvidos no laboratório, como o estudo mais recente da dissertação de mestrado de Santos (2014), indicam um potencial crescente para atingir estas metas.

## 1.2. OBJETIVOS

### **Objetivo Geral:**

Síntese e caracterização de membranas, na geometria fibra oca, que possuam propriedades antitrombogênicas e de biocompatibilidade e que sejam incorporadas em módulos para aplicação em hemodiálise.

### **Objetivos específicos:**

- Avaliar o efeito de variáveis operacionais e condições de síntese na obtenção fibras ocas de poli(éter imida) e poli(vinil pirrolidona);
- Avaliar as propriedades morfológicas e de transporte das fibras sintetizadas, buscando atingir propriedades compatíveis com o tratamento por hemodiálise;
- Modificar a superfície das fibras sintetizadas a fim de elevar a hemocompatibilidade;
- Avaliar *in vitro* a hemocompatibilidade das membranas modificadas, seguindo as normas específicas para os testes;
- Comparar as propriedades das membranas sintetizadas com membranas comerciais de uso clínico.

## 1.3. ORGANIZAÇÃO DA TESE

O texto dessa tese foi organizado em 9 capítulos, conforme descrito a seguir.

O Capítulo inicial apresentou uma introdução geral sobre o assunto, incluindo o panorama das doenças renais crônicas e seu tratamento no Brasil e no mundo, situando as limitações e necessidade de melhorias no processo a fim de aumentar a qualidade

de vida dos pacientes tratados. Também foram apresentados os objetivos gerais e específicos a serem alcançados nesta Tese de doutorado.

Os Capítulos 2, 3 e 4 abordam a Fundamentação Teórica e Revisão Bibliográfica. No Capítulo 2 foram concentradas informações referentes ao sistema urinário e doenças renais, bem como suas principais formas de tratamento. Dentre eles, abordou-se com ênfase a hemodiálise, foco de estudo desse trabalho, descrevendo os princípios da diálise/hemodiálise, incluindo os fenômenos de transferência de massa e a caracterização das membranas utilizadas nesse tratamento e suas propriedades. Foi realizada uma revisão sobre os trabalhos envolvidos em síntese e aplicação de membranas em hemodiálise. O Capítulo 3 faz uma revisão dos principais métodos de modificação de superfícies de membranas visando ao aumento da biocompatibilidade e no Capítulo 4 foram abordados os conceitos fundamentais envolvidos no processo de síntese de membranas pelo método de inversão de fases e mecanismos de formação de membranas. Este capítulo também faz uma abordagem sobre as principais propriedades e utilizações da poli(éter imida) (PEI), fazendo uma revisão sobre a síntese de membranas de PEI e suas aplicações na área médica.

O Capítulo 5 aborda os Materiais e Métodos utilizados para síntese, caracterização e modificação das membranas no desenvolvimento da Tese, e a apresentação e discussão dos resultados obtidos foi abordada nos Capítulos 6 e 7.

No Capítulo 6 são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos em relação à síntese de fibras e caracterização das propriedades de transporte de módulos de permeação, verificando a viabilidade da obtenção de fibras ocas de PEI com características comparáveis ou superiores às membranas de hemodiálise de uso clínico. Neste capítulo também foram abordadas as principais conclusões parciais, a fim de nortear a discussão da etapa seguinte da tese.

O Capítulo 7 apresenta os resultados e discussões referentes à modificação superficial das membranas, as propriedades da membrana modificada bem como a avaliação da hemocompatibilidade das membranas.

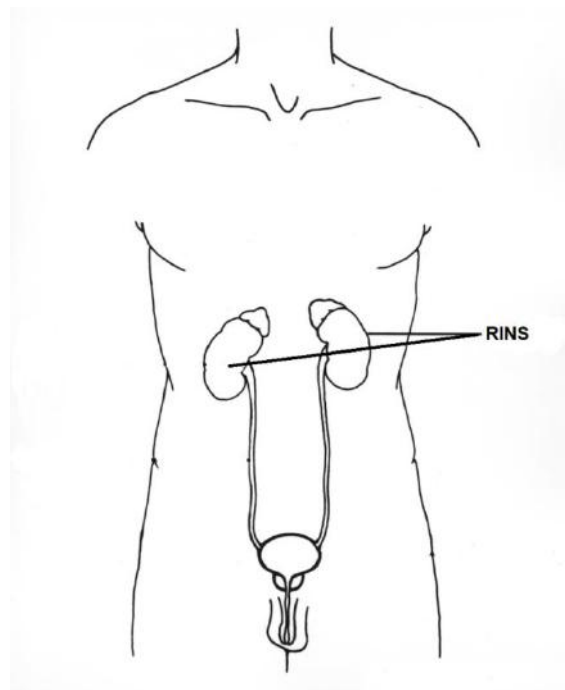
O Capítulo 8 apresenta as principais conclusões do trabalho, com as sugestões para trabalhos futuros e o Capítulo 9 lista as referências bibliográficas utilizadas nesta tese.

Nos Anexos são apresentadas as condições experimentais utilizadas na síntese de fibras ocas e as curvas de calibração utilizadas no trabalho. Também são apresentados o artigo publicado a partir dessa Tese e os documentos do Comitê de Ética e Pesquisa para a realização das análises com sangue humano.

# CAPÍTULO 2 – PRINCÍPIOS BÁSICOS DE HEMODIÁLISE

O sistema urinário é o conjunto de órgãos responsáveis pela formação, depósito e eliminação da urina. Com isso, retira do organismo as substâncias em excesso e os produtos residuais do metabolismo, mantendo a composição química do meio interno. É composto basicamente por três órgãos: os rins, onde a urina é produzida; a bexiga, onde a urina é armazenada; e a uretra, por onde a urina é excretada.

Os rins são dois órgãos localizados no espaço retroperitoneal da parede abdominal posterior, cada um do lado da coluna vertebral. Cada rim pesa cerca de 150 g e mede de 10 a 12 cm de comprimento, de 4 a 6,5 cm de largura e de 2 a 3 cm de espessura (MONTANARI, 2016), tamanho aproximado de uma mão fechada no formato de feijão, conforme esquematizado na Figura 2.1. Os rins filtram de 120 a 150 litros de sangue por dia, produzindo, assim, de 1 a 2 litros de urina.



**Figura 2.1.** Esquema dos rins no corpo humano. Fonte: National Cancer Institute (2001)

Além da produção de urina, os rins exercem diversas funções importantes no organismo:

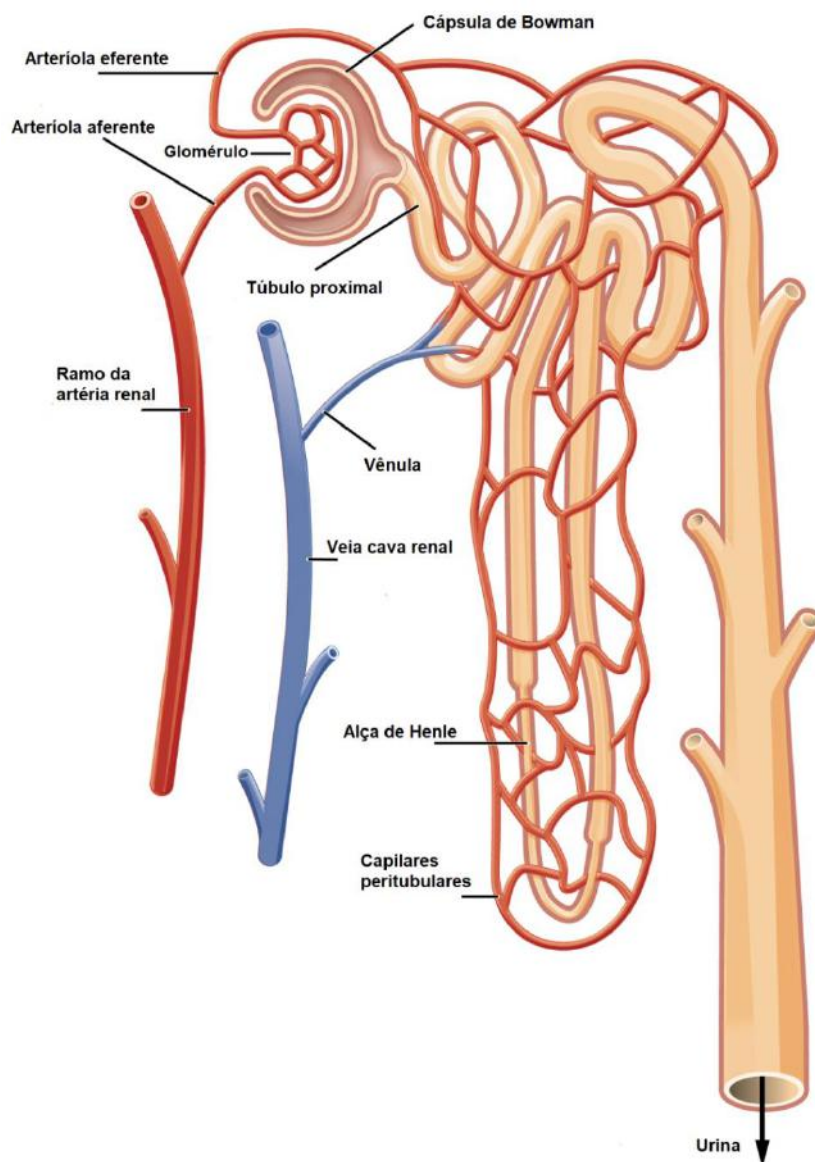
- Regulação dos eletrólitos
- Regulação do equilíbrio ácido-básico
- Controle do balanço hídrico
- Controle da pressão arterial
- Regulação da produção de eritrócitos
- Síntese de vitamina D
- Secreção de prostaglandinas
- Regulação do equilíbrio de cálcio e fósforo
- Ativação do hormônio de crescimento

A unidade funcional do rim é chamada néfron, o qual é constituído por um componente de filtração inicial, chamado corpúsculo renal, e pelo túbulo renal. O corpúsculo renal forma o filtrado do sangue livre de células e proteínas, o qual entra no túbulo renal, onde substâncias são adicionadas ou removidas. O fluido de saída dos mais de um milhão de néfrons de cada rim forma a urina.

Cada corpúsculo renal contém um emaranhado compacto de capilares interconectados chamado glomérulo. O sangue é alimentado a cada glomérulo por meio da arteríola aferente. O glomérulo é envolvido por uma cápsula preenchida de fluido, chamada cápsula de Bowman, que possui uma barreira de três camadas responsável por separar o sangue do seu conteúdo fluido. O sangue escoar pelo glomérulo e uma porção do plasma é filtrada para a cápsula de Bowman, pois as paredes dos capilares são microporosas. O sangue que escoar por estes capilares está com uma pressão maior que a do fluido na cápsula que envolve o glomérulo, a cápsula de Bowman. Como resultado, água, sais, e outros microssolutos no sangue são ultrafiltrados para dentro da cápsula enquanto as células sanguíneas permanecem no sangue. O sangue remanescente deixa o glomérulo por outra artéria, a arteríola eferente (BAKER, 2004; WIDMAIER *et al.*, 2004).

O túbulo renal é contínuo a cápsula de Bowman e o filtrado absorvido penetra num tubo sinuoso chamado túbulo contorcido proximal (próximo ao glomérulo). Depois de várias circunvoluções, o túbulo descreve uma grande alça (alça de Henle), após a qual, o túbulo renal assume outra vez a forma sinuosa, o túbulo contorcido distal (distante do glomérulo). Os túbulos distais desembocam nos tubos coletores, onde o desemboca filtrado final, após o processo de reabsorção.

A Figura 2.2 apresenta um esquema do néfron e seus constituintes principais, o glomérulo, cápsula de Bowman e arteríolas aferente e eferente.



**Figura 2.2.** Esquema do néfron, a unidade funcional do rim, e seus constituintes. Fonte: CNX OpenStax (2013).

## 2.1. DOENÇAS RENAIIS

Muitas doenças podem afetar os rins. Bactérias, alergias, defeitos congênitos, pedra nos rins, tumores, substâncias tóxicas são algumas fontes de danos renais. Um sintoma frequente de doença renal é a presença de proteína na urina, já que em rins com funcionamento normal, a pequena quantidade de proteína que passa na filtração que ocorre no glomérulo é reabsorvida no túbulo renal (WIDMAIER *et al.*, 2004).



Muitas doenças renais não produzem danos permanentes aos rins; outras progridem, se não tratadas. Os sintomas do mau funcionamento renal são relativamente independentes do agente causador do dano e coletivamente chamados de uremia, ou seja, ureia no sangue.

A severidade da uremia depende do quanto os rins comprometidos são aptos a manter o equilíbrio do ambiente interno. Ao causar danos aos rins, há redução considerável do número de néfrons funcionais. Conseqüentemente, as muitas substâncias que deveriam ser excretadas, particularmente produtos residuais potencialmente tóxicos, acumulam-se no sangue. Além disso, a excreção de potássio é prejudicada porque há poucos néfrons capazes de realizar a secreção tubular normal desse íon. Pode ocorrer, também, o desenvolvimento de acidose, porque o número reduzido de néfrons não é capaz de reabsorver suficiente bicarbonato para compensar a produção metabólica diária de ácidos não voláteis.

Outros problemas surgem na uremia devido à secreção anormal dos hormônios produzidos pelos rins. Assim, a diminuição da secreção de eritropoietina resulta em anemia e a diminuição da capacidade de formar vitamina D resulta em absorção deficiente de cálcio no trato gastrointestinal, com uma diminuição resultante do cálcio plasmático e calcificação óssea inadequada. O problema com a renina, o terceiro dos hormônios renais, raramente é uma secreção muito pequena, mas sim uma grande secreção desse hormônio pelas células dos rins danificados. O resultado é o desenvolvimento de hipertensão renal.

De modo geral, os rins ainda são capazes de desempenhar sua função reguladora bastante bem enquanto 10% dos néfrons ainda estão funcionando. Isso ocorre porque esses néfrons remanescentes sofrem alterações na sua função (filtração, reabsorção e secreção), de modo a compensar os néfrons inativos. Por exemplo, cada néfron restante aumenta a taxa de secreção de potássio para que a quantidade total de potássio excretado pelos rins possa ser mantido em níveis normais (WIDMAIER *et al.*, 2004).

As doenças renais que incluem a perda progressiva e irreversível das funções glomerular, tubular e endócrina dos rins são conhecidas como doenças renais crônicas (DRCs). Segundo Romão Junior (2004), as DRCs podem ser classificadas em seis estágios, determinado com base no nível da função renal:

Estágio 0) Estágio de função renal normal sem lesão do rim: ainda não há lesão renal, mas inclui integrantes do grupo de risco a desenvolver doenças renais, como

hipertensos, diabéticos, parentes de portadores dessas doenças e parentes de portadores de DRC.

Estágio 1) Estágio de lesão com função renal normal: corresponde às fases iniciais da lesão, em que há manutenção da filtração glomerular.

Estágio 2) Estágio de doença renal funcional ou leve: início da perda da função dos rins. Os rins conseguem manter razoável controle do meio interno e apenas exames precisos de avaliação da função do rim podem detectar as anormalidades.

Estágio 3) Estágio de doença renal laboratorial ou moderada: o paciente já apresenta níveis elevados de ureia e creatinina, mas mantém-se clinicamente bem.

Estágio 4) Estágio de doença renal clínica ou severa: o paciente apresenta sintomas clássicos de uremia, como anemia, hipertensão arterial, fraqueza, mal-estar e sintomas digestivos.

Estágio 5) Estágio de doença renal crônica terminal: o paciente encontra-se totalmente sintomático. Os rins não são mais capazes de excretar água e íons a taxas que mantenham os equilíbrios corporais dessas substâncias, nem são capazes de excretar produtos de resíduos tão rápido quanto sua produção. Alterações na dieta podem minimizar esses problemas, mas não são suficientes para eliminar os problemas. Quando o paciente atinge o estágio 5 da doença renal crônica, faz-se necessário o transplante renal ou o tratamento por meio de terapias substitutivas de depuração do sangue, a diálise peritoneal ou a hemodiálise.

## 2.2. TRATAMENTOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM FASE TERMINAL

### 2.2.1. Transplante Renal

O transplante renal é o tratamento mais adequado para pacientes com doenças renais crônicas em estágio terminal. Através de uma cirurgia, o rim saudável de um doador vivo ou falecido é doado a um paciente com insuficiência renal crônica, sendo considerada a mais completa terapia de substituição da função renal. Um transplante de rim com sucesso melhora a qualidade de vida e reduz o risco de morte da maioria dos pacientes quando em comparação com o tratamento por diálise (SUTHANTHIRAN, 1994).

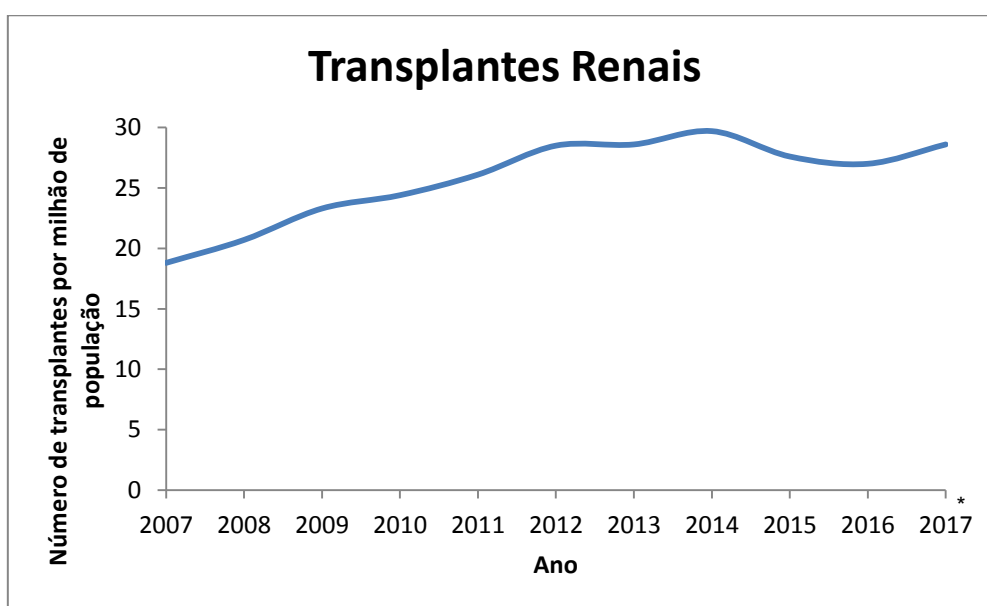
Antes do surgimento dos imunossupressores, o transplante renal era restrito a gêmeos idênticos e não adequado a maioria dos pacientes com DRC. Segundo Collins

(2015), atualmente, o transplante renal ainda possui algumas contraindicações, principalmente devido à intervenção cirúrgica:

- Câncer em metástase
- Insuficiência cardíaca grave
- Insuficiência hepática
- Insuficiência pulmonar
- Uso contínuo de tabaco
- Obesidade mórbida

Alguns países limitam a idade e exigem que o paciente esteja em boas condições de saúde, com exceção do problema renal.

No Brasil, segundo dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos, foram realizados 5492 transplantes de rim em 2017, com uma fila de espera estimada em aproximadamente 25000 pacientes, atingindo um crescimento de 7,1% em relação ao ano anterior, conforme apresentado na Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Número de transplantes renais realizados no Brasil (2007 – 2017) por milhão de população (pmp). Fonte: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) (2017). \*Dados de 2017 obtidos por projeção anual (dados disponíveis até setembro/2017).

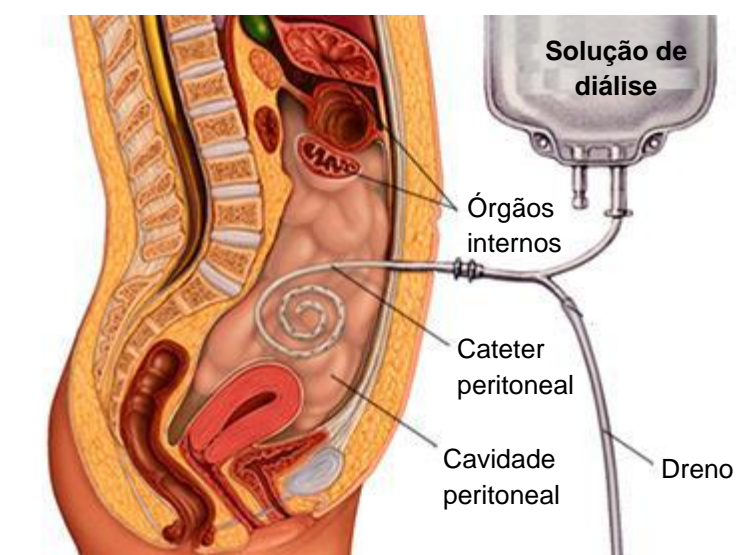
Os transplantes renais, no Brasil, são em quase sua totalidade (96%) financiados pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Quando o transplante renal não é possível, indica-se ao paciente a realização do tratamento por diálise, processo de separação de substâncias através da utilização de uma membrana. Existem duas formas de realizar o tratamento por diálise, as quais serão descritas nos itens a seguir.

### 2.2.2. Diálise Peritoneal

O tratamento da doença renal crônica por meio da diálise peritoneal utiliza o revestimento da cavidade abdominal do próprio paciente (a membrana peritoneal, uma fina camada de tecido altamente vascularizada) como uma membrana de diálise.

Durante o ciclo da diálise peritoneal, um fluido de diálise é injetado na cavidade, através de um cateter peritoneal inserido através da parede abdominal, e deixa-se permanecer por horas, durante as quais, solutos difundem no fluido do sangue da pessoa. O fluido de diálise é então removido, sendo substituído por novo fluido. Este procedimento pode ser realizado várias vezes ao dia por um paciente que está fazendo atividades normais simultaneamente (WIDMAIER *et al.*, 2004). A Figura 2.4 apresenta um esquema da diálise peritoneal.



**Figura 2.4.** Esquema da diálise peritoneal. Fonte: Adaptado de Mayo Foundation for Medical Education and Research (2017).

A diálise peritoneal não é apropriada para pessoas com obesidade mórbida ou com múltiplas cirurgias abdominais, pois o abdômen dessas pessoas torna o tratamento

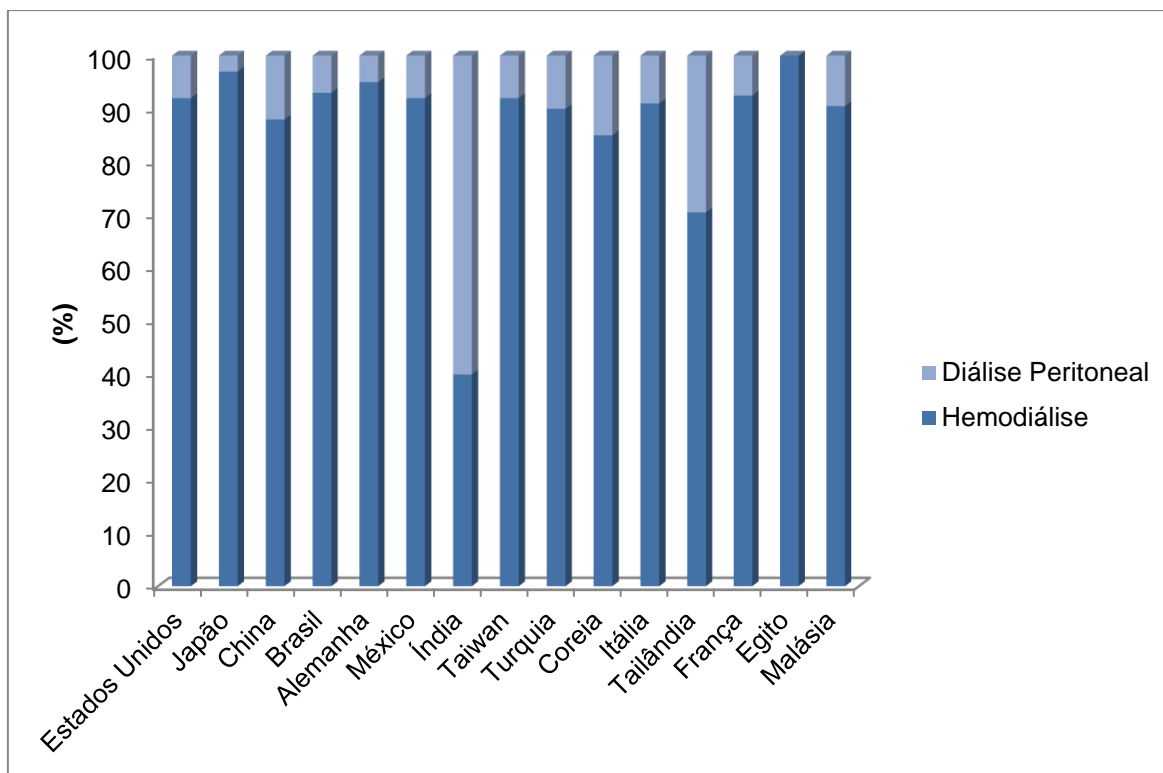
difícil ou impossível. Além disso, os pacientes devem receber treinamento para tornarem-se aptos para executar o tratamento corretamente (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2014).

A diálise peritoneal pode ser realizada de duas formas, selecionadas de acordo com a adaptação da membrana peritoneal do paciente e com seu estilo de vida.

a) Diálise Peritoneal Contínua Ambulatória (DPCA): o paciente fica sempre com líquido de diálise dentro do seu organismo, ou seja, seu sangue está sendo continuamente purificado. Geralmente, fazem-se quatro trocas do fluido de diálise, que pode ser realizada praticamente em qualquer lugar, desde que com as devidas precauções. Entre as trocas, o paciente está completamente livre para realizar as suas atividades habituais. Durante a noite, haverá uma permanência mais longa, durante o sono. A DPCA funciona através da gravidade, e o líquido é facilmente drenado colocando o saco de drenagem no chão. O saco com o novo líquido de diálise é colocado ao nível dos ombros, desde que se encontre sentado ou em pé, fluindo para a cavidade peritoneal.

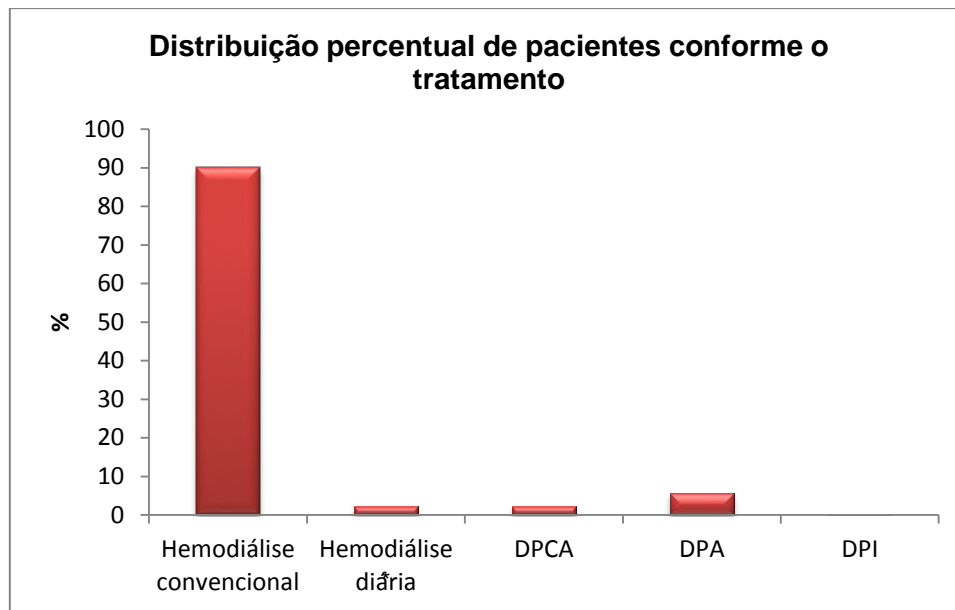
b) Diálise peritoneal automatizada (DPA): a DPA utiliza uma máquina, chamada de cicladora, que faz estas trocas por si. Todas as noites é necessário que o paciente conecte o seu cateter às linhas da máquina. Durante o sono, a máquina encarrega-se de fazer as trocas programadas, infundindo e drenando automaticamente o líquido de diálise para dentro e para fora do organismo. Durante o dia, habitualmente algum líquido de diálise fica dentro do corpo, o que permite continuar a diálise. À noite, a cicladora drena automaticamente esse líquido de diálise “usado”.

Alguns estudos sugerem que a diálise peritoneal deve ser a modalidade preferida de terapia renal substitutiva para doença renal crônica em estágio terminal, nos países em desenvolvimento, por apresentar vantagens como reabilitação superior e qualidade de vida; autonomia e independência do paciente, já que a terapia é realizada em casa, mesmo em ambientes rurais; e preservação do acesso vascular. Incentivos para o aumento do uso da diálise peritoneal pode ser uma estratégia para atender às necessidades crescentes de diálise e para sustentar o acesso oportuno à terapia renal substitutiva (RIOUX *et al.*, 2010). Entretanto, na maioria dos países a diálise peritoneal não é o tratamento com maior predominância em pacientes dialíticos, conforme dados apresentados na Figura 2.5.



**Figura 2.5.** Comparação do número de pacientes tratados por hemodiálise (HD) e diálise peritoneal (PD) nos quinze países com mais pacientes em tratamento dialítico. Fonte: Adaptado de Fresenius Medical Care (2013).

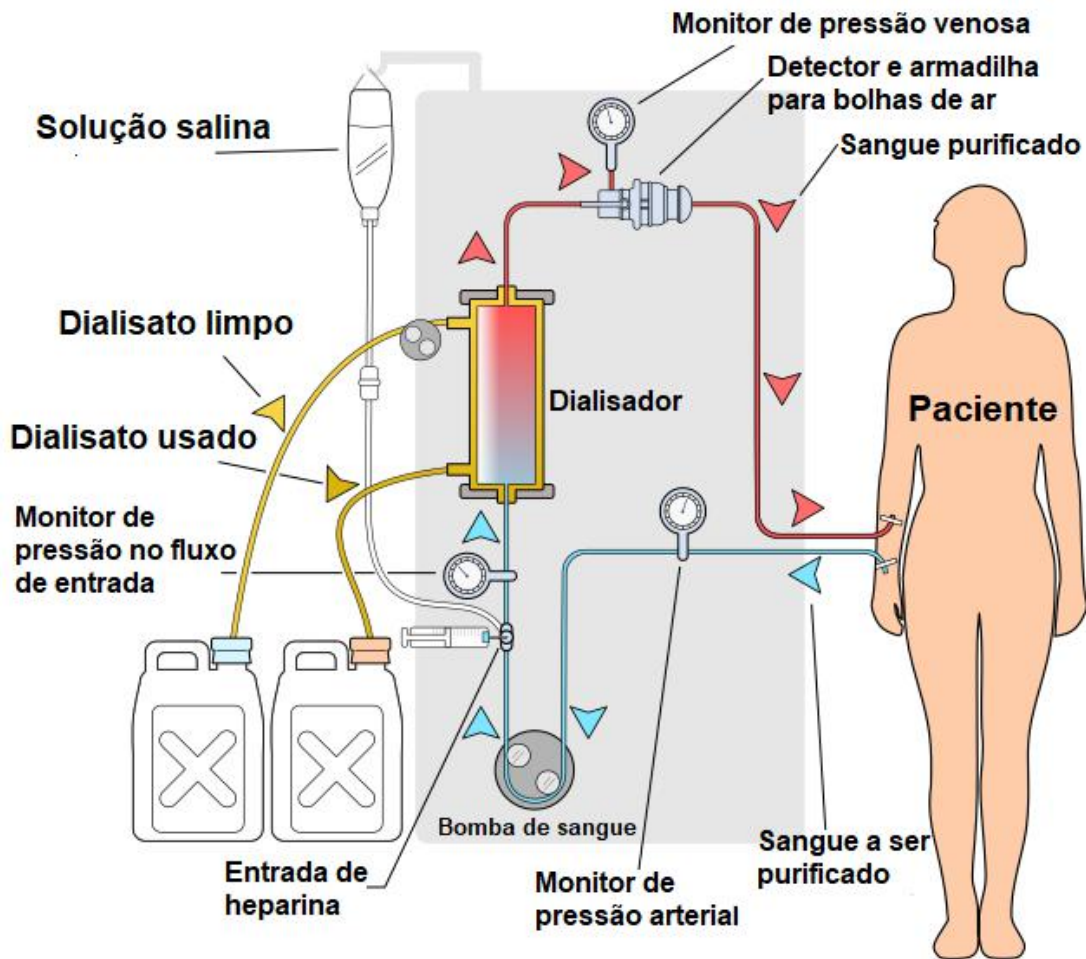
No Brasil, a diálise peritoneal é uma terapia substitutiva relativamente pouco utilizada, sendo responsável por menos de 8% dos tratamentos dialíticos, conforme dados do Censo Brasileiro de 2016, apresentados na Figura 2.6. De um total de 50.807 pacientes em tratamento dialítico entre as 309 unidades de diálise que responderam o censo, apenas 3.239 faziam tratamento por diálise peritoneal, da qual a diálise automatizada era a predominante. No gráfico da Figura 2.6, DPI refere-se à diálise peritoneal intermitente, na qual a solução de diálise, aquecida à temperatura corporal, é infundida manualmente ou por cicladora, em ambiente hospitalar. A duração da sessão varia entre 24 a 48 horas, com frequência de 2 vezes por semana. A DPI é indicada para pacientes com alta permeabilidade, função renal residual significativa e alguns casos de insuficiência renal aguda.



**Figura 2.6.** Tratamentos dialíticos de pacientes do Brasil. Fonte: Adaptado de Sesso *et al.* (2017). \*Realizada numa frequência maior que quatro vezes por semana.

### 2.2.3. Hemodiálise

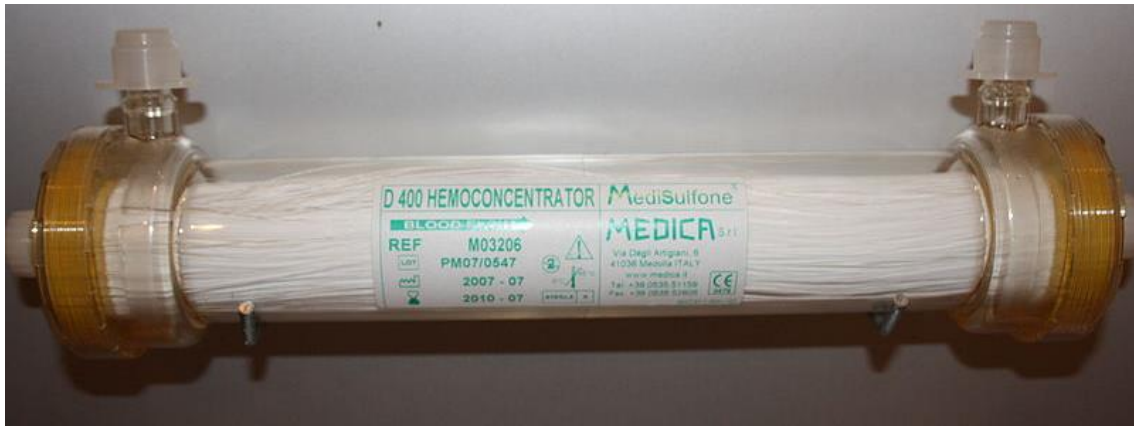
A hemodiálise é uma terapia renal substitutiva que utiliza um aparelho chamado rim artificial para remover o excesso de substâncias do sangue. Durante a hemodiálise, o sangue é obtido por um acesso vascular (cateter venoso central ou fístula artériovenosa) e impulsionado por uma bomba até o filtro de diálise, também conhecido como dialisador. No dialisador, o sangue é exposto à solução de diálise (ou dialisato) através de uma membrana semipermeável (altamente permeável à maioria dos solutos, mas relativamente impermeável à proteína e completamente impermeável às células do sangue), permitindo assim, as trocas de substâncias entre o sangue e o dialisato. Após ser retirado do paciente e filtrado pelo dialisador, o sangue é então devolvido ao paciente pelo acesso vascular. O fluido de diálise é uma solução salina com concentrações iônicas semelhantes ou inferiores às do plasma normal e não contém creatinina, ureia ou outras substâncias para serem completamente removidas da plasma (WIDMAIER *et al.*, 2004). Uma máquina de hemodiálise, conectada ao dialisador e às linhas que transportam o sangue, monitora o processo para que ocorra de forma segura e eficaz, através de sensores de pressão, temperatura, condutividade da solução de diálise, detector de ar e débito de sangue no circuito. A Figura 2.7 apresenta um esquema do tratamento por hemodiálise.



**Figura 2.7.** Esquema do tratamento renal por hemodiálise. Fonte: Mrabet (2008)

No dialisador, o sangue escoo pelo canal interno das fibras, o que proporciona boas condições hidrodinâmicas de escoamento e um baixo volume de preenchimento, que varia de 60 a 100 mL. Um módulo dialisador típico é um tubo cilíndrico de aproximadamente 5 cm de diâmetro e 20 – 24 cm de comprimento, contendo de 1 a 2 m<sup>2</sup> de área de fibras com diâmetro interno na faixa de 0,1 a 0,2 mm. A densidade de empacotamento das fibras do dialisador varia de 50 a 70%, cuja disposição é otimizada visando a uma distribuição uniforme do dialisato (OFSTHUN *et al.*, 2008). Na Figura 2.8 é apresentado um dialisador comercial.





**Figura 2.8.** Detalhe de um dialisador comercial. Fonte: Vacchi (2012).

A coagulação sanguínea durante a diálise é uma fonte de perda de sangue do paciente e interfere com a depuração de soluto, diminuindo a área de superfície do dialisador. Para evitar a coagulação, uma dose de heparina, o anticoagulante mais utilizado em diálise, geralmente é administrada no início da diálise (em geral, 2000 a 5000 unidades ou 50 unidades/kg do paciente), e continuamente infundida (1000 a 1500 unidades/h) no circuito de sangue, antes do dialisador, até 15 a 60 minutos antes do final da diálise. Alternativamente, a heparina pode ser administrada intermitentemente durante a diálise, conforme necessário. Esse método de administração de heparina resulta em episódios de anticoagulação em excesso e baixa anticoagulação. Se o paciente corre o risco de hemorragia, pequenas doses de heparina ou nenhum anticoagulante pode ser apropriado. Para realizar a diálise sem heparina, o circuito sanguíneo deve ser previamente rinsado com solução salina heparinizada e o dialisador deve ser lavado com solução de cloreto de sódio a cada 15 a 30 minutos para ajudar a prevenir a coagulação (YEUN e DEPNER, 2010).

Alternativas ao uso de heparina como anticoagulante incluem heparina de baixo peso molecular, hirudina, prostaciclina, dermatam sulfato e argatroban. Exceto pela heparina de baixo peso molecular, nenhuma está em grande uso devido à complexidade, despesa, falta de experiência clínica suficiente ou equivalência à heparina (YEUN e DEPNER, 2010).

O dialisato é composto por uma série de solutos vitais, em concentrações similares àquelas normalmente mantidas no sangue por um rim em funcionamento normal. A solução salina resultante é capaz de reproduzir uma segunda função renal, que é a de manter uma concentração fisiológica constante de eletrólitos extracelulares. A Tabela 2.1 apresenta os principais solutos que compõem a solução de diálise.

**Tabela 2.1.** Solutos presentes na solução de diálise. Fonte: Yeun e Depner (2010).

<b>Componente</b>	<b>Concentração (mEq/L)</b>
<b>Sódio</b>	135 – 145
<b>Potássio</b>	0 – 4
<b>Cloreto</b>	102 – 106
<b>Bicarbonato</b>	30 – 39
<b>Acetato</b>	2 – 4
<b>Cálcio</b>	0 – 3,5
<b>Magnésio</b>	0,5 – 1
<b>Dextrose</b>	11
<b>pH</b>	7,1 – 7,3

Uma sessão convencional de hemodiálise tem duração média de quatro horas, com uma frequência de três vezes por semana, mas a depender da necessidade do paciente, a duração e frequência podem ser alteradas.

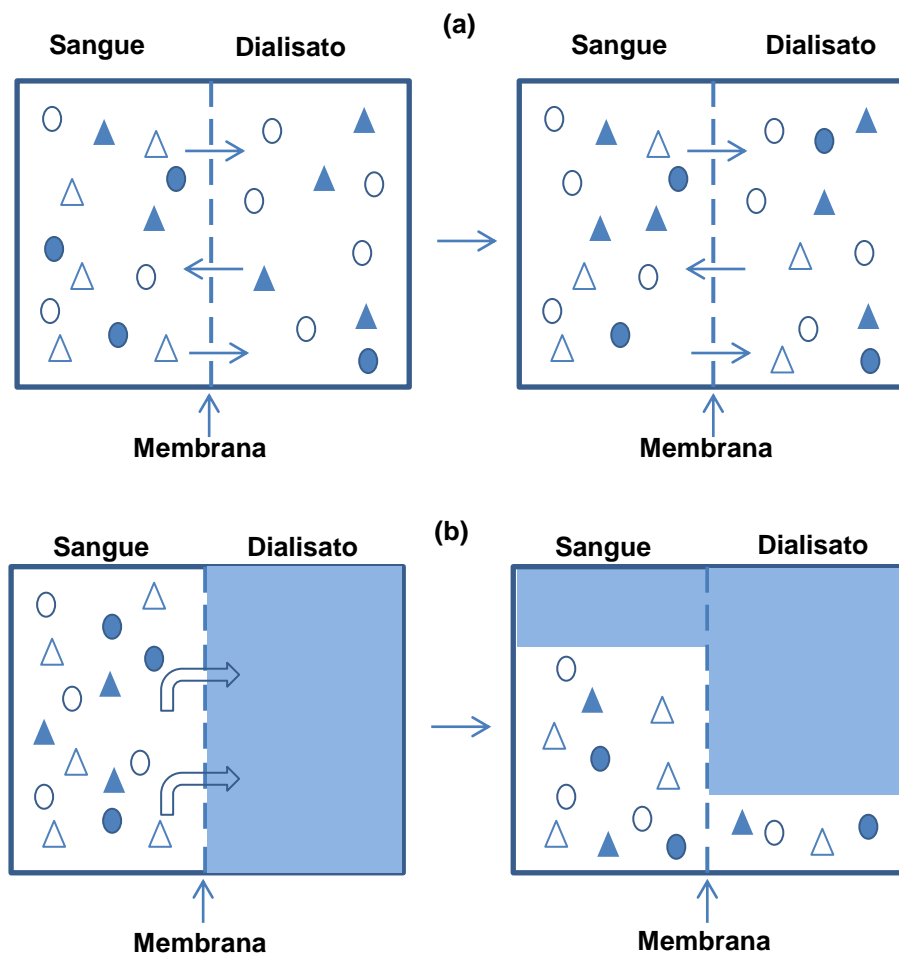
Conforme podemos observar dos dados apresentados nas Figuras 2.5 e 2.6, a hemodiálise é o tratamento mais utilizado no Brasil e na maioria dos países com maior número de pacientes em tratamento dialítico. Além disso, no Brasil, o SUS é responsável pelos custos de 83% dos tratamentos.

Os elementos essenciais do processo que ocorre na diálise são o solvente, o qual contém solutos dissolvidos, e a membrana, que contém poros através dos quais alguns ou todos os solutos se movem por difusão. As características do soluto que afetam o movimento através de uma membrana incluem sua concentração, peso molecular, forma, carga e solubilidade lipídica. As características da membrana que determinam a permeabilidade a um soluto particular incluem o tamanho efetivo médio dos poros; o número, a geometria e a distribuição dos poros dentro da membrana; área e espessura da superfície da membrana; e características da superfície, como carga e hidrofiliabilidade. O próprio solvente também pode se mover por difusão se sua atividade química não for equilibrada em toda a membrana.

Solutos passam através da membrana por um processo chamado *difusão*, que ocorre devido à existência de uma diferença de concentração entre o compartimento do sangue e o da solução de diálise. Ao longo do processo, essa diferença de

concentração, que é a força motriz para que ocorra a difusão, diminui, mas os solutos ainda podem passar através dos poros da membrana por *filtração*, um processo de convecção. A força motriz para a filtração é a diferença de pressão, que pode ser hidráulica ou osmótica. Durante a filtração, os solutos acompanham passivamente o solvente de um compartimento para o outro, sem causar mudança na concentração do soluto. O movimento convectivo pode ocorrer na direção oposta ao movimento difusivo ou na mesma direção (YEUN e DEPNER, 2010).

A Figura 2.9 apresenta um esquema dos mecanismos que podem ocorrer durante a hemodiálise.



**Figura 2.9.** Mecanismos de transferência de soluto em hemodiálise (a) difusão de solutos em maior concentração no compartimento do sangue para o do dialisato e do compartimento do dialisato para o do sangue (b) convecção devido à pressão hidrostática aplicada ao compartimento do sangue. Fonte: Adaptado de Yeun e Depner (2010).

Outros tratamentos atualmente utilizados, que podem ser considerados variações da hemodiálise são a hemofiltração e a hemodiafiltração.

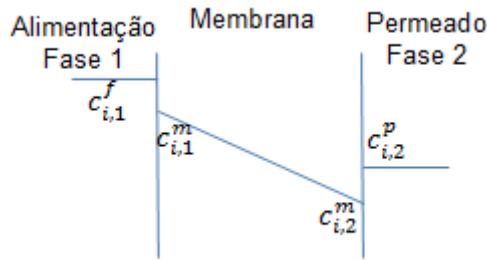
A hemofiltração é a técnica na qual água e solutos são removidos do sangue devido à existência de uma pressão hidrostática, sem que haja difusão (não se utiliza a solução de diálise, ocorrendo somente ultrafiltração e convecção). Portanto, para conseguir uma depuração de soluto comparável à da hemodiálise, grandes quantidades de fluido (água do plasma) devem ser removidas, ocorrendo reposição simultânea com um fluido de substituição, uma solução salina fisiológica livre de pirogênicos. A hemofiltração remove de maneira mais eficaz as substâncias de maior peso molecular em relação à hemodiálise devido à convecção, já que o movimento difusivo de moléculas maiores é relativamente lento. A hemofiltração requer uma membrana altamente permeável (alto fluxo) para alcançar as altas taxas de filtração e apresenta como principal desvantagem a grande quantidade de fluido de substituição estéril requerido.

A hemodiafiltração é a combinação de hemodiálise e hemofiltração, através da adição de fluxo de dialisato ao circuito de hemofiltração. A remoção de solução é realizada por difusão e ultrafiltração, mas, diferente da hemodiálise tradicional, o componente de ultrafiltração contribui muito mais devido à sua maior magnitude em relação à diálise.

Alguns centros de diálise no Brasil, como o Instituto de Nefrologia (INEFRO), o Instituto de Nefrologia de Brasília (INEB) e o Hospital Nove de Julho, utilizam a técnica de hemodiafiltração, a qual, por remover mais toxinas que em uma hemodiálise convencional, tende a apresentar menores complicações para os pacientes, como diminuição do índice de inflamação, da desnutrição e anemia, além da diminuição do risco cardiovascular e insuficiência cardíaca. Estudos indicam redução também no índice de mortalidade de pacientes tratados por hemodiafiltração (NUBÉ, *et al.*, 2016; MADUELL, *et al.*, 2017).

### 2.2.3.1. Transferência de massa em diálise

Segundo Mulder (1996), sendo a diálise um processo de difusão, o transporte de cada componente  $i$  no estado estacionário pode ser descrito pela lei de Fick, que após a integração ao longo da espessura da membrana (Figura 2.10), leva à Equação 2.1.



**Figura 2.10.** Perfil de concentração da diálise sem resistência da camada limite.

$$J_i = \frac{D_i}{l} (c_{i,1}^m - c_{i,2}^m) \quad (\text{Equação 2.1})$$

$c_{i,1}^m$  e  $c_{i,2}^m$  são as concentrações dentro da membrana em cada lado da interface;

$D_i$  é o coeficiente de difusão do soluto, considerado constante;

$l$  é a espessura da membrana.

Introduzindo o coeficiente de distribuição no equilíbrio ( $K_i$ ), obtém-se a Equação 2.2.

$$J_i = \frac{D_i K_i}{l} \Delta c_i = \frac{P_i}{l} \Delta c_i \quad (\text{Equação 2.2})$$

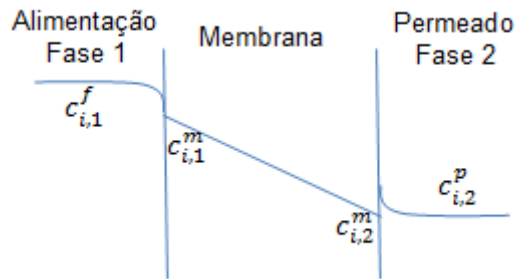
$K_i$  é o coeficiente de distribuição (ou de partição), dado por  $K_i = \frac{c_{i,1}^m}{c_{i,1}^f} = \frac{c_{i,2}^m}{c_{i,2}^p}$ ;

$\Delta c_i$  é a diferença de concentração entre a alimentação e o permeado;

$P_i$  é a permeabilidade e  $P_i = D_i K_i$ .

Ao mesmo tempo em que o fluxo de soluto ocorre, há um fluxo osmótico de solvente na direção oposta. Este fluxo osmótico é proporcional à diferença de pressão osmótica. Os fluxos de soluto e solvente não ocorrem independentemente: à medida que a diferença de concentração de soluto decresce, a diferença de pressão osmótica também diminui e, portanto, o fluxo de solvente diminui. Por outro lado, o fluxo de solvente também causa uma redução na concentração do soluto no lado de concentração mais alta, reduzindo então a força motriz e, por conseguinte, o fluxo de soluto.

A resistência ao transporte em diálise não é só determinada pela membrana, mas frequentemente camadas limite de resistência nas fases líquidas em contato devem ser levadas em conta, conforme esquematizado na Figura 2.11.



**Figura 2.11.** Perfil de concentração da diálise com resistência das camadas-limite.

Pode-se obter o coeficiente global de transferência de massa,  $k_o$ , através da soma das três resistências, segundo a Equação 2.3.

$$\frac{1}{k_o} = \frac{l}{P_i} + \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} \quad (\text{Equação 2.3})$$

$k_1$  é a resistência à transferência de massa na alimentação;

$k_2$  é a resistência à transferência de massa no permeado.

O fluxo de soluto pode, então, ser expresso em função do coeficiente global de transferência de massa, segundo a Equação 2.4.

$$J_i = k_o (c_{i,1}^f - c_{i,2}^p) \quad (\text{Equação 2.4})$$

A abordagem acima descrita é aplicada para descrever os processos de transferência de massa em membranas homogêneas (densas). No caso de membranas porosas, devem ser levados em conta os fluxos difusivo e convectivo e a morfologia da membrana (distribuição do tamanho de poros). A literatura registra também o método da termodinâmica irreversível, que é mais geral e que pode ser aplicado para ambas as classes de membranas e é útil quando há soluções multicomponentes submetidas a várias forças motrizes simultâneas.

Segundo Ho e Sirkar (1992), através da termodinâmica irreversível, a permeabilidade hidráulica ( $L_p$ ) da membrana é expressa na forma de um coeficiente de proporcionalidade entre o fluxo volumétrico  $J_v$  e uma diferença de pressão através da

membrana,  $\Delta p$ , para o caso em que não há diferença de pressão osmótica  $\Delta\pi_s$ , conforme a Equação 2.5.

$$J_v = L_p \Delta p \quad (\Delta\pi_s = 0) \quad (\text{Equação 2.5})$$

Na presença de diferença pressão osmótica, esta afetará o fluxo e deve ser levada em consideração, obtendo-se as Equações 2.6 e 2.7 a seguir.

$$J_v = L_p \Delta p + L_{pD} \Delta\pi_s \quad (\text{Equação 2.6})$$

$$J_D = L_{Dp} \Delta p + L_D \Delta\pi_s \quad (\text{Equação 2.7})$$

$L_{pD}$  é o coeficiente de fluxo osmótico;

$J_D$  é a taxa de transporte de soluto e solvente;

$L_{Dp}$  é o coeficiente de ultrafiltração;

$L_D$  é a mobilidade difusional por unidade de diferença de pressão osmótica.

Pela lei de Onsager,  $L_{pD} = L_{Dp}$  e três experimentos são necessários para caracterizar o sistema membrana-solvente-soluto, determinando  $L_p, L_{pD}$  e  $L_D$ . Outras relações conhecidas como equações Kedem-Katchalsky são definidas pelas Equações 2.8 e 2.9.

$$J_v = L_p \Delta p + \sigma L_p \Delta\pi_s \quad (\text{Equação 2.8})$$

$$J_s = c_s (1 - \sigma) J_v + w \Delta\pi_s \quad (\text{Equação 2.9})$$

onde:

$$\sigma = -\frac{L_{pD}}{L_p}, \quad w = \frac{J_s}{\Delta\pi_s} \text{ e } P_m = wRT$$

$\sigma$  é o coeficiente de reflexão (valor limite do coeficiente de rejeição e propriedade intrínseca do par soluto/membrana)

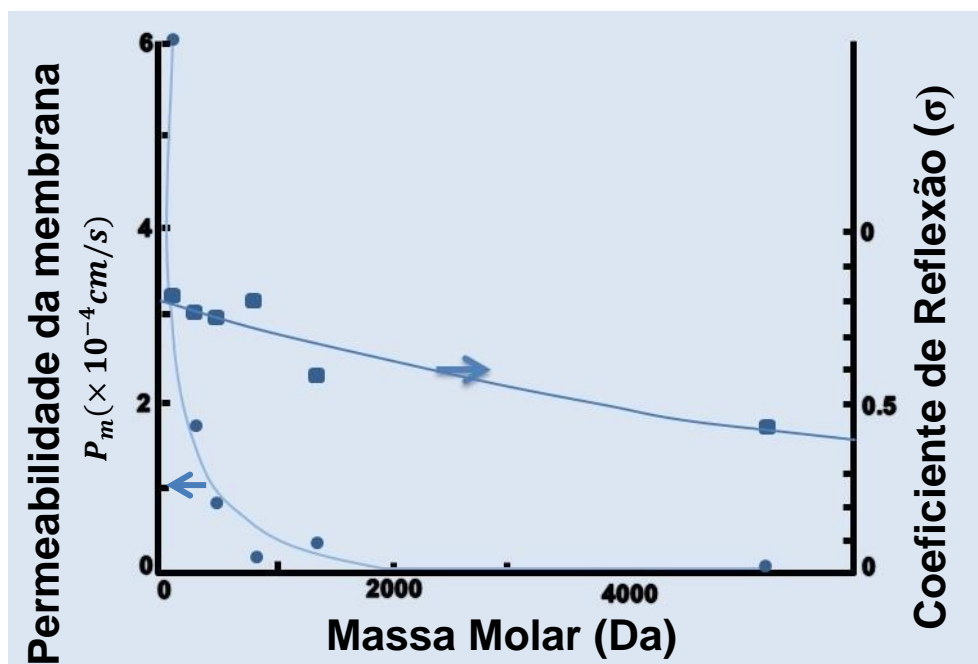
O uso desta abordagem considera que todos os fluxos dependem de todas as forças, sendo uma teoria geral mais apropriada que a lei de Fick, em geral mais limitada a sistemas binários.

Deve-se considerar, ainda, a contribuição da convecção à transferência de massa na diálise. A ultrafiltração ocorre da alimentação para o dialisato em resposta a um gradiente de pressão, o qual pode ser aplicado para concentrar a alimentação. Neste caso, no estado estacionário, o fluxo global de soluto  $J_s$  consiste da soma dos componentes difusivo e convectivo, conforme a Equação 2.10 (HO E SIRKAR, 1992).

$$J_s = P_m \Delta c_s + J_v (1 - \sigma) \bar{c}_s \quad (\text{Equação 2.10})$$

$\bar{c}_s$  é a concentração média de soluto na membrana e pode ser estimada utilizando uma série de equações descritas por Villaroel, Klein e Holland (1977).

Segundo a Equação 2.10, as magnitudes relativas da difusão e convecção são funções da permeabilidade difusiva e do coeficiente de reflexão. Para espécies de pequeno tamanho molecular, a resistência à transferência difusiva através da membrana é baixa, pois a permeabilidade difusiva é alta e a difusão excede significativamente a transferência convectiva. Porém, quando o tamanho molecular do soluto aumenta, a permeabilidade decresce logaritmicamente, enquanto o coeficiente de reflexão aumenta a uma taxa muito menor, aumentando a importância da convecção à transferência de massa global, conforme ilustra a Figura 2.12.



**Figura 2.12.** Permeabilidade difusiva e coeficiente de reflexão em função da massa molar do soluto para uma membrana de diálise típica. Fonte: HO e SIRKAR (1992).



### 2.2.3.2. Transferência de massa em hemodiálise

Segundo Elliot (2005), além da descrição da transferência de massa em diálise apresentada no item 2.2.3.1, podemos destacar alguns parâmetros específicos do processo de hemodiálise. A dialisância difusiva,  $D$  (mL/min), é definida como a mudança no teor de soluto no fluxo de sangue por unidade de força motriz (diferença de concentração), segundo apresentado na Equação 2.11.

$$D = \frac{Q_{Bi}(C_{Bi}-C_{Bo})}{C_{Bi}-C_{Di}} = \frac{Q_{Di}(C_{Do}-C_{Di})}{C_{Bi}-C_{Di}} \quad (\text{Equação 2.11})$$

$Q_{Bi}$  é a vazão de entrada de sangue (mL/min);

$Q_{Di}$  é a vazão de entrada de dialisato (mL/min);

$C_{Bi}$  é a concentração sanguínea na entrada;

$C_{Bo}$  é a concentração sanguínea na saída;

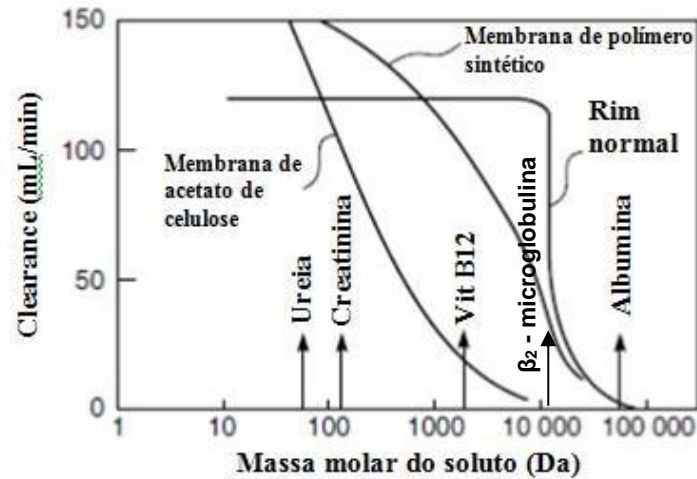
$C_{Di}$  é a concentração do dialisato na entrada;

$C_{Do}$  é a concentração do dialisato na saída.

No caso da hemodiálise, a concentração inicial de soluto no dialisato é nula e, portanto a Equação 2.11 pode ser simplificada para a Equação 2.12, que é a definição do *clearance* difusivo,  $K$  (mL/min), analogamente ao *clearance* fisiológico renal. O *clearance* representa o volume equivalente de sangue completamente livre de soluto a cada minuto e não pode exceder a vazão de sangue para o dialisador.

$$K = \frac{Q_{Bi}(C_{Bi}-C_{Bo})}{C_{Bi}} = \frac{Q_{Di}C_{Do}}{C_{Bi}} \quad (\text{Equação 2.12})$$

Na Figura 2.13, são apresentados os *clearances* em função da massa molar de solutos para membranas de hemodiálise (de acetato de celulose e polímeros sintéticos) e para o rim normal.



**Figura 2.13.** Clearances dos principais solutos urêmicos para membranas de hemodiálise e para o rim normal. Fonte: SANTOS (2014).

A Equação 2.12 deve ser alterada caso a ultrafiltração seja considerada no processo, adicionando-se a parcela de contribuição da ultrafiltração, conforme a Equação 2.13.

$$K' = \frac{Q_{Bi}(C_{Bi}-C_{Bo})}{C_{Bi}} + Q_{UF} \frac{C_{Bo}}{C_{Bi}} = K + Q_{UF} \frac{C_{Bo}}{C_{Bi}} \quad (\text{Equação 2.13})$$

$Q_{UF}$  é a contribuição líquida da ultrafiltração para o fluxo (mL/min)

É importante salientar que as Equações 2.11 a 2.13 acima descritas são válidas apenas para soluções aquosas simples. No sangue, há influência da porcentagem de hematócrito, água no plasma e solutos ligados a proteínas, sendo necessário adicionar um fator de correção ao termo  $Q_{Bi}$ .

Para determinar se a diálise está adequada, utiliza-se como padrão um parâmetro conhecido como índice de *clearance*,  $Kt/V_{ureia}$ , que deve apresentar valores entre 1,2 e 1,4. O índice de *clearance* aumenta com o aumento do clearance ( $K$ ), do tempo de tratamento ( $t$ ) e com um menor volume de distribuição do paciente ( $V_{ureia}$ ) e um aumento de 0,1 deste parâmetro em geral está relacionado com menor risco de morte por doenças cardíacas e cerebrovasculares e por infecções (BLOEMBERGEN *et al.*, 1996). Entretanto, o índice de *clearance* apenas é utilizado para solutos de baixa massa molar; no caso de moléculas de tamanho médio, utiliza-se o produto entre o coeficiente global de transferência de massa e a área da membrana para descrever o

respectivo *clearance*, conforme proposto por Babb *et al.* (1971), e apresentado na Equação 2.14.

$$K_oA = \frac{Q_B}{\frac{Q_B}{Q_D} - 1} \times \ln \left( \frac{Q_B - D}{Q_B - D \frac{Q_B}{Q_D}} \right) \quad (\text{Equação 2.14})$$

$Q_B$  é a vazão de sangue;

$Q_D$  é a vazão de dialisato;

$D$  é a dialisância.

Além do *clearance* e da dialisância, outro parâmetro importante em hemodiálise é o coeficiente de ultrafiltração,  $K_{UF}$  (mL/min/mmHg), devido à transferência de água de/para o dialisato com o objetivo de controlar a distribuição de volume de sangue do paciente. O coeficiente de ultrafiltração é definido como a vazão de filtração volumétrica (mL/h) por mmHg de diferença de pressão mantida através da membrana e obtido através da Equação 2.15.

$$K_{UF} = \frac{Q_{UF}}{\Delta P - \Delta \pi} \quad (\text{Equação 2.15})$$

O coeficiente de ultrafiltração não é normalizado pela área, portanto é uma propriedade do dialisador e não da membrana. Além disso, apesar de ser similar à permeabilidade hidráulica, é um parâmetro mais abrangente, pois considera os efeitos da exposição do dialisador ao sangue (OFSTHUN *et al.*, 2008).

### 2.2.3.3. Toxinas urêmicas

A maioria dos solutos que tende a se acumular no organismo em casos de uremia possui baixa massa molecular e, portanto, pode ser removida por diálise. Alguns são originados da alimentação, como sódio e fósforo, e outros são produtos do metabolismo, como ureia, ácido úrico e íon hidrogênio.

A ureia é um soluto de grande importância em pacientes com doenças renais crônicas em estágio terminal porque é o soluto que se acumula em maior quantidade. Entretanto, o acúmulo de ureia pode ocorrer como resultado tanto do catabolismo de

aminoácidos quanto da falha de excreção renal. Dessa forma, medidas adicionais devem ser utilizadas para determinar as contribuições relativas da geração e da excreção. Modelos matemáticos de cinética de ureia aplicados às concentrações séricas de ureia medidas antes e após tratamentos de diálise permitem a separação do catabolismo de aminoácidos das contribuições do dialisador e da função renal nativa (YEUN e DEPNER, 2010).

Verificou-se que diversas outras substâncias se acumulam em casos de insuficiência renal, mas os dados sobre a sua potencial toxicidade são escassos. As toxinas urêmicas podem ser agrupadas de acordo com as características que influenciam a sua remoção com diálise:

- Solutos solúveis em água e de baixo massa molecular
- Solutos ligados a proteínas
- Solutos sequestrados
- Moléculas de médio a alta massa molecular

A Tabela 2.2 apresenta diversos solutos acumulados em casos de uremia e sua potencial toxicidade ao organismo.

**Tabela 2.2.** Solutos acumulados na uremia e seu efeito de toxicidade no organismo. Fonte: Adaptado de Yeun e Depner (2010).

<b>Soluto</b>	<b>Efeito de Toxicidade</b>
<b>Solúveis em água de baixa massa molecular</b>	
<i>Sódio</i>	<i>Sobrecarga de volume</i>
<i>Potássio</i>	<i>Arritmia; fraqueza muscular</i>
<i>Íon hidrogênio (acidose metabólica)</i>	<i>Degrada proteína; altera os níveis de vitamina D e de hormônios paratireóides</i>
<i>Ureia</i>	<i>Nenhum</i>
<i>Creatinina</i>	<i>Nenhum</i>
<i>Guanidinas</i>	<i>Disfunção imune; neurotoxicidade</i>
<i>Oxalato</i>	<i>Inibe a replicação e migração de células endoteliais</i>

**Tabela 2.2.** Solutos acumulados na uremia e seu efeito de toxicidade no organismo.  
 Fonte: Adaptado de Yeun e Depner (2010). (cont.)

<b>Soluto</b>	<b>Efeito de Toxicidade</b>
<i>Dimetilarginina assimétrica</i>	<i>Doença cardiovascular</i>
<i>3-carboxi-4metil-5-propil-2-furampropionato</i>	<i>Inibe a eritropoiese; inibe a oxidação mitocondrial</i>
<i>Ácido 4-hidróxibenzóico (ácido fenólico)</i>	<i>Disfunção plaquetária; redução da sobrevivência dos glóbulos vermelhos; sintomas neurológicos</i>
<b>Ligados a proteínas</b>	
<i>Ácido hipúrico</i>	<i>Fraqueza muscular; sintomas neurológicos; diminui a ligação de drogas à albumina</i>
<i>Indoxil sulfato</i>	<i>Estresse oxidativo; doença cardiovascular</i>
<i>p - cresol</i>	<i>Disfunção imune; doença vascular; estresse oxidativo</i>
<i>Ácido quinolínico</i>	<i>Inibe a eritropoiese; convulsões em ratos</i>
<i>Homocisteína</i>	<i>Doença cardiovascular</i>
<i>Pentosidina</i>	<i>Doença cardiovascular</i>
<i>Leptina</i>	<i>Doença cardiovascular</i>
<b>Sequestrados</b>	
<i>Fosfato</i>	<i>Osteodistrofia; doença cardiovascular</i>
<i>Magnésio</i>	<i>Fraqueza muscular</i>
<b>Massa molecular média (500 a 5000 Daltons) e alta (5000 a 50000 Daltons)</b>	
<i>Hormônio da paratireoide</i>	<i>Inibe a oxidação mitocondrial; cardiomiopatia hipertrófica; fibrose cardíaca; disfunção imune</i>
<i>β<sub>2</sub> – microglobulina</i>	<i>Amiloidose dialítica</i>
<i>Proteínas carbamiladas</i>	<i>Doença cardiovascular</i>
<i>Produtos avançados de glicação final</i>	<i>Amiloidose; doença cardiovascular; estresse oxidativo</i>

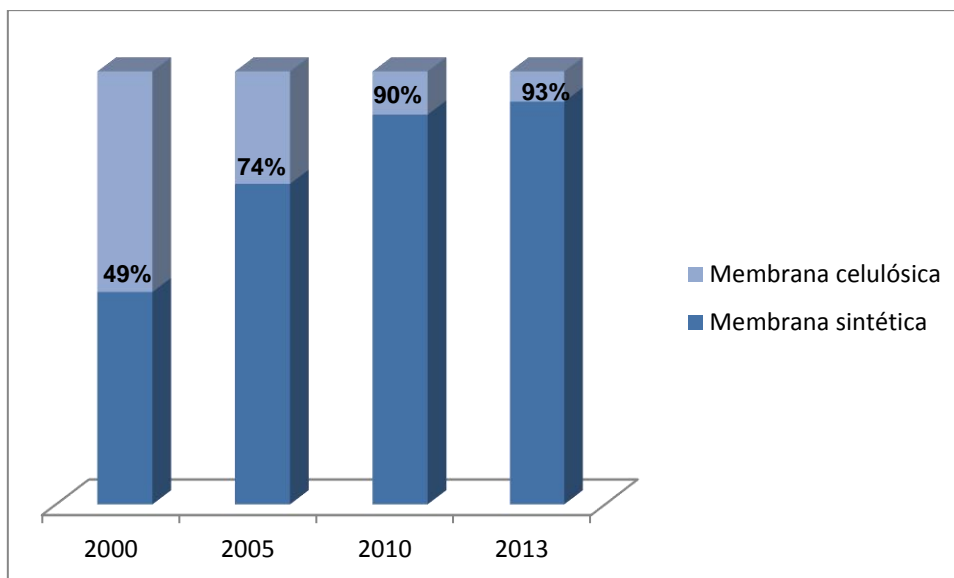
O efeito de toxicidade apresentado pelas substâncias apresentadas na Tabela 2.2 pode ocorrer devido ao seu acúmulo progressivo, perturbação do equilíbrio de oxidação-redução, ligação a importantes proteínas de transporte e de sinalização, alteração de mensageiros secundários e alteração da produção de ácido nítrico.

A remoção de solutos é dependente de uma variedade de fatores, como concentração, taxas de transporte através das membranas celulares, ligação dos solutos com proteínas, carga eletrostática, configuração estérica e massa molar. Em hemodiálise, essa remoção ocorre através da combinação dos processos de difusão, convecção e adsorção.

### 2.3. MEMBRANAS DE HEMODIÁLISE

O hemodialisador é configurado para permitir fluxos de sangue e dialisato, em direções opostas. As principais diferenças entre os hemodialisadores disponíveis são a composição, a configuração e a área de superfície da membrana.

Segundo Stamatialis *et al.* (2008), as membranas de hemodiálise podem ser classificadas em duas categorias principais: membranas celulósicas e membranas sintéticas. As membranas de celulose foram utilizadas principalmente até o final dos anos de 1960, quando se percebeu que os grupos hidroxila –OH livres resultam em baixa compatibilidade sanguínea. Assim, surgiram as membranas de celulose modificadas, devido à necessidade de substituir estes grupos ou recobri-los com poli(glicol etilênico) ou vitamina E. Atualmente, as membranas sintéticas são as mais utilizadas no tratamento por hemodiálise, conforme pode ser verificado na Figura 2.14, porque geralmente estas membranas possuem maior permeabilidade hidráulica e melhor biocompatibilidade que as membranas de celulose, podendo ser hidrofílicas ou hidrofóbicas e serem fabricadas com uma ampla faixa de fluxo de permeado.

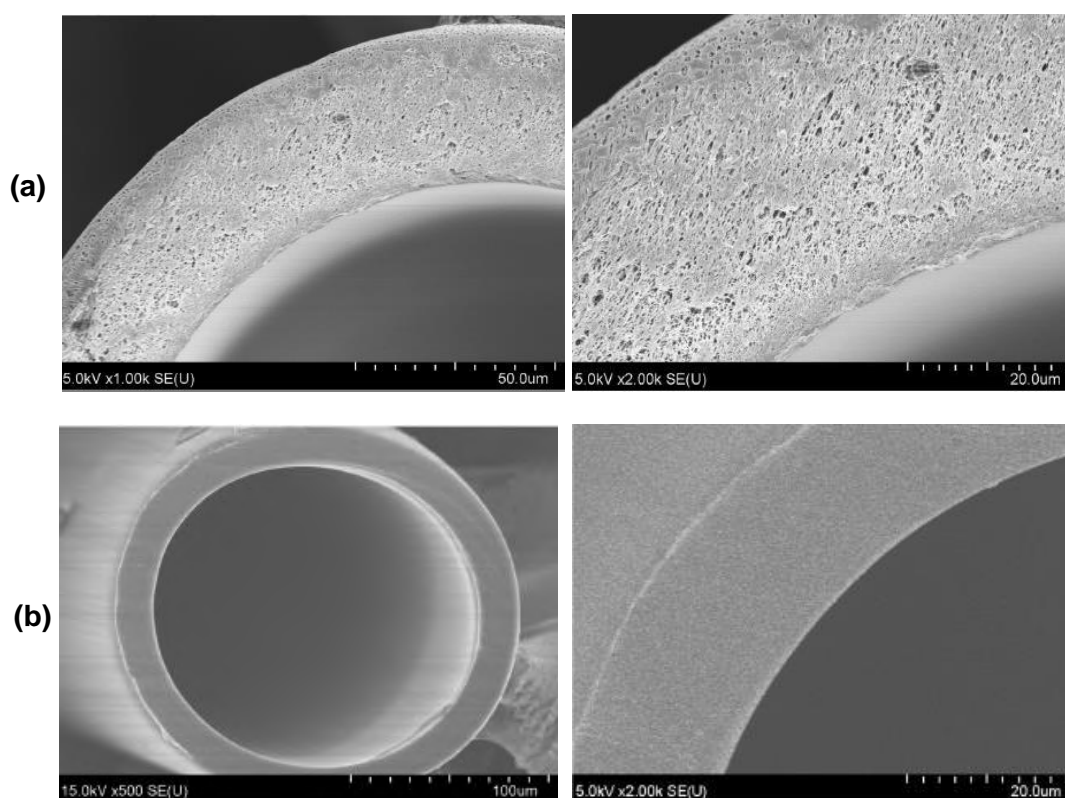


**Figura 2.14.** Evolução do uso de membranas celulósicas e sintéticas ao longo dos anos.  
 Fonte: Adaptado de Fresenius Medical Care (2014).

Entre os materiais sintéticos utilizados para a síntese de membranas de hemodiálise estão polissulfona, policarbonato, polietileno, polipropileno, poli(éter sulfona), poli(metacrilato de metila), poli(acrilonitrila). Uma vez que os tamanhos de poros nas membranas sintéticas podem ser mais amplos, substâncias de maior peso molecular, como a  $\beta_2$ -microglobulina, podem ser removidas de forma mais eficiente. A polissulfona é citada como o material mais utilizado devido à sua estabilidade térmica, mecânica e oxidativa, de suas excelentes propriedades em formar filmes e à alta permeabilidade a substâncias tóxicas de baixa massa molar (SENTHILKUMAR *et al.*, 2012).

As membranas dos hemodialisadores são sintetizadas na geometria de fibra oca, em sua maioria, a partir de misturas poliméricas, através do processo de fiação contínua, por extrusão da solução, baseada no método de precipitação em não solvente. De modo geral, sua estrutura aparece constituída de dois componentes: uma camada de pele interna finamente porosa, a qual representa a barreira real para a separação de soluto, e uma estrutura de suporte externo, que se exhibe desde dentro (lado do lúmen) para fora com uma densidade de polímero progressivamente menor (porosidade aumenta). Dependendo da velocidade da precipitação durante o processo de síntese, sua estrutura de seção transversal externa analisada por microscopia pode aparecer como macroporosa ou com poros alongados digitiformes (RONCO *et al.*, 2017). Também é possível encontrar membranas de hemodiálise inteiramente densas, também chamadas homogêneas, nas quais toda a espessura contribui para a resistência ao

transporte de água e solutos. De modo geral, as membranas celulósicas são homogêneas. A Figura 2.15 apresenta uma fotomicrografia eletrônica de uma membrana de hemodiálise de polissulfona (a), evidenciando a pele interna e a camada porosa de suporte, bem como de uma membrana homogênea do copolímero poli(etileno-co-álcool vinílico) (EVAL).



**Figura 2.15.** Fotomicrografia da seção transversal de uma membrana de hemodiálise de (a) polissulfona e de (b) EVAL. Fonte: Yamashita e Sakurai (2015). *(Reprodução permitida)*.

A espessura da membrana também é um parâmetro importante para viabilizar o transporte difusivo dos solutos urêmicos. As primeiras membranas sintéticas na geometria fibra oca não eram adequadas para a transferência de massa difusiva, pois sua espessura de parede variava de 70 a 100  $\mu\text{m}$ , devido à contribuição da camada de suporte. Com o avanço da tecnologia, a espessura das membranas sintéticas modernas foi reduzida para 30  $\mu\text{m}$  ou menos. No entanto, o aspecto mais importante é a redução da espessura interna da camada de pele para 1 a 2  $\mu\text{m}$ . Isso contribui para a redução da resistência da membrana ao transporte e permite a utilização de modalidades



combinadas de difusão/convecção, como diálise de alto fluxo e hemodiafiltração (RONCO *et al.*, 2017).

A maioria dos hemodialisadores tem uma área de superfície de membrana que pode variar de 0,8 a 2,1 m<sup>2</sup>. À medida que a área aumenta, o transporte de soluto aumenta. Para maximizar a área de superfície da membrana, pode-se aumentar o comprimento da fibra oca, aumentar o número de fibras ocas, ou diminuir o diâmetro da fibra oca, porém, cada uma dessas alterações pode resultar em efeitos indesejáveis no processo. Aumentar o comprimento da fibra aumenta a taxa de cisalhamento e aumenta a queda de pressão (perda de carga) entre a entrada de sangue e a saída do dialisador. O aumento da taxa de cisalhamento aumenta a ultrafiltração, porém a queda de pressão diminui a ultrafiltração, porque o gradiente de pressão através da membrana é dissipado na saída venosa do dialisador. Qualquer diminuição na ultrafiltração diminui sua contribuição para a remoção de soluto e, portanto, o aumento do comprimento da fibra pode não resultar em aumento da remoção de solutos. Aumentar o número de fibras ocas aumenta o volume de sangue extracorpóreo e, eventualmente, pode comprometer a estabilidade hemodinâmica. Finalmente, com a redução do diâmetro da fibra oca ocorre o aumento da taxa de filtração, mas a coagulação também é elevada. Com isso, a área superficial efetiva para a difusão diminui, assim como a remoção de soluto. Devido a essas consequências adversas, o diâmetro de fibra interno mínimo aceitável é de 180 µm (YEUN e DEPNER, 2010).

Além da classificação das membranas de hemodiálise em relação ao material, as membranas podem ser classificadas em membranas de baixo fluxo ou membranas de alto fluxo, o que inicialmente era referido apenas a sua permeabilidade hidráulica. Atualmente, o termo refere-se tanto a permeabilidade a água quanto a permeabilidade a solutos. Dessa forma, membranas de alto fluxo são aquelas com alta permeabilidade a solutos, como moléculas de massa molecular média e moléculas ligadas a proteínas, e com alta permeabilidade a água (TOMO, 2018). Ward (2005) definiu membranas de alto fluxo com base em uma combinação de permeabilidade à água, parâmetros de remoção de  $\beta_2$ -microglobulina e de albumina. A classe de alto fluxo foi definida por uma permeabilidade à água de 20 - 40 mL/h/mmHg/m<sup>2</sup>, coeficiente de permeabilidade de  $\beta_2$ -microglobulina de 0,7 - 0,8 e perda de albumina (baseada em um tratamento de quatro horas) de menos que 0,5 g. O coeficiente de permeabilidade indica o quanto de soluto passou pela membrana e varia entre 0 e 1. Um coeficiente 0 indica que nenhum soluto atravessou a membrana, enquanto um coeficiente 1 indica que todo o soluto passou pela membrana.

Segundo Stamatialis *et al.* (2008), as membranas para uso em hemodiálise devem apresentar algumas características específicas, e a membrana ideal de hemodiálise possui:

- Ótima biocompatibilidade;
- Uma fina cama efetiva de separação, para obter elevados fluxos de solutos;
- Alta porosidade para fornecer alta permeabilidade hidráulica;
- Estreita distribuição de tamanho de poros para obter um limite de retenção mais bem definido;
- Rugosidade mínima na superfície para reduzir interações com os componentes do sangue;
- Estabilidade mecânica suficiente para suportar os gradientes de pressão necessários;
- Estabilidades térmica e química suficientes para suportar os processos de esterilização.

Su *et al.* (2011) produziram fibras ocas de poli(éter sulfona) (PES) para uso em hemodiálise. As fibras foram produzidas a partir de misturas poliméricas de PES e poli(vinil pirrolidona) (PVP) através da extrusão da solução, preparando-se o módulo dialisador usando uma resina de poliuretano como material de colagem. A eficiência do dialisador produzido foi avaliada através de experimentos de ultrafiltração e *clearance* de solutos, a partir de soluções sintéticas contendo ureia, creatinina e fosfato, preparadas de acordo com o padrão internacional ISO 8637. O *clearance* foi calculado utilizando a Equação 2.13 anteriormente descrita e os autores obtiveram reduções de ureia de 94% e creatinina de 92% com *clearances* de 174, 169 e 170 mL/min, para ureia, creatinina e fosfato, respectivamente, valores comparáveis com os comerciais. Adicionalmente, os autores realizaram testes de adsorção de proteínas, importante fator para determinação da compatibilidade sanguínea da membrana, e de adesão de plaquetas, evento inicial na formação de trombos na superfície do material, e concluíram que além das boas características de *clearance* e Remoção de ureia, as membranas de PES de alto fluxo possuem boa compatibilidade sanguínea e podem eventualmente ser aptas à remoção de solutos de média massa molar, como a  $\beta_2$  – microglobulina.

Wechs *et al.* (2014), na patente US 8651284 B2, propuseram uma invenção relacionada a uma membrana de fibra oca semipermeável, hidrofílica, baseada em um polímero sintético para uso em hemodiálise ou hemodiafiltração convencional, com baixos volumes de troca. A membrana proposta possui uma estrutura integralmente

assimétrica, com uma camada porosa de separação de espessura entre 0,1 e 2  $\mu\text{m}$  na superfície do canal interno, adjacente a uma camada suporte com poros abertos. As membranas sintetizadas possuem excelentes propriedades de separação, permitindo a eliminação de proteínas de baixa massa molar e, ao mesmo tempo, garantem a retenção de albumina. Além disso, as membranas mostram melhoradas retenções de pirogênicos (produtos do metabolismo de organismos que podem causar febre). A solução polimérica utilizada para a síntese das fibras contém um polímero base hidrofóbico, que pode ser polissulfona ou poli(éter sulfona) e um aditivo hidrofílico, que pode ser PVP. O líquido interno era composto de uma mistura de solvente (preferencialmente o mesmo utilizado na síntese da solução polimérica) e de não solvente, além de um polieletrólito com cargas negativas fixas. Pode-se promover uma exposição da fibra extrusada ao ar antes de sua imersão no banho de coagulação, ao longo da distância entre a extrusora e este banho, que tem que ser mantido isotérmico. As fibras produzidas possuem um diâmetro externo de 150 a 300  $\mu\text{m}$  e espessura de parede entre 25 e 45  $\mu\text{m}$ .

A remoção eficiente das toxinas urêmicas, preservando proteínas metabolicamente importantes, peptídeos e células, é uma das principais propriedades que deve ter uma membrana de uso em hemodiálise. A obtenção de membranas que apresentam uma estrutura com maior uniformidade de poros permite uma melhor remoção de proteínas de baixa massa molar, reduzindo a perda de albumina. Neste sentido, Fissell *et al.* (2009), em patente de número US 7540963 B2, descreve membranas com tamanhos e formas de poros altamente controlados, com o objetivo de montar um hemofiltro biocompatível e compacto que reproduza as funções de filtração do rim natural. Os poros previstos pela patente possuem comprimento menor que 200  $\mu\text{m}$  e largura menor que 200 nm, com razão comprimento:largura de no mínimo 5:1.

A Tabela 2.3 apresenta trabalhos reportados na literatura sobre membranas para aplicação em hemodiálise, destacando suas principais características descritas neste item.

A biocompatibilidade, por ser a propriedade das membranas de hemodiálise explorada nesse trabalho, será abordada à parte, no Capítulo 3.

**Tabela 2.3.** Trabalhos reportados na literatura sobre membranas para aplicação em hemodiálise.

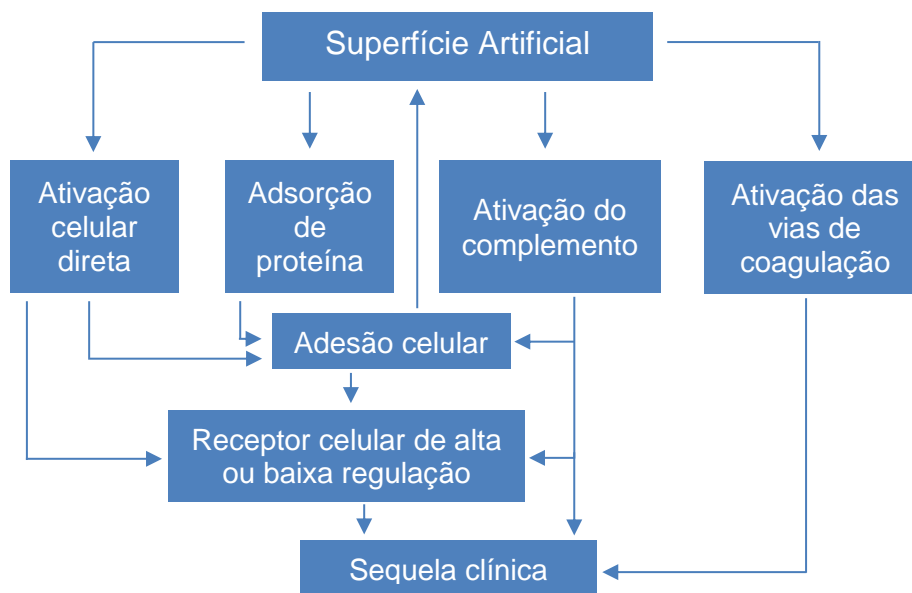
<b>Autor (ano)</b>	<b>Material</b>	<b>Espessura da parede (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Área (<math>\text{m}^2</math>)</b>	<b>Permeabilidade Hidráulica (<math>\text{L}/\text{hm}^2\text{bar}</math>)</b>
<b>Huang <i>et al.</i> (2011)</b>	Polissulfona	150 (plana)	0,0049	178,3
<b>Gao <i>et al.</i> (2014)</b>	Poli(ácido láctico)	150 (plana)	0,0064	120
<b>Mahlicli e Altinkaya (2014)</b>	Polissulfona	150 (plana)	0,00015	-
<b>Irfan <i>et al.</i> (2014)</b>	Poli(éter sulfona)	200 (plana)	0,0042	7,1
<b>Abidin <i>et al.</i> (2016)</b>	Poli(éter sulfona)	-	-	21,4
<b>Santos <i>et al.</i> (2017)</b>	Poli(éter imida)	-	-	44,3
<b>Abidin <i>et al.</i> (2017)</b>	Poli(éter sulfona)	74	0,01	149,67
<b>Verma <i>et al.</i> (2017)</b>	Poli(éter sulfona)	50	0,0112	20,4

# **CAPÍTULO 3 – BIOCOMPATIBILIDADE E MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL**

A biocompatibilidade é definida como a capacidade de um biomaterial em desempenhar a função desejada em relação a uma terapia médica, sem provocar quaisquer efeitos indesejáveis ou sistêmicos no receptor ou beneficiário dessa terapia, mas gerando a resposta celular ou tecidual benéfica mais apropriada naquele tratamento específico (BLACK, 2005).

A biocompatibilidade é uma propriedade essencial das membranas de hemodiálise, sendo definida como a soma das interações específicas entre o sangue e o material do circuito da hemodiálise. Como os materiais utilizados em hemodiálise são estranhos ao corpo humano, a biocompatibilidade também pode ser descrita como uma resposta inflamatória. Se essa resposta for branda e tolerável, o material é descrito como biocompatível (HAKIM, 1993).

Durante a hemodiálise, as fibras ocas do dialisador constituem uma membrana de grande superfície, não fisiológica, à qual o sangue é exposto e cada exposição resulta na deposição de proteínas, ativação do sistema complemento, quinina, coagulação e caminhos fibrinolíticos, bem como a ativação de elementos celulares para cada ocasião. A magnitude desses eventos está associada a uma variedade de fatores, como composição química e característica da superfície da membrana (HOENICH, 2004). A Figura 3.1 apresenta esquematicamente o que ocorre com o sangue quando exposto à superfície de um material, como uma membrana, por exemplo.



**Figura 3.1.** Eventos relacionados à exposição do sangue a um material “estranho”.  
Fonte: SANTOS (2014).

As propriedades da membrana em relação à adsorção de proteínas representam um importante fator relacionado à biocompatibilidade, pois a adsorção de proteínas do plasma em sua superfície pode ativar diversos componentes celulares e plasmáticos do sangue, com potenciais consequências patofisiológicas para o paciente dialisado (PIERONI *et al.*, 2015).

A hidrofiliicidade da membrana é um importante fator que influencia a adsorção de proteínas, bem como a remoção de solutos. Materiais hidrofóbicos em geral são associados à maior quantidade de proteína adsorvida. As membranas celulósicas são hidrofílicas e, em contato com sangue e dialisado, tornam-se um hidrogel. Os poros são, portanto, canais com uma fase fluida interna contínua através da qual os solutos podem se difundir livremente. As primeiras membranas sintéticas apresentaram alto grau de hidrofobia, o que impediu a criação de estruturas de poro semelhantes. Com as recentes modificações e a mistura de polímeros, juntamente com a adição de componentes como poli(vinil pirrolidona) ou outros materiais, as membranas sintéticas tornaram-se menos hidrofóbicas, permitindo a combinação de difusão e convecção para remoção de soluto (RONCO *et al.*, 2003). Além disso, a maior hidrofiliicidade reduz os efeitos de incrustação devido à interação com proteínas plasmáticas e fatores de coagulação (RONCO *et al.*, 2017).

MATTHIASSEN (1983) estudou a adsorção de albumina sérica bovina em diferentes membranas (acetato de celulose, polissulfona e poliamida) e observou a correlação entre a adsorção e a natureza hidrofílica/hidrofóbica do polímero. O autor observou que a adsorção de proteína atingiu o máximo nas membranas hidrofóbicas de polissulfona e um mínimo nas membranas hidrofílicas de acetato de celulose.

Muitas membranas sintéticas incluem um agente hidrofílico, como a poli(vinil pirrolidona) (PVP) durante sua síntese. Nesse sentido, Wang *et al.* (2009) avaliaram o aumento da hidrofiliabilidade e da compatibilidade sanguínea de membranas de poli(éter sulfona) devido ao uso do PVP como agente hidrofílico. Os autores observaram que houve aumento da hidrofiliabilidade das membranas, avaliada por meio de análises de ângulo de contato e de absorção de água. A compatibilidade sanguínea melhorou, o que foi confirmado por análises de tempo de coagulação

A eletronegatividade superficial pode influenciar a biocompatibilidade da membrana, pois influencia as interações com vários padrões moleculares do sangue que fluem através da fibra oca e pode facilitar ou interferir com a capacidade de adsorção de substâncias específicas. A eletronegatividade da membrana pode ser obtida a partir da análise do potencial zeta, termo científico para o potencial eletrocinético em dispersões coloidais. A magnitude do potencial zeta indica o grau de repulsão eletrostática entre a membrana e partículas carregadas de forma semelhante em uma dispersão (ou atração de cargas opostas). O processo de polimerização e a composição química em conjunto com a mistura de polímeros podem contribuir para um potencial zeta específico da membrana (RONCO *et al.*, 2017).

A adesão de plaquetas é outro indicador da biocompatibilidade das membranas utilizadas para contato com o sangue. A concentração média de plaquetas no sangue humano é de  $200 \times 10^6$  células/mL e elas reagem a um mínimo estímulo, tornando-se ativadas quando do contato com qualquer superfície danificada do endotélio ou de polímero trombogênico. Qualquer interação extracelular com as membranas das plaquetas inicia o acoplamento de receptores específicos, que é a principal causa de sua ativação. Os maiores ativadores de plaquetas são as células inflamatórias, como o fibrinogênio, trombina e produtos da parede vascular (IRFAN e IDRIS, 2015).

Quando a proteína adsorve na superfície artificial, as plaquetas também irão aderir a essa superfície. Reações do complemento e ativação de leucócitos também podem causar adesão de plaquetas.

As ativações do complemento são respostas inflamatórias, iniciadas pelo mediador inflamatório localizado, que induz o sistema de defesa do hospedeiro. Pode

ser ativado através de três caminhos iniciais diferentes: (i) a via clássica, tanto pela ligação do anticorpo ao antígeno quanto por mecanismos não dependentes de anticorpos; (ii) a via de lectina ligadora de manose (MBL), por ligação de MBL a agentes infecciosos; e (iii) o caminho alternativo, por estruturas estrangeiras. As três vias convergem em C3, que catalisa a ativação da via terminal C5 - C9. O principal resultado da ativação do complemento é uma reação inflamatória, que é benéfica na defesa contra agentes infecciosos. O complemento, no entanto, é ativado não só por agentes infecciosos, mas, em princípio, por qualquer material estranho. Portanto, as superfícies artificiais utilizadas na intervenção médica causam ativação do complemento até certo ponto, com reações inflamatórias subsequentes, o que, em tais circunstâncias, pode prejudicar o paciente.

O nível de ativação do complemento produzido por uma membrana é um fator determinante para sua biocompatibilidade e pode ser quantificado pela produção de anafilatoxinas C5a, C4a e C3a (IRFAN e IDRIS, 2015). Os produtos do complemento servem como marcadores e podem ser detectadas com um máximo de cinco a dez minutos após o início da diálise.

Tang *et al.* (2012) sintetizaram membranas de poli(éter sulfona) modificadas com dois agentes, poli(éter sulfona) sulfonada e poli(acrilonitrila – ácido acrílico – vinilpirrolidona) (P(AN-AA-VP) e avaliaram a ativação do complemento em relação aos fatores C3a e C5a. Eles desenvolveram estruturas semelhantes à heparina, criando cargas negativas na membrana, o que resultou em redução da ativação de C3a e C5a em 4% e 37,5%, respectivamente, com P (AN-AA-VP) e 19,23% e 40,62%, respectivamente, com SPES em comparação com a membrana sem modificação. Os autores atribuíram a redução da ativação das reações do complemento à alta porcentagem de grupos sulfônicos introduzidos na superfície da membrana que inibiram a formação do caminho clássico e alternativo da proteína C3.

De maneira similar, Nie *et al.* (2014) prepararam membranas a partir da mistura de poli(éter sulfona), poli(éter sulfona sulfonada) e poli(éter sulfona) carboxílica e avaliaram a ativação do complemento nos níveis de C3a e C5a. Os resultados obtidos pelos autores também confirmaram que o incremento no caráter aniônico da membrana resultante diminuiu a ativação do complemento, uma vez que as concentrações de C3a diminuíram de 42,5 para 34 ng/mL comparando com o da membrana de poli(éter sulfona) não modificada.

A metodologia de síntese e a composição do material determinam a estrutura final e as propriedades de uma membrana de hemodiálise. O componente mais



importante da membrana é a camada interna da pele e a superfície que estabelece contato com o sangue, porque as características da superfície determinam o desempenho final da membrana em relação à ocorrência de fenômenos superficiais indesejáveis, incluindo a ativação em cascata de coagulação (levando à formação de coágulos) e deposição de proteína (levando à incrustação).

Novos processos bioquímicos e físicos permitiram modificar a superfície interna das fibras ocas, levando a uma melhor permeabilidade, biocompatibilidade e características antiincrustantes. Segundo Ronco *et al.* (2017), quase 60% das membranas comercializadas, para qualquer aplicação, possuem alguma forma de modificação da superfície. Diversos métodos podem ser aplicados a fim de modificar a superfície de uma membrana visando ao aumento da sua biocompatibilidade, conforme será abordado no próximo tópico.

### 3.1. MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL: AUMENTO DA BIOCAMPATIBILIDADE

Um biomaterial é um material substancialmente insolúvel nos fluidos corporais, projetado para ser colocado dentro do corpo ou para estar em contato com os fluidos do corpo. Idealmente, um biomaterial não induz reações indesejáveis no corpo, como coagulação do sangue, morte de tecidos, formação de tumor, reação alérgica, reação/rejeição ao corpo estranho ou reação inflamatória; tem propriedades físicas como resistência, elasticidade, permeabilidade e flexibilidade necessárias para a função proposta; pode ser purificado, fabricado e esterilizado facilmente; mantém suas propriedades físicas e função durante o tempo em que permanece implantado ou em contato com o corpo (CAHALAN *et al.*, 1998).

Os biomateriais devem possuir alguns requisitos para prevenir completamente a ativação do sistema de coagulação e a formação de coágulos. Segundo Mao *et al.* (2004), em geral, duas estratégias principais são utilizadas para melhorar a compatibilidade sanguínea:

- a) Criar superfícies que previnam ou eliminem reações indesejadas ou incontrolláveis do sangue, como a ativação do sistema de coagulação ou a ativação e agregação de plaquetas sanguíneas;
- b) Preparar polímeros que sejam inertes ou passivos com respeito às interações com o sangue.

Como as interações que levam à formação de trombo ocorrem primariamente na interface sangue/biomaterial, a modificação apropriada da superfície é a estratégia atualmente mais utilizada, pois pode melhorar a compatibilidade sanguínea dos materiais sem alterar as propriedades estruturais necessárias às aplicações biomédicas (AMIJI e PARK, 1993). Para a modificação da superfície dos materiais, existem os métodos físico-químicos e os métodos biológicos, cujo objetivo é minimizar a ocorrência de basicamente três eventos (MEL *et al.*, 2011):

- 1) A adsorção de proteínas;
- 2) A geração de trombina, já que sua formação leva à coagulação do sangue;
- 3) A adesão de plaquetas, seguida de sua agregação e ativação.

A seguir, alguns métodos de modificação de biomateriais serão descritos mais detalhadamente, apresentando resultados de trabalhos recentes na área, focando em trabalhos voltados à modificação de materiais para uso em hemodiálise (membranas poliméricas).

### **3.1.1. Mistura Física**

O uso de uma mistura física é a técnica mais fácil de modificação de materiais, sendo considerada bastante eficiente. A produção de misturas é considerada técnica *bulk*, pois é aplicada às soluções poliméricas, modificando a membrana como um todo (IRFAN e IDRIS, 2015). Por esta técnica, dois ou mais polímeros são fisicamente misturados para obter as características necessárias à aplicação desejada.

Em hemodiálise, o aditivo macromolecular poli(vinil pirrolidona) (PVP) é muito utilizado para formar as misturas físicas com o polímero base, sintetizando-se membranas com boas propriedades de biocompatibilidade. O PVP foi sintetizado em 1930 na Alemanha e atualmente, vem sendo usado como agente hidrofílico no campo de membranas industriais, além de muitas outras aplicações (HAYAMA *et al.*, 2004).

Hayama *et al.* (2004) estudaram como o PVP melhora a biocompatibilidade de membranas de polissulfona (PSf), analisando quatro membranas comerciais de hemodiálise sintetizadas a partir da blenda entre PSf e PVP. Os autores avaliaram as características de superfície de cada membrana e a biocompatibilidade, através da análise da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e da quantidade de proteína adsorvida. Os autores concluíram que a biocompatibilidade da membrana

depende da quantidade de PVP presente na superfície da mesma, mas este não é o fator determinante. O método de esterilização utilizado também influencia de modo significativo, sugerindo-se que a esterilização por raios gama promove reticulações entre a PSf e o PVP, enquanto a esterilização por autoclave, não. Assim, esta é capaz de alcançar altas biocompatibilidades mesmo com membranas contendo pequena quantidade de PVP. Os autores verificaram também que a rugosidade da superfície e mudanças que ocorrem em condições secas e molhadas também influenciam a biocompatibilidade em alguma extensão, mas é impossível avaliar o efeito delas isoladamente.

Na mesma linha de pesquisa, Zhang *et al.* (2016) preparam fibras ocas de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), a partir de misturas físicas contendo PVP e poli(glicol etileno) (PEG) para aplicação em hemodiálise. Os resultados mostraram que as membranas modificadas tiveram melhores propriedades de transporte (maior fluxo e maior remoção de lisozima), bem como maior biocompatibilidade em relação às membranas de PVDF puras. As membranas modificadas apresentaram maior hidrofiliabilidade, antitrombogenicidade, menor absorção de albumina, menor razão de hemólise e menor adesão de plaquetas. Além disso, as membranas apresentaram maior tempo de coagulação, avaliadas em função do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) em relação a membranas comerciais de polissulfona testadas para comparação.

Outros aditivos também são utilizados para formar misturas visando ao aumento da biocompatibilidade da membrana a ser sintetizada. Como exemplo, Zailani *et al.* (2017) avaliaram a mistura de poli(citrato de 1,8 – octanodiol) (PCO) em membranas poli(éter sulfona) a fim de aumentar sua hemocompatibilidade. Foram sintetizadas membranas a partir de soluções poliméricas contendo diferentes quantidades do PCO, avaliando sua hemocompatibilidade a partir de análises de adsorção de proteínas, adesão de plaquetas, TTPA, TP, trombina-antitrombina III, ativação do complemento e absorção de  $Ca^{2+}$  na membrana. Os autores observaram que, com o aumento da quantidade de POC, houve aumento da hemocompatibilidade e, portanto, as membranas possuem potencial para aplicação em purificação sanguínea e hemodiálise.

Ma *et al.* (2014) sintetizaram membranas planas e do tipo fibra oca a partir de misturas de PES e poliuretano (PU) modificado através da introdução de grupos hidroxila, carboxila e sulfônicos, para mimetizar a estrutura da heparina. As membranas sintetizadas foram avaliadas em testes *in vitro* e *in vivo*, e os autores observaram que em relação às membranas de PES simples, houve redução da quantidade de proteína adsorvida de 72% para albumina e de 65% para fibrinogênio; a adesão de plaquetas foi

praticamente eliminada; houve aumento do tempo de coagulação e redução na geração e ativação da trombina. Além disso, os testes *in vivo* mostraram que as membranas apresentam bom efeito terapêutico em comparação com as membranas de PES, com potencial para ser utilizada para purificação sanguínea. Interessante notar que neste trabalho, além da mistura com o PU, também foi utilizada uma quantidade de PVP na solução polimérica que gera a membrana ou a fibra.

Também são encontradas patentes de membranas de hemodiálise formadas a partir de misturas de polímeros. Buck *et al.* (2013) criaram uma membrana para hemodiálise, hemofiltração ou hemodiafiltração a partir de PES ou PSf e PVP, de propriedade da Gambro Lundia AB. As membranas do tipo fibra oca da patente possuem melhoradas permeabilidade e seletividade, com coeficiente de peneira de mioglobina entre 86% e 90%, permeabilidade hidráulica entre  $56 \times 10^{-4}$  e  $84 \times 10^{-4}$  cm/bar.s e seletividade de mioglobina para albumina de 9,4. Na patente, não são citadas caracterizações em relação à biocompatibilidade.

De modo geral, observa-se que a mistura física é um método de modificação muito utilizado e poucos foram os trabalhos encontrados na literatura recente que utilizam membranas sintetizadas a partir de soluções poliméricas simples.

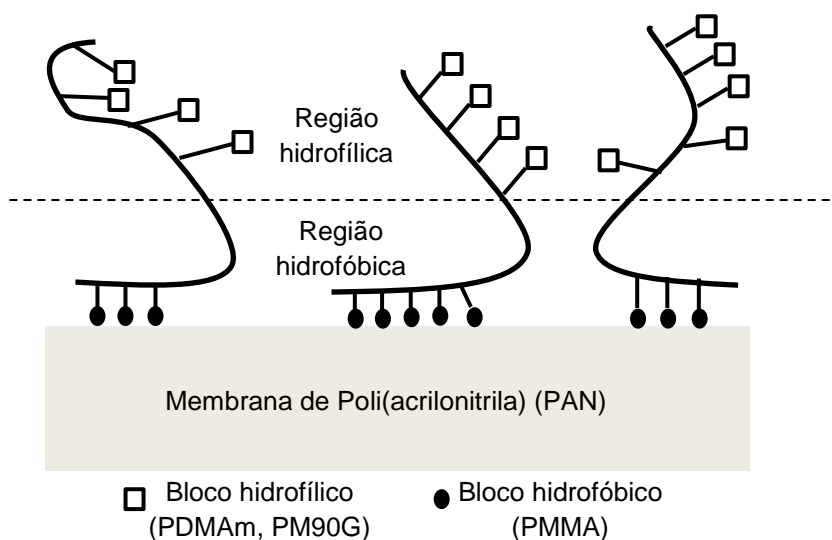
### **3.1.2. Recobrimento da Superfície**

O recobrimento da superfície é um método efetivo de modificação superficial de biomateriais visando ao aumento da biocompatibilidade dos mesmos, sendo utilizadas várias técnicas para recobrir materiais para aplicações médicas, como a precipitação biomimética, a deposição eletroforética, a pulverização em fase plasma, revestimento por imersão, entre outros.

Ao utilizar o recobrimento da superfície, uma fina camada de um filme é depositada diretamente na superfície de uma membrana (ZHAO *et al.*, 2013). Os métodos de recobrimento podem ser divididos nas seguintes técnicas: recobrimento de uma fina camada hidrofílica por adsorção física; recobrimento com monocamada usando Langmuir-Blodgett ou técnicas análogas; deposição a partir de uma descarga luminescente de plasma; e espalhamento ou extrusão de duas soluções poliméricas por fiação simultânea usando uma extrusora tripla, por exemplo (por esta técnica, o uso de diferentes solventes para cada solução polimérica facilita a adesão entre a camada de recobrimento superior e o polímero base) (NADY *et al.*, 2011).

Muitos implantes médicos são recobertos com hidroxiapatita devido à sua rápida integração com o corpo humano em relação a outros materiais, e com fosfato de cálcio para melhorar a biocompatibilidade, ou com uma mistura dos dois (JOHN *et al.*, 2015).

Matsuda e Ito (1994) utilizaram a técnica de recobrimento da superfície de membranas de poli(acrilonitrila) (PAN) de hemodiálise para reduzir a estimulação de plaquetas, utilizando um copolímero dibloco hidrofílico-hidrofóbico. O bloco hidrofílico do copolímero é composto por poli(metoxi polietileno glicol metacrilato) (PM90G) ou poli(dimetil acrilamida) (PDMAm) e o bloco hidrofóbico é poli(metacrilato de metila) (PMMA). Os autores supuseram que em consequência do recobrimento, o bloco hidrofóbico do copolímero se fixava na superfície hidrofóbica da membrana de PAN, via interação hidrofóbica, enquanto o bloco hidrofílico orientava-se em direção ao sangue, conforme a estrutura proposta pela Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Estrutura proposta da superfície da membrana de PAN recoberta com o copolímero dibloco. Fonte: Adaptado de Matsuda e Ito (1994).

Os autores observaram que o ângulo de contato das membranas recobertas se reduzia à medida que se aumentava a fração do bloco hidrofílico, conforme esperado. Além disso, observaram que em todos os casos os ângulos de contato de avanço foram maiores que os de retrocesso, o que pode indicar que o bloco hidrofóbico foi enriquecido na camada mais externa no ar. Os menores ângulos de retrocesso indicam que o bloco hidrofílico foi dominante na interface água polímero, indicando que uma estrutura interfacial é produzida após a imersão em água, que ocorre devido à sua elevada tensão superficial. Os autores também observaram que a adesão de plaquetas foi reduzida nas

superfícies recobertas em comparação com a membrana de poliacrilonitrila original. Como o bloco hidrofílico do copolímero não contém grupos hidroxila, os autores supuseram que as membranas recobertas também reduziam a ativação do sistema complemento, ainda que testes específicos não tenham sido realizados.

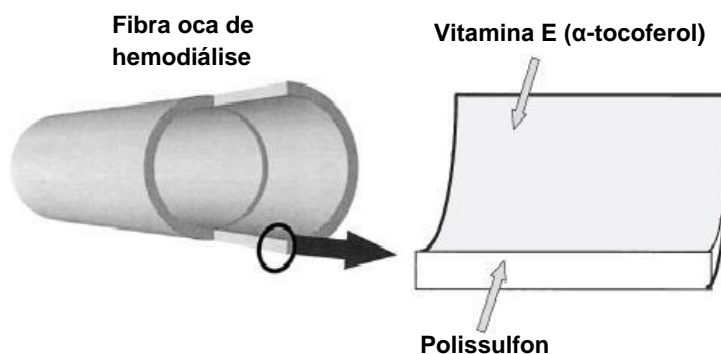
Garimella *et al.* (2014) propuseram uma nova composição para um recobrimento antitrombogênico e biocompatível a ser aplicado em superfícies em contato com o sangue, como uma membrana do tipo fibra oca. O recobrimento proposto contém sal de amônio quaternário e complexo de heparina (QUAT) e a superfície a ser recoberta é tratada previamente com poli(vinil pirrolidona) (PVP), formando o recobrimento PVP-QUAT. Outras patentes que preveem a criação de recobrimentos antitrombogênicos para uso em superfícies em contato com sangue são de Tsang *et al.* (1999) e de Huang *et al.* (2002).

O recobrimento de membranas de hemodiálise com vitamina-E tem sido bastante estudado e diversos trabalhos na literatura indicam resultados como redução do estresse oxidativo, a qual pode implicar em doenças cardiovasculares e anemia (BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2000; SATOH *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ-RIBERA *et al.*, 2017), biocompatibilidade (SASAKI, 1999; DAHE *et al.*, 2011), inflamação (D'ARRIGO *et al.*, 2017), redução da necessidade de heparina durante o tratamento (HURAIB *et al.*, 2000), entre outros benefícios.

Nesta linha de pesquisa, Aoun *et al.* (2010) descreveram possíveis vantagens clínicas dos dialisadores com membranas recobertas com vitamina E no manejo de anticoagulantes. Em um estudo de observação, esses autores avaliaram o requisito mínimo de heparina de baixo peso molecular em pacientes com diálise pediátrica. Sete crianças e adolescentes foram colocada em tratamento com o dialisador VitabranE (membrana de polissulfona recoberta com vitamina E no lado de contato com sangue) e verificou-se que a dose de heparina de baixo peso molecular diminuiu a cada semana, sem outras alterações no manejo clínico. Os autores concluíram que o uso de hemodialisadores recobertos com vitamina E pode ajudar a reduzir a necessidade de anticoagulantes em pacientes pediátricos de hemodiálise, o que pode contribuir para reduzir os problemas de sangramento e simplificar a hemostasia (resposta fisiológica normal do corpo para prevenção e interrupção de sangramento e hemorragias) na pós-diálise.

Sasaki (2006) desenvolveu membranas de polissulfona para hemodiálise modificadas pelo recobrimento com vitamina E, conforme apresentado na Figura 3.3,

avaliando sua biocompatibilidade em comparação com membranas comerciais de polissulfona, não modificadas.



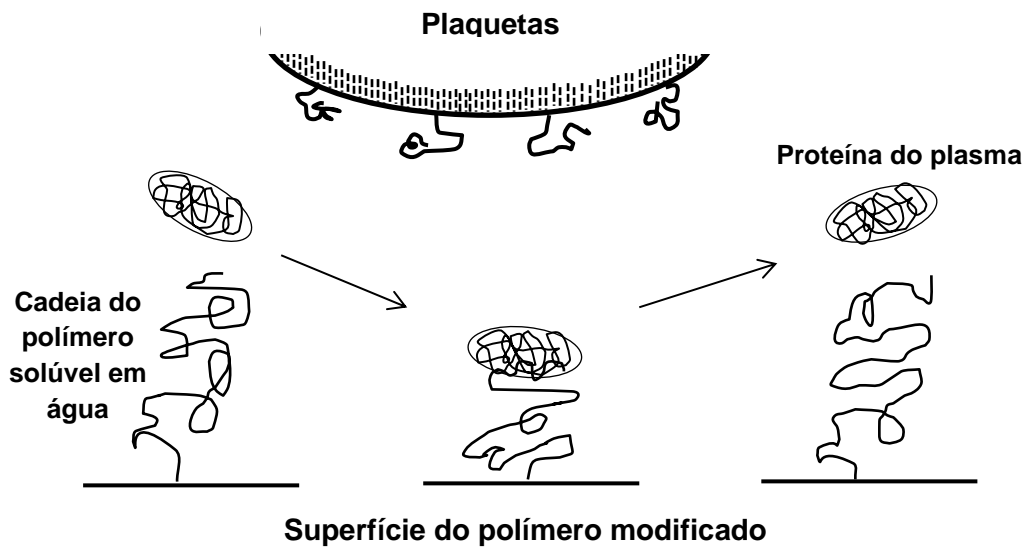
**Figura 3.3.** Membrana de polissulfona modificada com vitamina E. Fonte: Adaptado de Sasaki (2006).

Os autores verificaram que a membrana de polissulfona modificada com vitamina E suprime a ativação do complemento, de modo similar ao observado quando a membrana de polissulfona comercial não tratada é usada. Na análise da atividade antitrombótica, o potencial para ativar a fase de contato e induzir a deformação das plaquetas tende a ser menor com a membrana modificada. Em relação à atividade antioxidativa, a formação de meta-hemoglobina, peróxido lipídico e radicais de oxigênio diminuiu significativamente, indicando assim uma atividade antioxidativa da membrana modificada. Dessa forma, os autores concluíram que a utilização da membrana modificada com vitamina E em dialisadores pode trazer vantagens para os pacientes através das propriedades fisiológicas dessa substância, como sua atividade antioxidativa, contribuindo para a supressão de complicações associadas à hemodiálise.

### 3.1.3. Imobilização de Albumina

A albumina é a proteína mais abundante encontrada no sangue e sua concentração em adultos saudáveis varia de 35 mg/mL a 50 mg/mL. A albumina é uma proteína ácida, com alta solubilidade e estabilidade em água, e que apresenta três importantes funções: servir como uma fonte nutricional no metabolismo celular, ao ser produzida em quantidade suficiente pelo fígado; transportar pequenas moléculas, como esteroides, íons e ácidos graxos; e manter a pressão osmótica do sangue (AMIJI e PARK, 1993).

A modificação da superfície de biomateriais utilizando albumina é baseada na imobilização de polímeros solúveis em água, os quais criam uma superfície hidrofílica difusa na superfície do material, exercendo uma repulsão estérica às proteínas e células que se aproximem da superfície. A Figura 3.4 apresenta um esquema da repulsão estérica promovida por polímeros solúveis em água.



**Figura 3.4.** Repulsão estérica de proteínas do plasma em superfície modificadas com polímeros solúveis em água. Fonte: Adaptado de AMIJI e PARK (1993).

Segundo Amiji e Park (1993), para viabilizar esta repulsão, três requisitos devem ser atendidos pelo polímero utilizado para modificar a superfície:

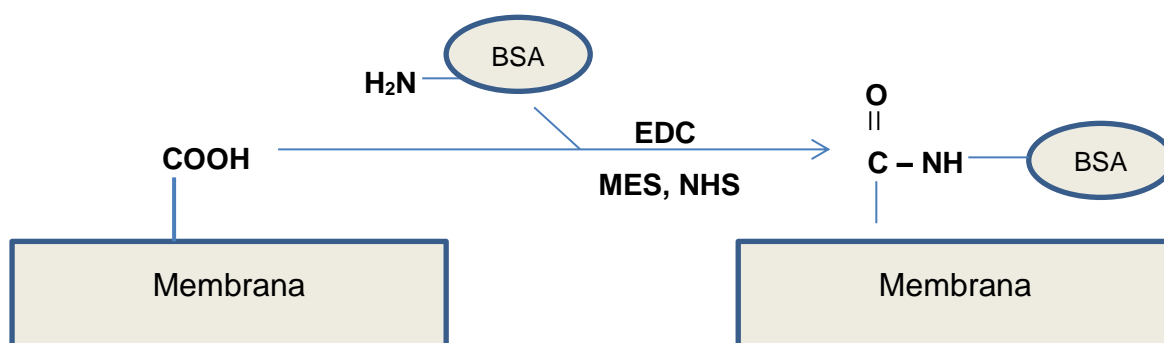
- 1) As moléculas do polímero devem ter alta afinidade com a superfície, de modo que possa se fixar fortemente a ela;
- 2) Parte da cadeia do polímero deve se estender para o meio da solução, pois a repulsão estérica deve ser dominante sobre as forças atrativas de van der Waals;
- 3) As moléculas do polímero devem cobrir completamente a superfície, pois se uma significativa parte desta fica exposta, a repulsão estérica não é efetiva.

A albumina fisicamente adsorvida na superfície de biomateriais melhora a biocompatibilidade de dispositivos em contato com o sangue por um curto período de tempo, devido à sua dessorção da superfície por outras proteínas do plasma que possuam maior afinidade. Assim, estudos devem ser realizados no sentido de melhorar a estabilidade da albumina imobilizada.



Jingrun *et al.* (2008) modificaram a superfície de poli(tereftalato de etileno) (PET) com albumina bovina sérica, através da reação dessa substância com grupos carboxila (-COOH), introduzidos na superfície do PET em modificação prévia. Os autores utilizaram a albumina, baseando-se na ideia dela ser considerada uma proteína tromborresistente e sua ligação covalente na superfície do material tem uma influência profunda no comportamento da coagulação sanguínea, podendo reduzir a adesão e agregação plaquetária, suprimindo assim a formação do trombo. Os autores observaram que a introdução da albumina na superfície do PET resultou em diminuição acentuada da extensão da adesão e ativação das plaquetas em comparação com a superfície de PET não tratada. Além disso, as superfícies modificadas apresentaram maior ligação e proliferação de células endoteliais, indicando que a endotelização pode ser favorecida.

Liu *et al.* (2009) modificaram a superfície de membranas sintetizadas a partir de uma mistura de poli(éter sulfona) (PES), um copolímero de ácido acrílico (AA) e n-vinilpirrolidona (VP) P(AA-VP) através da imobilização de albumina bovina (BSA). As membranas foram sintetizadas pela técnica da inversão de fases, seguindo-se a imobilização covalente da albumina, através da ligação dos grupos amino da proteína com os grupos carboxila do copolímero, conforme esquematizado na Figura 3.5.



**Figura 3.5.** Esquema da imobilização da albumina na superfície da membrana. Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2009).

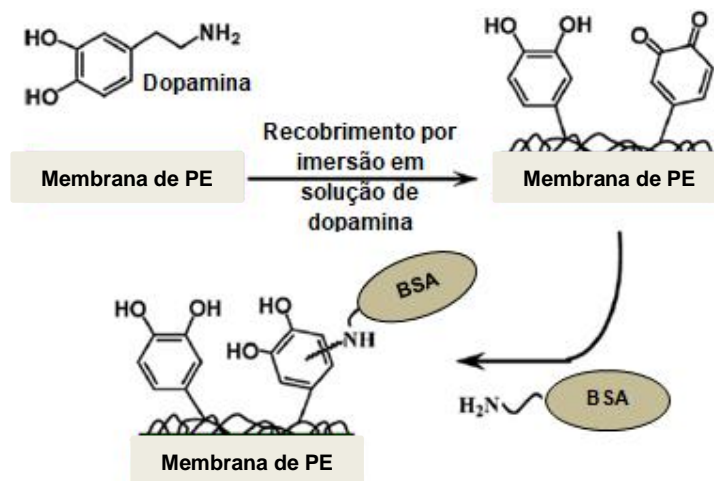
Os autores observaram que houve um aumento da quantidade de albumina imobilizada na superfície das membranas conforme a quantidade do copolímero P(AA-VP) também foi aumentada e que a hidrofiliçidade das membranas modificadas aumentou da mesma forma. Em relação à biocompatibilidade, os autores concluíram que a imobilização da albumina na superfície da membrana de PES tem um importante papel na melhoria da compatibilidade sanguínea, pois foi verificada a supressão da

adsorção de proteínas e a redução da adesão de plaquetas. Além disso, os autores verificaram que a imobilização de albumina promoveu a adesão da célula endotelial e proliferação, mostrando também boa citocompatibilidade, o que pode viabilizar seu uso em equipamento em contato com sangue e órgãos artificiais.

Fang *et al.* (2009) também utilizaram a modificação da superfície de membranas através da imobilização de albumina, similarmente ao trabalho anterior, substituindo, no copolímero, a n-vinilpirrolidona por acrilonitrila (AN). Os autores observaram que, apesar da melhoria significativa da biocompatibilidade do trabalho de Liu e colaboradores, o copolímero P(AA-VP) é solúvel em água e sua liberação da membrana é inevitável. Assim, a troca do VN pela AN tem como objetivo evitar a perda do copolímero e, conseqüentemente, das propriedades de biocompatibilidade da membrana. Em comparação ao trabalho de Liu e colaboradores, os autores observaram uma maior quantidade de albumina imobilizada ( $30,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  contra  $8,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e houve supressão tanto da adsorção de proteínas quanto da adesão de plaquetas, o que mostra potencial de biocompatibilidade. Não foi realizado estudo para avaliar a estabilidade da imobilização.

Continuando nesta linha, Fang *et al.* (2010) sintetizaram um terpolímero P(AN-VP-AA), prepararam uma mistura com PES e, em seguida, imobilizaram albumina em sua superfície. Comparando com os dois trabalhos anteriores, a blenda de PES com o terpolímero aumentou a quantidade de albumina imobilizada para  $49 \pm 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , com melhoria das propriedades antitrombogênicas, como o tempo de coagulação e a citocompatibilidade.

Zhu *et al.* (2011) também avaliaram a imobilização de albumina bovina sérica na superfície de membranas de polietileno (PE), após prévio recobrimento da superfície com polidopamina, conforme esquematizado na Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Esquema do recobrimento de polidopamina em membrana de PE, seguido da imobilização de albumina. Fonte: Adaptado de Zhu et al. (2011).

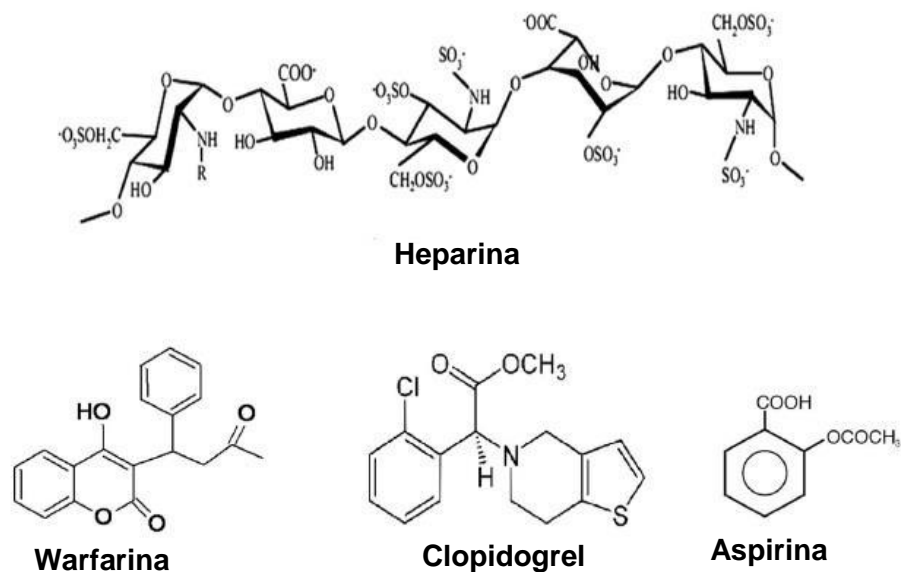
Os autores observaram redução do ângulo de contato e, conseqüentemente, aumento da hidrofiliçidade da membrana PE modificada, em relação à membrana sem albumina. A superfície da polidopamina exibiu uma excelente aplicabilidade para adesão, crescimento e proliferação celular. A imobilização adicional da albumina foi vantajosa para a promoção da compatibilidade com o sangue, mas apresentou desvantagem para a melhoria da citocompatibilidade e viabilidade celular.

Algumas patentes também citam a modificação da superfície de biomateriais com imobilização de albumina, como a de Zimmermann *et al.* (2000), relacionada a um material (membranas planas ou fibras ocas) para filtrar soluções contendo proteínas (como o sangue) com albumina ligada covalentemente em sua superfície, bem como o método de produção. Não foi encontrada patente recente com essa modificação visando ao aumento da biocompatibilidade e utilização do biomaterial em equipamentos em contato com o sangue.

Assim, a imobilização de albumina na superfície de materiais pode melhorar as propriedades de biocompatibilidade sem afetar, aparentemente, as propriedades mecânicas, obtendo-se superfícies que reduzem a adsorção de proteínas, a adesão de plaquetas e elevam o tempo de coagulação do sangue quanto em contato com as mesmas.

### 3.1.4. Imobilização de Anticoagulantes

A imobilização de anticoagulantes na superfície de biomateriais é outra técnica bastante utilizada para melhorar as propriedades antitrombogênicas destes. Na Figura 3.7 são apresentadas as estruturas químicas de importantes anticoagulantes que podem ser utilizados para modificação superficial.



**Figura 3.7.** Estrutura de anticoagulantes. Fonte: Adaptado de IRFAN e IDRIS (2015).

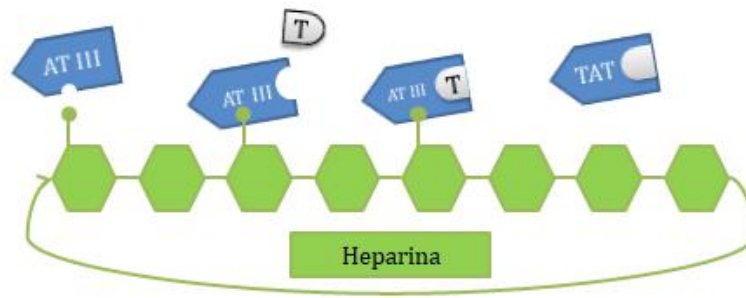
A heparina é um polissacarídeo de estrutura muito heterogênea, pertencente ao grupo dos glicosaminoglicanos, anteriormente chamados mucopolissacarídeos. É fortemente sulfatado e, conseqüentemente, altamente carregado negativamente, com peso molecular variando de 5 a 25x10<sup>3</sup> Da. Devido à sua densidade de carga, a heparina liga-se a proteínas, geralmente por interações eletrostáticas, e interfere em vários mecanismos fisiológicos com vários graus de especificidade. Sua interação altamente específica com a antitrombina, inibidor de coagulação fisiológica, representa essencialmente toda a atividade anticoagulante da heparina (OLSSON *et al.*, 2000). Essa ligação ocorre devido à presença de uma seqüência específica de cinco açúcares (chamada seqüência pentassacarídea), encontrada em aproximadamente um terço das moléculas na preparação da heparina comercial (BIRAN e POND, 2016).

A heparina é o anticoagulante de uso mais comum para evitar a formação de trombo durante o tratamento por hemodiálise. Sua utilização intravenosa, entretanto,

tem sido associada a diversos efeitos colaterais, como hemorragias, dificuldade de respirar, inchaço dos lábios, língua ou face, dores leves, calor e perda de cabelo, incentivando-se pesquisas voltadas ao aproveitamento de suas propriedades anticoagulantes sem a necessidade de sua injeção diretamente na corrente sanguínea do paciente. Estudos mostram que se imobilizada em uma superfície, a heparina pode levar a diversas melhorias nas propriedades dessa superfície, como a compatibilidade sanguínea e a biocompatibilidade. Além disso, reduz a adesão de plaquetas, a perda de células sanguíneas e aumenta o tempo de recalcificação do plasma e o tempo de tromboplastina parcial ativada, indicadores do tempo de coagulação do sangue (MURUGESAN *et al.*, 2008).

Como pode ser observado na Figura 3.7, a estrutura da heparina contém diversos grupos funcionais, como grupos hidroxila, carboxila, amino, entre outros, que podem ser utilizados para a ligação com os grupos funcionais da superfície a ser modificada. Em geral, materiais poliméricos podem ser facilmente heparinizados se eles apresentam em sua estrutura grupos funcionais aminas e ácidos carboxílicos (IRFAN e IDRIS, 2015).

O poder anticoagulante da heparina imobilizada é atribuído à sua ação catalisadora, que promove a inibição da trombina, a enzima de coagulação (e proteases similares, como os fatores Xa, IXa, XIa e XIIa) pela antitrombina III (AT III). Conforme esquematizado na Figura 3.8, inicialmente a heparina imobilizada adsorve a AT III, cofator para inibição da coagulação, promovendo uma mudança conformacional desta, que permite uma ligação mais eficiente e estável com a trombina (T). Dessa forma, a trombina no plasma humano é inativada, devido à formação do complexo trombina/antitrombina (TAT). Este complexo é liberado na corrente sanguínea, permitindo que uma nova molécula de AT III seja adsorvida na heparina, justificando a atividade anticoagulante das membranas funcionalizadas. É importante destacar que nesse processo, a heparina não é consumida e é capaz de catalisar continuamente a inibição de fatores de coagulação ativados.



**Figura 3.8.** Esquema da ação anticoagulante da heparina imobilizada. Fonte: Adaptado de Gambro Lundia AB (2010).

A heparina sistêmica tem uma série de efeitos sobre o complemento, incluindo interferência com a regulação da via alternativa (EDENS *et al.*, 1993). O efeito líquido sobre o complemento é, em parte, dependente da concentração, uma vez que alguns estudos demonstraram que vestígios de heparina levam à ativação, enquanto concentrações mais altas são inibitórias (KEIL *et al.*, 1995).

Uma característica adicional da heparina imobilizada é a resistência à adesão e ativação das plaquetas. A redução da adesão plaquetária é atribuída à redução da deposição de fibrinogênio, e a extensão da redução está correlacionada com a extensão da captação de antitrombina. A ativação reduzida pode ser atribuída à redução geral considerável da aderência plaquetária, bem como à inibição de fatores estimuladores de plaquetas, tais como trombina. No entanto, é interessante que, em seu estado livremente solúvel, a heparina possui propriedades estimulantes das plaquetas moderadas (BIRAN e POND, 2016).

O primeiro relato de uma superfície heparinizada foi publicado em 1963 por Gott *et al.* (1963), que demonstraram que os tempos de coagulação *in vitro* e *in vivo* eram significativamente prolongados em superfícies revestidas com grafite ionicamente ligadas à heparina. Desde então, as tecnologias de revestimento de heparina foram desenvolvidas para uma série de dispositivos de contato com sangue.

Dentre os diversos trabalhos na literatura que utilizaram a modificação de superfícies através da imobilização de heparina, Huang *et al.* (2011) modificaram a superfície de membranas de polissulfona (PSf) através da imobilização de heparina, utilizando o método de Higuchi. Por este método, as membranas de PSf previamente sintetizadas foram ativadas através da introdução de grupos amino, os quais seriam utilizados para a ligação covalente da heparina. Os autores estudaram as propriedades de biocompatibilidade e permeabilidade das membranas modificadas, visando à sua

aplicação em hemodiálise. Os autores conseguiram imobilizar até 3,38  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de heparina, observando um aumento da hidrofiliabilidade das membranas após a modificação da superfície. A compatibilidade sanguínea foi confirmada a partir da constatação da redução da adesão de plaquetas, do aumento dos tempos de trombina e tromboplastina parcial, que estão relacionados aos tempos de coagulação sanguínea. Testes de permeação de soluções de albumina também mostraram que as membranas possuem propriedades de anti-incrustação, concluindo-se ter potencial para uso em hemodiálise.

Gao *et al.* (2014) imobilizaram heparina na superfície de membranas de poli(ácido láctico) (PLA), obtendo resultados similares de outros estudos relacionados, como a redução da adesão de plaquetas, aumento do tempo de recalcificação do plasma e a não ocorrência de hemólise quando do contato do sangue com a membrana.

Santos *et al.* (2017) imobilizaram heparina na superfície de membranas de poli(éter imida) e poli(vinil pirrolidona) visando à sua aplicação em hemodiálise. Os autores observaram que a introdução de heparina resultou em membranas mais hidrofílicas, com reduzida adsorção de proteínas e adesão de plaquetas, bem como elevado tempo de coagulação, avaliado por meio do tempo de tromboplastina parcial ativada. Os resultados obtidos pelos autores indicam potencial caráter antitrombogênico das membranas sintetizadas, altamente desejável em membranas para utilização em hemodialisadores.

Comercialmente, também pode ser encontrado o dialisador Evodial<sup>®</sup>, desenvolvido pela Gambro, o qual possui uma membrana composta de um copolímero aniônico de acrilonitrila e metalil sulfonato de sódio, com imobilização superficial de heparina, através da prévia funcionalização com poli(etileno imina). Segundo dados do fabricante, a membrana deste dialisador possui alta permeabilidade e biocompatibilidade, com manutenção da atividade da heparina ao longo da sessão de diálise.

Patentes relacionadas à imobilização de heparina em superfícies também foram encontradas, citando-se VERHOEVEN *et al.* (1997), que criaram um método para fabricar biomateriais heparinizados através da reação dos grupos aldeído da heparina com grupos amino imobilizados, formando uma base de Schiff (grupo funcional que contém uma ligação dupla carbono-nitrogênio, com o nitrogênio conectado a um grupo arila ou alquila, mas não há hidrogênio); CAHALAN *et al.* (1998), que criou superfícies heparinizadas com AT III adsorvida para prevenção da formação de trombo quando do contato do material com o sangue; e MOACHON e THOMAS (2012), que prevê a

fabricação de um equipamento de filtração do sangue contendo uma membrana semipermeável previamente heparinizada, de propriedade da Gambro AB.

Na Tabela 3.1, são apresentados outros trabalhos focados na funcionalização de superfícies com heparina, objetivando a obtenção de materiais com elevada biocompatibilidade.



**Tabela 3.1.** Trabalhos relacionados à modificação de superfícies com imobilização de heparina.

<b>Autor</b>	<b>Membrana base</b>	<b>Método de imobilização</b>	<b>Observações</b>
<b>Marconi et al. (1997)</b>	Copolímeros de poli(etileno-co-álcool vinílico) (EVAL) comerciais	Ativação da superfície com cloreto de adipoíla ou com diisocianato de hexametileno	Análise do tempo de tromboplastina parcial ativada. Imobilização de até 50 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Sailnoja et al. (1999)</b>	Copolímero de Poli(ácido láctico-co-caprolactona-γ-poliacrilamida)	Imobilização direta	Análises de citotoxicidade. Imobilização de até 98 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Kang et al. (2001)</b>	Poli(uretano-g-óxido de etileno)	Ligação covalente utilizando carboimida solúvel em água	Análise de tempo de recalcificação do plasma, tempo de tromboplastina parcial ativada, adesão e ativação de plaquetas. Imobilização de até 1,3 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Michanetziz et al. (2003)</b>	Biomateriais comerciais (silicone, poli(cloreto de vinila), polietileno e polipropileno)	Criação de grupos amino livres ou ligação direta da heparina usando glutaraldeído como agente de ligação	Análises de adesão de plaquetas, tempo de tromboplastina parcial não ativada, ativação do sistema de coagulação. Imobilização de até 9,76 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Chen et al. (2005)</b>	Superfícies de silicone	Uso de espaçador bifuncional de poli(glicol etileno)	Análises de hidrofiliçidade, adsorção de proteínas e propriedades de trombo resistência. Imobilização de 0,68 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Huang et al. (2010)</b>	Polissulfona	Método de Higuchi	Análises de hidrofiliçidade e adsorção de proteínas. Imobilização de 0,86 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Jiang et al. (2010)</b>	Polietileno	Ligação covalente com uma camada de polidopamina reativa	Análises de hidrofiliçidade, adesão de plaquetas, tempo de coagulação. Imobilização de 14,2 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Li et al. (2011)</b>	Polissulfona	Descarga luminescente em atmosfera de amônia, ativando a superfície	Análises de hidrofiliçidade, adesão de plaquetas. Imobilização de 0,45 µg/cm <sup>2</sup>
<b>Kara et al. (2016)</b>	Poliuretano	Reação com quitosana previamente imobilizada	Análises de hidrofiliçidade, citotoxicidade, atividade antibacteriana
<b>Wang et al. (2017)</b>	Polissulfona	Plasma induzido	Análises de hidrofiliçidade, adesão de plaquetas, tempo de coagulação, adsorção de proteína. Imobilização de 2,69 µg/cm <sup>2</sup>

Segundo Tang *et al.* (2012), apesar dos diversos estudos dos métodos de imobilização da heparina nas membranas, há diversas restrições para a aplicação, como a elevada perda da bioatividade e a possibilidade da ocorrência de degradação a longo prazo *in vivo* devido à ligação covalente e aos diferentes agentes químicos e biológicos durante o uso de materiais heparinizados.

Outros métodos de modificação de superfície estudados na literatura são: enxertia química, adsorção física, deposição de plasma, radiação, deposição de Langmuir-Blodgett, entre outros.

# CAPÍTULO 4 - SÍNTESE DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS

Na síntese de membranas poliméricas, os materiais e métodos empregados desempenham um papel determinante em suas propriedades finais, como permeabilidade, seletividade, resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência química e resistência à formação de incrustações. Existem diversos métodos de síntese de membranas, entre os quais podem ser citados a sinterização, o estiramento, a gravação (*track-etching*), a extrusão de polímero fundido, o cobrimento e a inversão de fase. O método de inversão de fase será a seguir descrito detalhadamente, por ser o mais utilizado na síntese de membranas poliméricas, devido à sua flexibilidade operacional e possibilidade de confeccionar membranas com variadas morfologias. Será dada ênfase à aplicação desse método na síntese de membranas do tipo fibra oca.

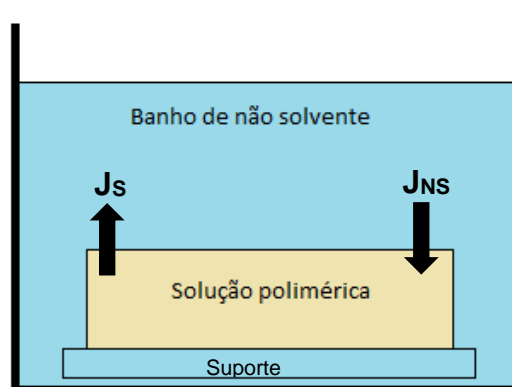
## 4.1. O MÉTODO DA INVERSÃO DE FASE

A inversão de fase é um processo através do qual uma solução polimérica passa, de maneira controlada, do estado líquido para o sólido. O processo de solidificação é geralmente iniciado pela transição do estado líquido para duas fases (separação líquido-líquido), quando se induz uma supersaturação na solução. A solução se torna termodinamicamente instável e tende a se separar em duas fases líquidas, sendo uma rica e outra pobre em polímero. A fase rica dá origem à estrutura da membrana, enquanto a fase pobre origina os poros da mesma. À medida que a separação de fases ocorre, a fase rica torna-se mais concentrada em polímero, aumentando sua viscosidade e dificultando, portanto, a transferência de massa no sistema. Dessa forma, o equilíbrio termodinâmico entre as fases pode não ser alcançado, resultando na fixação da estrutura com conseqüente formação da membrana. Interações físico-químicas entre as cadeias poliméricas também podem acontecer, levando à gelificação ou cristalização, e a competição de todos esses fenômenos durante a separação de fases permite a obtenção de variados tipos de membrana (HABERT *et al.*, 2006).

O método de inversão de fases compreende uma série de técnicas para se induzir a instabilidade da solução polimérica visando a sua precipitação, como a evaporação de solvente, a precipitação térmica, a precipitação pela presença de

vapores de não solvente e a imersão-precipitação, sendo esta última a técnica mais utilizada para preparar membranas por inversão de fases.

Na técnica de imersão-precipitação, introduzida por Loeb e Sourirajan em 1962, um filme polimérico líquido é imerso em um banho contendo um não solvente. A precipitação ocorre devido à difusão de solvente para o banho e de não solvente para a solução, cuja força motriz é a diferença de potencial químico dos componentes entre o banho e a solução. Em alguns casos, antes da imersão no banho de precipitação, pode-se deixar o filme polimérico exposto à atmosfera para evaporação inicial do solvente volátil. A Figura 4.1 apresenta um esquema da transferência de massa que ocorre na técnica de imersão-precipitação.



**Figura 4.1.** Transferência de massa entre solvente e não solvente na técnica de precipitação por imersão ( $J_S$ : fluxo de solvente;  $J_{NS}$ : fluxo de não solvente).

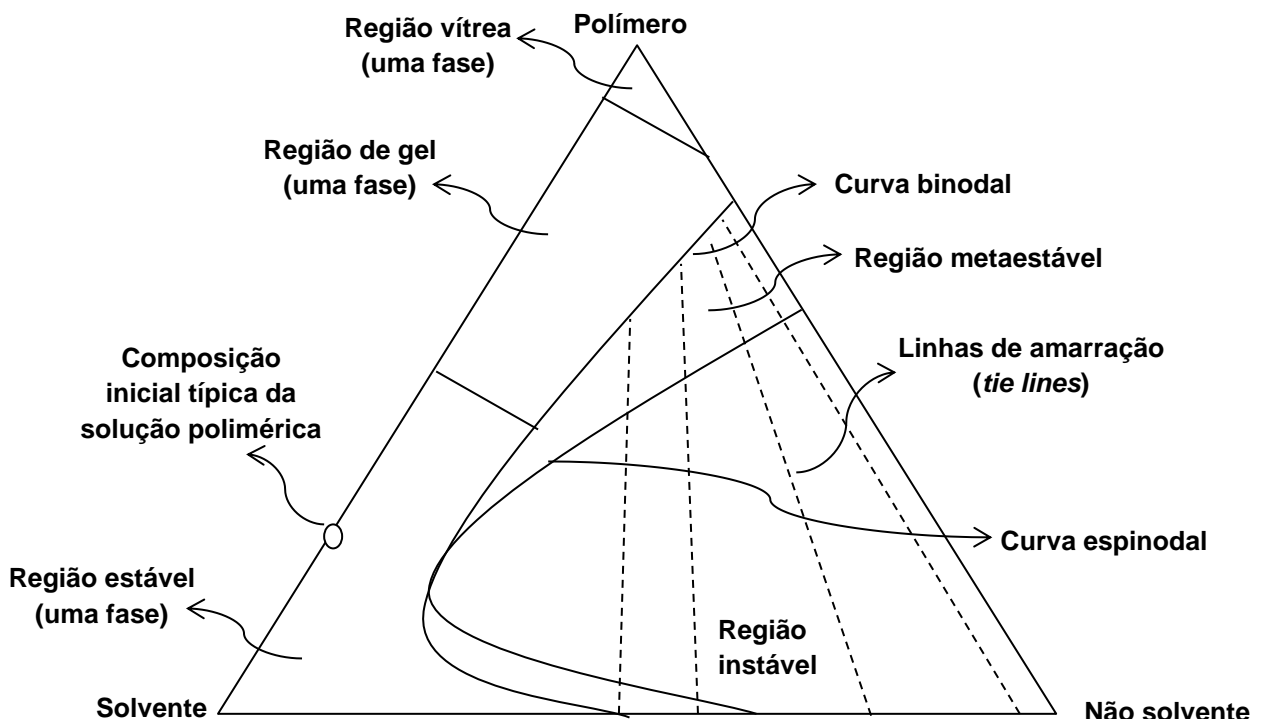
Para a síntese de membranas planas utilizando esta técnica, em escala laboratorial, é realizado o espalhamento de uma solução polimérica em uma superfície plana (placa de vidro), com o auxílio de uma faca de espalhamento. A placa é, então, imersa em um banho de precipitação contendo o não solvente, quando iniciarão os fluxos de massa de não solvente para o interior da solução polimérica e do solvente da solução polimérica para o banho de não solvente.

A síntese de fibras ocas é mais complexa que a síntese de membranas planas devido ao grande número de variáveis envolvidas. Uma breve descrição da técnica será dada no item 4.1.2.

#### 4.1.1. Mecanismo de formação de membranas

O mecanismo de formação de membranas envolve fenômenos termodinâmicos e cinéticos complexos. Um modelo razoavelmente bem consolidado e que pode ser utilizado para explicar qualitativamente a morfologia de membranas obtidas a partir de condições iniciais de síntese é o do equilíbrio de fase dos três principais componentes envolvidos na inversão de fases.

Os sistemas poliméricos podem ser caracterizados através de diagramas de equilíbrio ternário, no qual cada vértice do diagrama representa um componente puro (polímero, solvente e não-solvente). Cada ponto dentro do diagrama representa uma composição específica de mistura dos componentes. O diagrama contém duas regiões principais: a região monofásica, na qual os componentes são miscíveis; e a região bifásica, na qual o sistema é separado em uma fase sólida (rica em polímero) e uma fase líquida (pobre em polímero). Durante a precipitação, a solução polimérica perde solvente e ganha não solvente. Portanto, a solução polimérica move-se da composição da região monofásica para a região bifásica. Na Figura 4.2, é apresentado um diagrama ternário típico usado para preparar membranas de Loeb-Sourirajan.



**Figura 4.2.** Esquema do diagrama ternário típico utilizado para descrever a formação de membranas por imersão-precipitação. Fonte: Adaptado de Baker (2004).

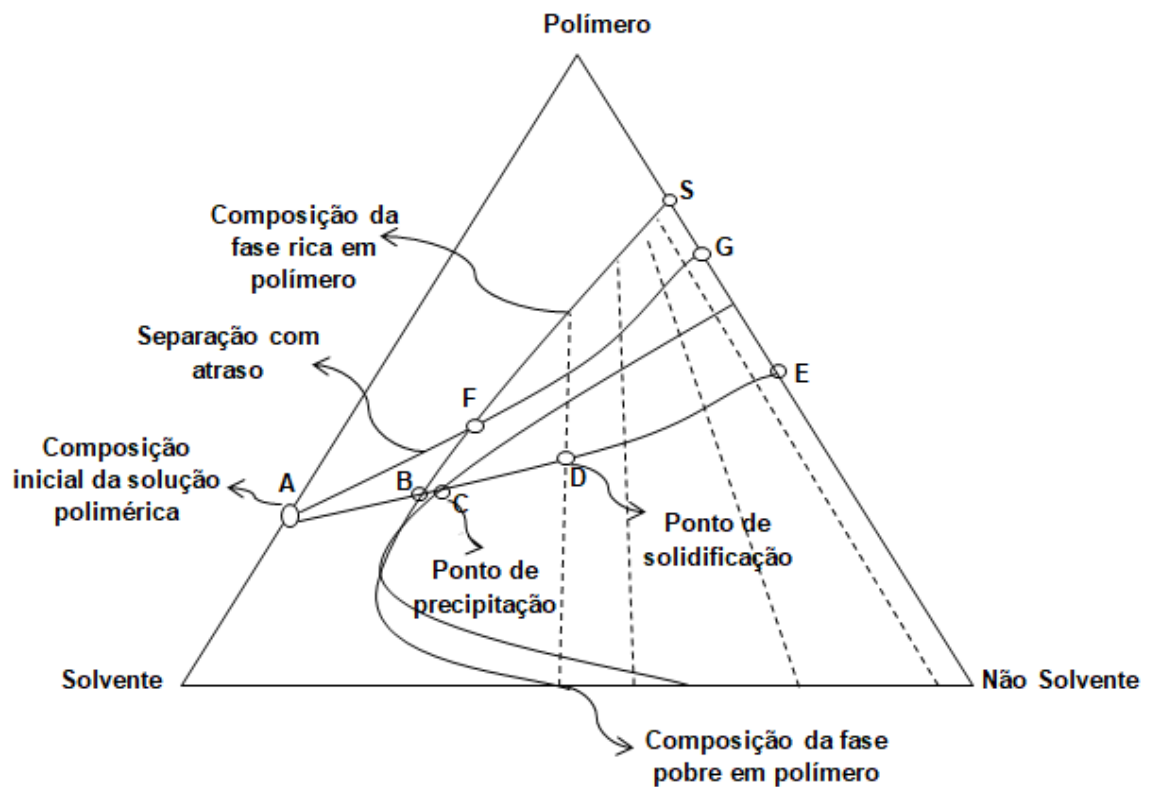
No esquema apresentado na Figura 4.2, observa-se que a região monofásica está dividida em três regiões: uma região de solução polimérica líquida, uma região polimérica gel e uma região polimérica vítrea. Em regiões de baixa concentração de polímero (como no caso das soluções poliméricas utilizadas para a síntese de membranas), as composições são de líquidos viscosos. Quando a concentração de polímero aumenta, a viscosidade das composições da região monofásica aumenta rapidamente, atingindo valores tão elevados que o sistema pode ser admitido como um gel. Essa transição entre regiões de líquido e gel ocorre, de modo geral, para concentrações de polímero de 30% a 40%. Para concentrações acima de 90% de polímero, o gel pode se tornar um sólido vítreo, pois as cadeias do polímero não conseguem mais rotacionar (BAKER, 2004).

A curva binodal da Figura 4.2 indica a região de miscibilidade, enquanto a espinodal representa a região de instabilidade. Na região de miscibilidade, existe uma faixa de composições metaestáveis onde a energia livre do sistema pode ser minimizada através da separação em duas fases (DOMINGUES, 2017). As linhas de amarração ligam os pontos que representam as composições de equilíbrio do sistema.

#### *3.1.1.1. Trajetórias de Precipitação*

Durante o processo de imersão-precipitação, diversas trajetórias de mudança de composição podem ser traçadas no diagrama ternário, com o objetivo de interpretar a influência das condições de síntese das membranas na obtenção de variadas morfologias. Como a solução polimérica empobrece de solvente e enriquece de não solvente durante o processo, no diagrama ternário, as trajetórias tendem a atingir o eixo polímero/não solvente.

No Figura 4.3, a composição inicial da solução polimérica é indicada por A, e duas evoluções de caminhos termodinâmicos são mostradas, cada uma função da cinética de troca solvente-não solvente.

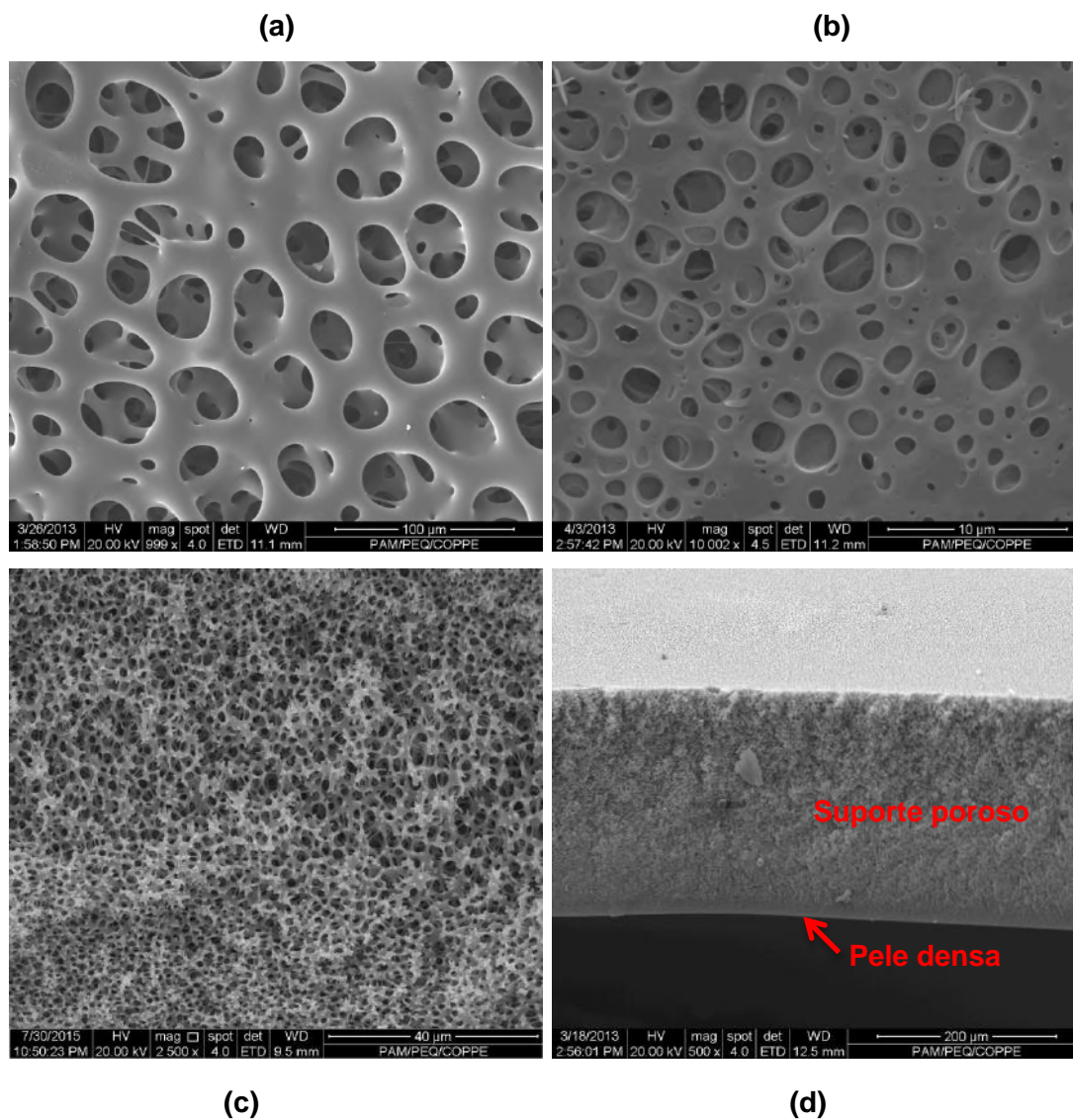


**Figura 4.3.** Diagrama de fases ternário utilizado para descrever o processo de formação de membranas pela técnica de inversão de fases. Fonte: Adaptado de BAKER (2004).

No caso da sequência A B C D E, a solução empobrece-se em solvente e enriquece-se em não solvente até atravessar o limite da curva binodal (B), entrando na região metaestável. Nesta região, o mecanismo de separação de fases por nucleação e crescimento é favorecido. O sistema passa para a região termodinamicamente instável ao atravessar o limite da curva espinodal (C), quando a solução separa-se espontaneamente em duas fases interconectadas: uma rica em polímero e outra pobre em polímero, sem haver formação de núcleos. As composições dessas fases são dadas pelas linhas de amarração, conforme ilustrado no esquema. A saída de solvente durante o processo aumenta a viscosidade da fase rica em polímero até que a mesma precipita e é considerada um sólido (D). Ao final da precipitação (E), ambas as fases estão em equilíbrio termodinâmico: a fase sólida, que forma a matriz da membrana (S) e a fase líquida, composta essencialmente do não solvente, que forma os poros da membrana (L). A porosidade total da membrana é indicada pelo ponto (E).

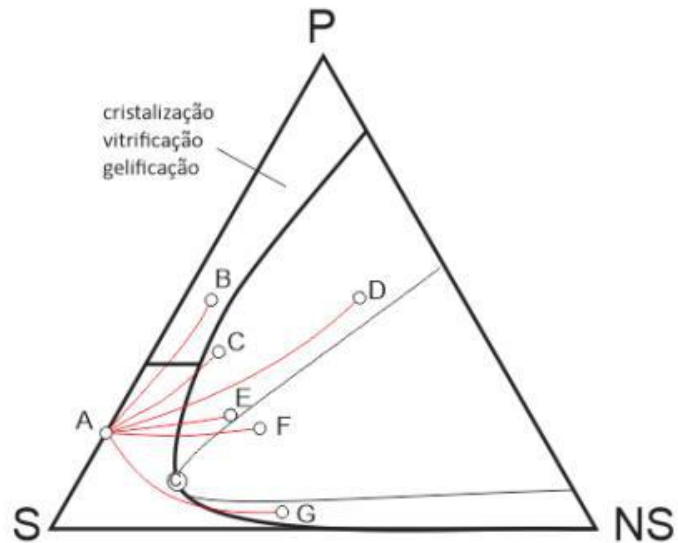
Na sequência A F G, o sistema permanece na região estável por um determinado tempo, ocorrendo a chamada separação com atraso. A saída de solvente é mais lenta e ocorre na fase líquida (mais viscosa), aumentando a concentração de polímero na sua superfície. Ao atingir as composições que caracterizam o limite da curva binodal (F), ocorre a precipitação, gerando, nestas condições, uma membrana de morfologia tipicamente densa assimétrica (BAKER, 2004). O tempo decorrido até que a fase rica em polímero se solidifique definirá a dimensão dos poros. Podem ser obtidas estruturas esponjosas de poros abertos, estruturas esponjosas de poros fechados ou, quando os poros são altamente interpenetrados por outros poros, há formação de uma estrutura de rede (DOMINGUES, 2017). Na precipitação com atraso, também é comum ocorrer a formação de uma pele densa, devido à precipitação instantânea de regiões próximas à superfície concentrada. A pele densa formada cria uma resistência à transferência de massa e, portanto, as subcamadas formadas são porosas (membranas anisotrópicas). Na Figura 4.4 são apresentadas imagens de microscopias eletrônicas que mostram as morfologias características a serem obtidas através dessa trajetória (poros abertos, poros fechados e rede), bem como a estrutura formada por uma pele densa superior suportada por uma camada porosa.





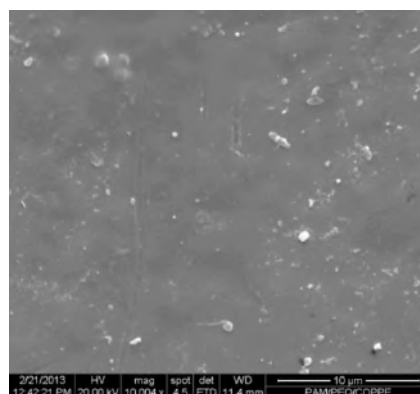
**Figura 4.4.** Micrografia eletrônica de membrana plana de poli(éter imida) e poli(vinil pirrolidona) (a) de poros abertos (b) de poros fechados (c) em rede (d) pele densa suportada por camada porosa. Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Outras trajetórias que podem ser traçadas e as morfologias tipicamente obtidas são apresentadas na Figura 4.5 e descritas a seguir.



**Figura 4.5.** Diagrama ternário e trajetórias típicas na formação de membranas por imersão-precipitação. Fonte: Adaptado de Domingues (2017).

1) Trajetória A B: característico da formação de membranas densas isotrópicas, devido à ocorrência de precipitação lenta. A obtenção desse tipo de trajetória ocorre quando há evaporação de solvente ou baixo fluxo de transferência de massa entre solvente e não solvente. A consolidação da membrana se dá por efeitos viscosos, sem cruzar a curva binodal. Na Figura 4.6 é apresentada a micrografia eletrônica de uma membrana densa isotrópica.

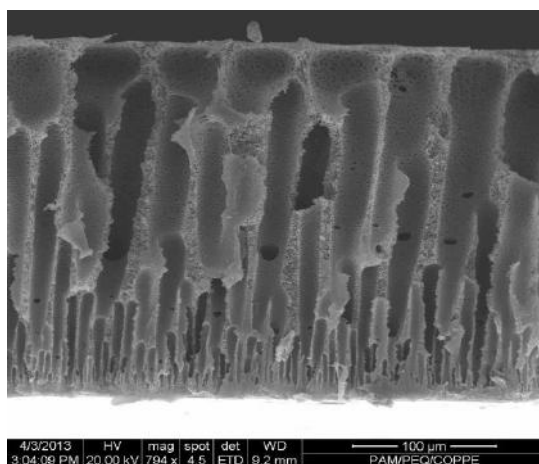


**Figura 4.6.** Micrografia eletrônica de membrana densa isotrópica de poli(éter imida). Fonte: Acervo pessoal do autor.

2) Trajetória A E: característico de sistemas que apresentam precipitação instantânea, com tempo de atraso nulo. A trajetória de precipitação adentra a região binodal logo

após a imersão e mais profundamente do que processos de precipitação com atraso, porém ainda sem cruzar a curva espinodal. São observadas estruturas nodulares, resultado da nucleação da fase rica em polímero.

3) Trajetória A D: nessa trajetória, é característica a formação de macrovazios (poros grandes e alongados). É também resultado da precipitação instantânea. Segundo van de Witte *et al.* (1996), os macrovazios estão associados a precipitações instantâneas e a sistemas que apresentam alta afinidade entre solvente e não solvente. Técnicas que induzem ao atraso da precipitação tendem a suprimir a formação de macrovazios. Os macrovazios podem possuir a forma de gota, quando em pequena quantidade, ou forma alongada cilíndrica digitiforme, quando há presença de uma grande quantidade dos mesmos. Na Figura 4.7 é apresentada micrografia eletrônica de membrana que apresenta a morfologias característica desse tipo de trajetória, do tipo digitiforme.



**Figura 4.7.** Micrografia eletrônica de membrana plana com macrovazios em forma alongada. Fonte: Acervo pessoal do autor.

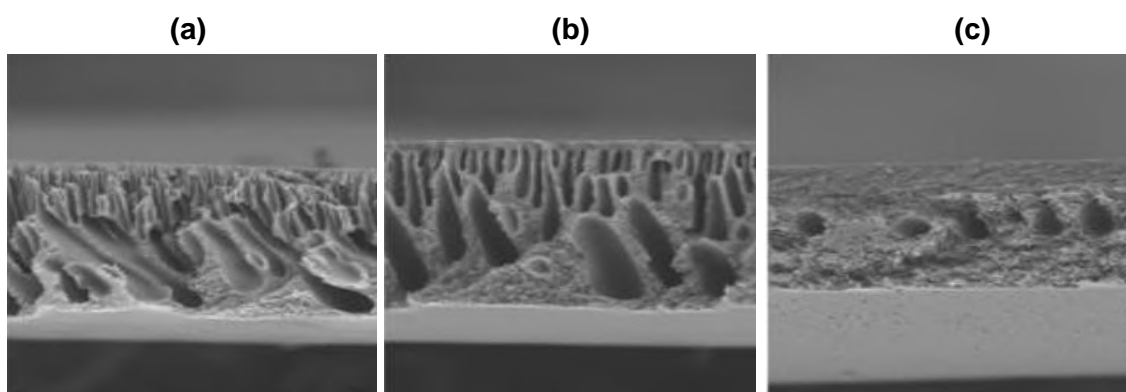
4) Trajetória A G: ocorre quando o cruzamento do limite espinodal se dá abaixo do ponto crítico. Típico de imersões com soluções diluídas, essa trajetória resulta em morfologia com estruturas desconectadas e sem resistência mecânica (formação de látex).

A morfologia obtida durante a síntese de membranas e caracterizada pelo diagrama ternário descrito anteriormente é influenciada por diversos parâmetros e variáveis envolvidos no sistema. Destacam-se: escolha do sistema solvente/não solvente, concentração do polímero, composição do banho de precipitação, composição

da solução polimérica e tempo de exposição da solução polimérica antes da imersão no banho de precipitação.

Ahmad *et al.* (2017) estudaram a síntese de membranas de PEI pelo método de inversão de fases, avaliando o efeito da concentração do polímero na solução polimérica na morfologia da membrana sintetizada. Os autores utilizaram n-metil-2-pirrolidona como solvente e variaram a concentração de polímero entre 20%, 25% e 30%. Os autores observaram que o aumento da concentração de polímero resultou em uma camada seletiva densa maior. Além disso, os macrovazios foram suprimidos e houve diminuição da porosidade da camada inferior, conforme pode ser observado na Figura 4.8.

O efeito do aumento da concentração de polímero na solução polimérica também foi observado pelos autores nos resultados de permeação de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. A formação de uma maior camada densa na superfície superior das membranas resultou em redução da permeabilidade dos gases e aumento da seletividade.



**Figura 4.8.** Efeito da concentração de polímero na síntese de membranas de poli(éter imida) (a) 20% (b) 25% (c) 30%. Fonte: Adaptado de Ahmad *et al.* (2017).

Zhang *et al.* (2017) estudaram a síntese de membranas de poli(éter imida) pelo método de inversão de fases e a influência da adição de polivinipirrolidona (PVP) na solução polimérica. Os autores observaram que a adição de PVP na solução polimérica elevou o tamanho de poros e a porosidade das membranas sintetizadas sob as mesmas condições. Além disso, o aumento da quantidade de PVP na solução suprimiu a formação de macrovazios e promoveu a mudança da estrutura morfológica da membrana para esponjosa. Isso ocorreu devido à diminuição do tempo de separação líquido-líquido, ocasionada pelo aumento da viscosidade da solução polimérica.

O uso de aditivos, a distribuição das massas moleculares, a temperatura da solução polimérica e do banho de precipitação (entre outros fatores) também podem influenciar a estrutura obtida pela inversão de fase.

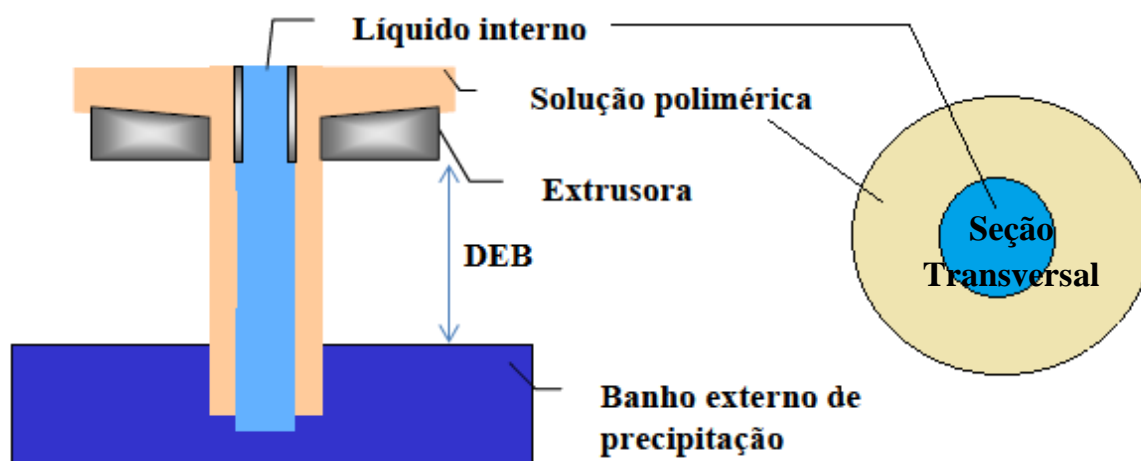
#### 4.1.2. Síntese de fibras ocas por imersão-precipitação

As membranas do tipo fibras ocas apresentam algumas vantagens em relação à geometria plana, aumentando o interesse para seu uso. Entre as vantagens a serem citadas estão a alta relação entre a área de superfície da membrana e o volume do módulo, o que representa uma melhor utilização de espaço e redução nos custos do equipamento. Além disso, as fibras ocas são autossuportadas, reduzindo o custo de produção do módulo de permeação. Como desvantagens, pode-se citar a possibilidade de entupimento do canal interno das fibras se a alimentação contém material em suspensão e for realizada por dentro das mesmas, além da espessura de parede relativamente grande para evitar colapsos em altas pressões (HABERT *et al.*, 2006; BAKER, 2004).

As membranas do tipo fibras ocas foram desenvolvidas em 1966 por Mahon e o grupo *Dow Chemical* e possuem diâmetro que varia de 50 – 3000  $\mu\text{m}$ . Em geral, fibras com diâmetro de 50 – 200  $\mu\text{m}$  são classificadas como fibras ocas finas e podem resistir a altas pressões hidrostáticas aplicadas do lado de fora das mesmas e, portanto, são utilizadas em osmose inversa ou processos de separação de gases a altas pressões (a alimentação é realizada por fora das fibras e o permeado é coletado pelo orifício interno); nas fibras com diâmetro de 200 – 500  $\mu\text{m}$ , a alimentação é geralmente realizada por dentro das fibras e suas principais aplicações são as separações de gases a baixas pressões, a hemodiálise e a ultrafiltração. Fibras com diâmetros maiores que 500  $\mu\text{m}$  são chamadas capilares.

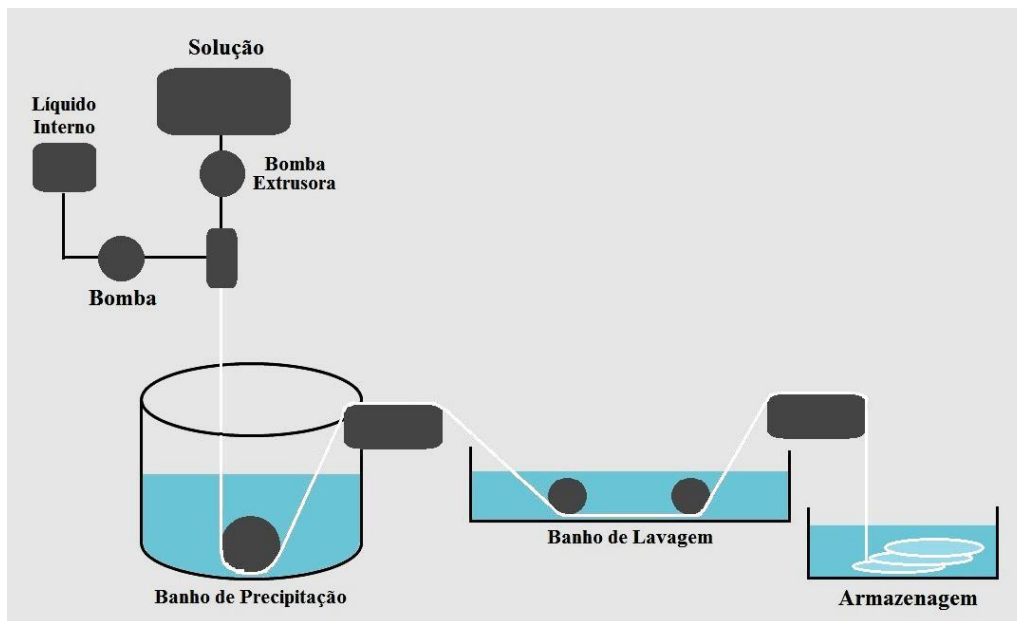
A síntese de fibras ocas pode ser realizada através das técnicas de extrusão da solução ou pela extrusão de um polímero fundido. Entretanto, a extrusão que utiliza a precipitação por imersão, é a técnica mais comum e que permite maior flexibilidade na morfologia das fibras obtidas, as quais podem ser anisotrópicas com pele densa interna ou externa. Nesta técnica, uma solução polimérica e um líquido interno (responsável por geral o canal interno da fibra) são bombeados através de uma extrusora tendo duas saídas concêntricas (canais de escoamento anulares) para um banho contendo um não solvente. A instabilidade termodinâmica é induzida pelos transportes difusivos de solvente e não solvente, semelhante ao descrito na Figura 4.1. Na Figura 4.9 apresenta-

se um esquema representativo da extrusora utilizada na produção de fibras ocas por extrusão da solução.



**Figura 4.9.** Esquema da extrusora com duas saídas concêntricas anulares na síntese de fibras ocas por extrusão da solução. A distância extrusora-banho (DEB) é controlável.

Um esquema típico para a síntese de fibras ocas por extrusão da solução polimérica é apresentado na Figura 4.10. A extrusora é posicionada acima do banho de precipitação e duas bombas promovem o escoamento da solução polimérica e do líquido interno para o banho de precipitação, no qual ocorrem as trocas de solvente e não solvente e formação da membrana. Este processo pode ser iniciado no trajeto entre a extrusora e o banho, onde ocorre a exposição da fibra nascente ao ar, possibilitando a evaporação inicial de solvente ou a absorção de vapores de não solvente, sendo esta etapa de grande influência na determinação da morfologia da membrana. A fibra formada mergulha num banho de precipitação externo e de lavagem, para consolidação de sua morfologia e retirada de solvente residual, sendo depois estocada em meio aquoso. A secagem das fibras é realizada por técnicas que evitem a contração capilar dos poros, como a troca sucessiva de não solventes com tensão superficial decrescente (por exemplo, água é substituída por etanol e hexano) ou pela imersão em banho de glicerol, o qual permanece na matriz polimérica e dificulta a contração capilar dos poros menores (HABERT *et al.*, 2006; CARVALHO, 2005).



**Figura 4.10.** Esquema do equipamento de síntese de fibras por extrusão da solução polimérica.

Os principais parâmetros envolvidos no processo de extrusão da solução são a vazão de extrusão da solução polimérica, a vazão de líquido interno, o tempo de residência externo no ar, função da distância entre a extrusora e o banho de precipitação (DEB), e as dimensões dos canais de escoamento da extrusora. Além dos parâmetros de extrusão, também são importantes os parâmetros de formação das membranas, como a composição da solução polimérica, a composição do banho de precipitação, e sua temperatura (MULDER, 1996).

O tempo de exposição do filme polimérico e as composições do líquido interno e do banho de precipitação são variáveis críticas para ajustar a posição e a espessura da fina camada (pele) densa de polímero que pode se formar, seja do lado interno, seja do lado externo ou em ambos os lados da parede da fibra oca. A solução polimérica, por sua vez, em geral tem relativamente alta concentração de polímero e, portanto, maior viscosidade que as soluções empregadas na síntese de membranas planas, pois as fibras devem, além de promover a separação requerida, suportar as pressões de operação sem colapsarem (BAKER, 2014).

A síntese de membranas na geometria de fibra oca envolve fenômenos simultâneos bastante complexos, pois além de variáveis termodinâmicas e cinéticas que determinam a precipitação da solução polimérica, existe a influência de variáveis reológicas, como tensão de cisalhamento na passagem da solução pela extrusora, a tensão axial de estiramento e a expansão viscoelástica na saída da extrusora (fenômeno

conhecido como *die-swell*). A seguir serão comentados alguns fatores que contribuem para aumentar a complexidade do sistema (CARVALHO, 2005).

- 1) A área para penetração de não-solvente é distinta daquela que se tem em filmes planos, devido à geometria cilíndrica das fibras ocas. Por isso, o fluxo difusivo de não-solvente é acelerado no sentido da superfície externa para o centro e desacelerado no sentido oposto;
- 2) A presença de duas frentes de precipitação, uma iniciada na região central do orifício da fibra no sentido da interface fibra/banho externo e outro no sentido oposto, da superfície externa da fibra para a região central, havendo a possibilidade do não-solvente de um lado afetar a precipitação do outro lado;
- 3) A presença de três interfaces: filme extrusado/ar ambiente (durante a exposição ao ar ambiente), filme extrusado/banho externo e filme extrusado/líquido interno, que influencia a morfologia da fibra obtida por meio da transferência de massa através dessas interfaces;
- 4) O volume limitado do líquido interno, que pode ocasionar alteração na sua composição para um mesmo ponto da fibra durante a precipitação do filme extrusado;
- 5) A expansão viscoelástica do filme polimérico na saída da extrusora, que pode ocorrer em função das vazões de solução polimérica e de líquido interno, da distância extrusora banho de precipitação, da viscosidade do líquido interno e da velocidade de fiação (velocidade de recolhimento das fibras). A ocorrência desse fenômeno (*die-swell*) leva a uma deformação do canal interno da fibra.

Assim, devido à complexidade que envolve a síntese de membranas na geometria de fibra oca e o grande número de parâmetros de influência, geralmente membranas planas são previamente preparadas para estudos de condições de síntese para a obtenção de informações úteis sobre a precipitação do sistema polimérico em estudo.

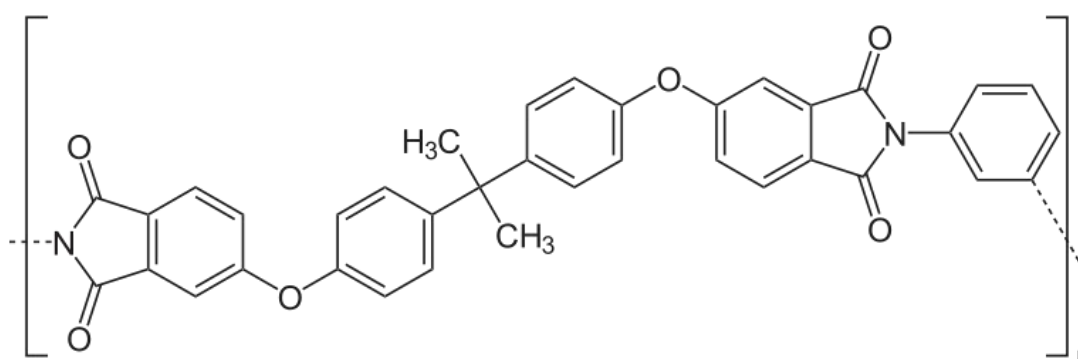
#### **4.1.3. Síntese de membranas de Poli(éter imida)**

A poli(éter imida) (PEI) é um dos derivados de uma ampla classe de materiais conhecidos como poliimidas, polímeros que contém um grupo imida entre dois anéis aromáticos, ou seja, nas poliimidas, um átomo de nitrogênio é compartilhado por duas funções carbonila.



Desenvolvida pela General Electric Company, a PEI possui flexibilidade suficiente para permitir boa processabilidade devido às propriedades da ligação do éter introduzido na cadeia molecular da poliimida. A imida aromática promove também excelentes propriedades térmicas e mecânicas. É um termoplástico amorfo, cujas principais propriedades são alta resistência mecânica, alta estabilidade à temperatura, resistência à chama, excelentes propriedades elétricas e boa estabilidade química (JOHNSON e BURLHIS, 1983). Segundo Chinpa *et al.* (2010), a poli(éter imida) é um material bastante atrativo para a formação de membranas devido à sua excelente habilidade em formar filmes e às boas propriedades mecânicas, bem como boas resistências térmica e química, sendo muito utilizada em processos de separação.

A poli(éter imida) pode ser sintetizada tanto pelo método de substituição nucleofílica quanto pela reação de condensação entre diaminas e dianidridos, sendo esta última a técnica mais convencional. Para a resina Ultem 1000, utilizada neste trabalho, a fórmula estrutural é apresentada na Figura 4.11.



**Figura 4.11.** Fórmula estrutural da resina PEI Ultem 1000®. Fonte: NEUROtiker (2008).

Segundo Sedigh e colaboradores (1999), a presença do grupo  $C(CH_3)_3$  combinada com uma estrutura rígida do polímero torna a PEI Ultem 1000 um polímero muito promissor para síntese de membranas poliméricas. A PEI possui uma massa molecular de aproximadamente 54000 g/mol e uma temperatura de transição vítrea em torno de 215°C a 220°C (BALASHOVA *et al.*, 2001).

A poli(éter imida) é um polímero de grande interesse no preparo de membranas devido à sua estabilidade química e térmica e suas excelentes propriedades de separação (KNEIFEL e PEINEMANN, 1992). Na literatura, são reportados trabalhos com esse polímero para aplicações em separação de gases, pervaporação,

ultrafiltração, nanofiltração desde 1986 e, mais recentemente, na área médica (MITTAL, 2005).

Peinemann *et al.* (1986) estudaram a síntese de membranas de poli(éter imida) para aplicação na separação de hélio. Os autores obtiveram membrana assimétrica integral com uma pele densa, utilizando a técnica de imersão-precipitação. Em 1992, em uma atualização desse trabalho, Kneifel e Peinemann sintetizaram fibras ocas de poli(éter imida) para aplicação em separação de gases. Como modificação do trabalho anterior, os autores modificaram o solvente da solução polimérica e o não solvente do banho de precipitação. No primeiro trabalho, utilizou-se hidrocarboneto halogenado como solvente da solução polimérica e compostos orgânicos (acetona e tolueno) como não solvente do banho de precipitação. Entretanto, devido à baixa viscosidade da solução polimérica, tais compostos não seriam vantajosos no procedimento de fiação da fibra oca. Além disso, eles são agentes nocivos e inflamáveis e, portanto, no segundo trabalho, os autores utilizaram solventes miscíveis em água (n-metilpirrolidona, dimetilacetamida e dimetilformamida) e água como não solvente do banho de precipitação e do líquido interno. Os autores avaliaram os efeitos das condições de operação de síntese na estrutura das fibras e verificaram que o aumento da razão entre vazão de líquido interno ( $Q_b$ ) e vazão de solução polimérica ( $Q_p$ ), sem alterar a vazão total (vazão de líquido interno + vazão de solução polimérica) resulta em redução da espessura de parede da fibras e não altera o diâmetro externo das mesmas.

Os autores também investigaram o efeito da escolha do solvente da solução polimérica. O uso de NMP como solvente resultou em uma estrutura com cavidades largas, enquanto a utilização de DMA resultou na redução do número e tamanho das cavidades. Utilizando DMF como solvente, foi obtida uma membrana com estrutura esponjosa.

Ainda na linha de aplicação na área de separação de gases, Wang e colaboradores (1998) sintetizaram fibras ocas de PEI, utilizando uma mistura entre NMP e etanol como solvente. Foram avaliados os efeitos da concentração da solução polimérica, da distância extrusora-banho e do pós-tratamento na estrutura morfológica das membranas, bem como nas características de separação de gases (hélio, hidrogênio, gás carbônico, oxigênio, argônio, nitrogênio e metano). Os autores observaram que a distância extrusora-banho influencia fortemente a morfologia da fibra obtida, no controle da formação de macrovazios. Com elevadas distâncias (30 cm), foram observadas, através de micrografias das seções transversais, que as estruturas alongadas digitiformes atingiram a superfície externa da fibra. Com a diminuição da

distância, o comprimento das estruturas alongadas diminuiu; se não há distância entre a extrusora e o banho, os macrovazios observados foram muito menores.

As morfologias obtidas influenciam fortemente os resultados de permeabilidade e seletividade na separação de gases e, com a seleção de condições de operação adequadas, é possível obter fibras ocas de PEI com propriedades interessantes para a aplicação desejada.

Algumas características reportadas da poli(éter imida) viabilizam sua utilização também como biomaterial, como o fato dela ser não tóxica e esterilizável, devido à sua resistência mecânica e estabilidade térmica (SEIFERT *et al.*, 2002; ALBRECHT *et al.*, 2007a); ser processável em diferentes formas (ALBRECHT *et al.*, 2005; ALBRECHT *et al.*, 2006a); e ser apta a uma ampla gama de modificações superficiais (ALBRECHT *et al.*, 2006b; ALBRECHT *et al.*, 2007b). Alguns trabalhos focados na utilização da PEI como biomaterial são os de Altankov *et al.* (2005); Lützow *et al.* (2006); Trimpert *et al.* (2006); Tzoneva *et al.* (2008a); Tzoneva *et al.* (2008b).

Já em 1994, Peluso e colaboradores estudaram a biocompatibilidade da poli(éter imida) utilizando análises *in vivo* e *in vitro*, e verificaram que a PEI é um ótimo material para o espalhamento e crescimento de células, não apresentando reposta citotóxica ou hemólise. Os resultados de análises ainda mais específicas e o fato de a PEI apresentar boa propriedade de formação de filme e de esterilização fizeram os autores concluir que a PEI poderia ser um biomaterial atrativo.

Seguindo nesta linha de pesquisa, Seifert *et al.* (2002) afirmaram que a poli(éter imida) representa um material muito interessante para preparo de membranas e aplicação em órgãos artificiais convencionais, como hemodiálise, e mais particularmente, em órgãos biohíbridos. Neste sentido, os autores tentaram imobilizar diversos ligantes em membranas planas de PEI para investigar a resposta tecidual e sanguínea destes materiais com relação ao tipo do ligante e tempo de duração da funcionalização. As modificações estudadas foram a introdução de grupos hidroxila, objetivando o aumento da hidrofilicidade; a introdução de grupos amino primário e secundário; e a ligação de heparina visando à melhoria da resposta sanguínea das membranas. Os autores observaram que a hidrofilicidade das membranas funcionalizadas praticamente não foi alterada em relação à membrana não funcionalizada e que a resposta sanguínea da membrana funcionalizada com heparina foi a que apresentou melhor resultado, sendo a única a apresentar melhoria da hemocompatibilidade para permitir a utilização dessas membranas em aplicações em contato com o sangue. Em relação à resposta tecidual, a funcionalização com a

introdução de grupos hidroxila foi a que apresentou melhores resultados, e as demais foram menos favoráveis para uso como membranas em contato com tecidos.

Tzoneva *et al.* (2008a) estudaram a hemocompatibilidade de membranas planas de poli(éter imida) funcionalizadas com grupos carboxílicos, que mostram-se essenciais para a atividade anticoagulante da heparina. Os autores observaram que o aumento na quantidade de grupos ácidos na superfície da membrana aumentava a ativação do complemento e elevava a adesão de plaquetas em relação às membranas sem funcionalização. Este resultado não esperado foi explicado pela baixa afinidade de polímeros de base carboxílica, como o poli(ácido acrílico), com a antitrombina, o que pode diminuir a atividade anticoagulante da superfície do polímero. Apesar do resultado obtido não ter sido o esperado, os autores concluíram que a membrana de PEI possui algum grau de hemocompatibilidade, porém ainda com alto potencial de formação de trombo, fazendo-se necessário substituir os grupos sulfato na superfície do polímero para obter melhor compatibilidade com o sangue.

Segundo Senthilkumar *et al.* (2013), estudos recentes e desenvolvimentos na área biomédica mostraram que a poli(éter imida) possui excelente biocompatibilidade e apresenta baixa resposta imunológica em contato com o sangue. Porém, sua elevada hidrofobicidade restringe as condições de preparo de membranas, fazendo-se necessário aumentar sua molhabilidade, através da introdução de diferentes grupos funcionais, por exemplo. No trabalho de Senthilkumar e colaboradores, foi proposta a modificação da PEI através da funcionalização por carboxilação, seguindo-se o preparo de uma mistura da PEI funcionalizada com poli(acrilonitrila) (PAN), objetivando o preparo de membranas de hemodiálise. Os autores observaram aumento da hidrofiliabilidade, baixa adsorção de proteínas do plasma, supressão da adesão de plaquetas, formação de trombo reduzida e supressão da ativação do complemento quando uma maior quantidade de PEI funcionalizada foi utilizada.

Braune *et al.* (2013) estudaram a hemocompatibilidade de membranas de poli(éter imida) funcionalizadas com um oligoglicerol linear e metilado e um oligo (etileno glicol) através de análises em condições dinâmicas. Os autores concluíram que a PEI é um material com potencial para aplicações cardiovasculares e sistemas extracorpóreos. Nos testes de coagulação e ativação do complemento, houve uma similaridade entre as hemocompatibilidades das membranas funcionalizadas e não funcionalizadas.

Estudos de síntese e aplicação de membranas de poli(éter imida) são reportados em diversas áreas e um levantamento de alguns trabalhos são apresentados na Tabela 4.1. Conforme pode ser observado pelos dados apresentados, a poli(éter imida) é um

polímero explorado na área de membranas em diversos campos de aplicação. É utilizado tanto na geometria plana quanto na de fibra oca e observa-se uma predominância de sua aplicação, pela pesquisa realizada, na área de separação de gases.

**Tabela 4.1.** Alguns trabalhos reportados na literatura sobre síntese e aplicação de membranas de Poli(éter imida): 1980 – 2018.

<b>Autor (ano)</b>	<b>Geometria</b>	<b>Concentração de polímero</b>	<b>Solvente</b>	<b>Banho de Precipitação</b>	<b>Aditivo</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Peinemann et al. (1986)</b>	Plana	-	Hidrocarboneto halogenado	Acetona ou tolueno	-	Separação de gases
<b>Roesink et al. (1991)</b>	Plana	25%	NMP	Água	PVP	Microfiltração
<b>Feng e Huang (1996)</b>	Plana	20% - 28%	DMA	Água deionizada	Nitrato de lítio	Pervaporação
<b>Wang et al. (1998)</b>	Fibra oca	25% – 30%	NMP	Água deionizada	Etanol	Separação de gases
<b>Xu et al. (1999)</b>	Plana	19% - 20%	DMA	Água deionizada ou Água e DMA (3:97)	Polibenzimidazol e polietilenoglicol	Separação óleo-água-surfactante
<b>Seifert et al. (2002)</b>	Plana	25%	NMP	Água deionizada	-	Contato com sangue ou tecido
<b>Shen et al. (2003)</b>	Fibra oca	21,75% - 23,75%	DMA	Água deionizada	Poli(éter imida) sulfonada	Ultrafiltração
<b>Kim e Lee (2004)</b>	Plana	20%	NMP	Água	Polietilenoglicol	Nanofiltração

**Tabela 4.1.** Alguns trabalhos reportados na literatura sobre síntese e aplicação de membranas de Poli(éter imida): 1980 – 2018. (cont.)

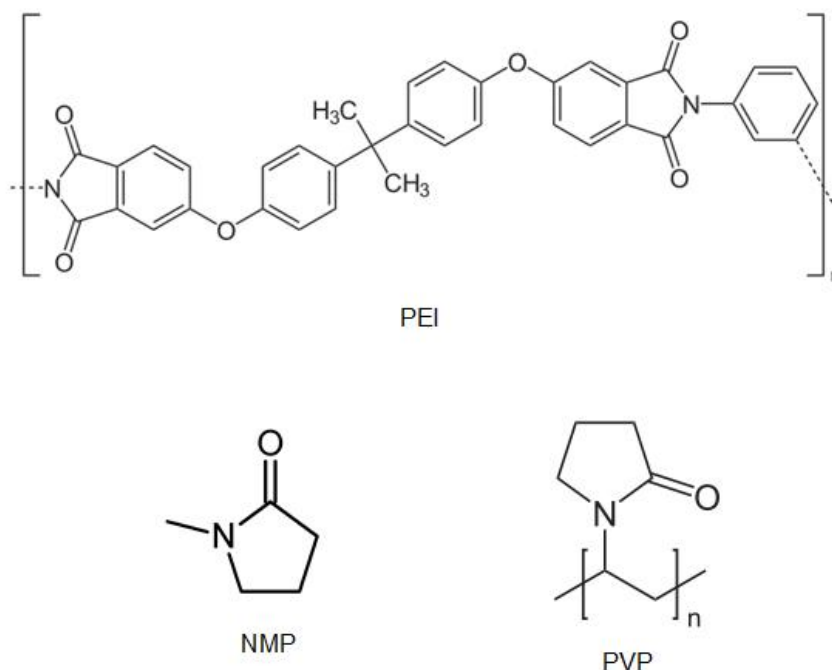
<b>Autor (ano)</b>	<b>Geometria</b>	<b>Concentração de polímero</b>	<b>Solvente</b>	<b>Banho de Precipitação</b>	<b>Aditivo</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Tao e Young (2006)</b>	Plana	20%	NMP e Diclorometano	NMP e Diclorometano	-	Cultura celular e engenharia de tecidos
<b>Qtaishat et al. (2009)</b>	Plana	12%	DMA ou NMP	Água destilada	$\gamma$ -butirolactona	Destilação por membranas
<b>Bakeri et al. (2010)</b>	Fibra oca	10% - 15%	NMP	Água	-	Contactores
<b>Bakeri et al. (2012)</b>	Fibra oca	14,8%	NMP	Água e etanol	-	Contactores
<b>Naim et al. (2014)</b>	Fibra oca	17%	NMP	Água deionizada e NMP e água	Polietilenoglicol	Contactores
<b>Tarsa et al. (2015)</b>	Fibra oca	18%	NMP	Água deionizada	Etanol	Contactores
<b>Ahmad et al. (2017)</b>	Plana	20% – 30%	NMP	Água e isopropanol (4:1) + água	-	Separação de gases
<b>Santos et al. (2017)</b>	Plana	15%	NMP	Água deionizada	PVP	Hemodiálise

# CAPÍTULO 5 – MATERIAIS E MÉTODOS

*Este capítulo objetiva descrever os materiais e procedimentos experimentais utilizados para a síntese, caracterização e modificação superficial das membranas de poli(éter imida) e poli(vinil pirrolidona), realizadas no desenvolvimento deste trabalho.*

## 5.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

As soluções para preparo das membranas compunham-se basicamente do polímero base, poli(éter imida) (PEI Ultem 1000), de massa molar média numérica 52 kDa, fornecido pela *General Electric*; do aditivo macromolecular, poli(vinil pirrolidona) (PVP) do tipo K<sub>90</sub>, de massa molar média numérica 360 kDa, fornecido pela *Fluka Chemica Co.*; e do solvente, n-metil-2-pirrolidona (NMP), fornecido pela *Vetec*. As estruturas moleculares destes compostos são apresentadas na Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Estruturas dos componentes das soluções poliméricas.

As soluções poliméricas foram preparadas através da pesagem por adição dos componentes previamente secos em estufa a 60°C. Após a pesagem dos componentes em um recipiente de vidro adequado, este foi devidamente fechado e vedado, sendo a



mistura levada à agitação mecânica e aquecimento (70°C) por aproximadamente 24 horas para completa homogeneização.

## 5.2. SÍNTESE DE MEMBRANAS

As membranas na geometria de fibras ocas foram sintetizadas através da extrusão simples (extrusora com dois canais de escoamento anulares concêntricos) da solução polimérica previamente preparada. Inicialmente, a solução polimérica foi colocada em um cilindro de aço inoxidável (tanque de alimentação), o qual permanecia em repouso durante 24 horas para eliminação de bolhas de ar remanescentes formadas durante o processo de transferência da solução para o cilindro. A pressurização do tanque de alimentação com gás inerte (nitrogênio) permitia o escoamento da solução para o canal externo anular da extrusora, enquanto que simultaneamente escoava no canal interno da extrusora o líquido coagulante movido por bomba de engrenagem da marca Diacti. O contato das duas fases líquidas se dá na saída da extrusora e permite a formação inicial da fibra oca. A composição do líquido interno é importante variável para determinação da morfologia da membrana, conforme discutido no Capítulo 4. O sistema de fiação utilizado foi o disponível no laboratório de Processos com Membranas e Polímeros do PEQ.

O posicionamento da extrusora em relação ao banho externo de precipitação, chamado de distância extrusora-banho (DEB), é um parâmetro importante para determinação da morfologia da fibra formada, pois juntamente com a velocidade de fiação, determina o tempo de exposição ao ar da fibra extrusada. Ao entrar no banho de precipitação, composto de água microfiltrada, as fibras eram posicionadas manualmente em roldanas de nylon e tensionadas por ação de um motor regulável que atuava após a última roldana. Na saída do banho de precipitação, as fibras eram recolhidas em outro banho de água microfiltrada, a fim de remover o solvente residual ainda presente na matriz polimérica. Um esquema do sistema de síntese de fibras ocas por extrusão, conforme utilizado neste trabalho, foi apresentado na Figura 4.10, do Capítulo 4. Na Figura 5.2, é apresentado o detalhe da extrusora utilizada para confecção das fibras ocas.



**Figura 5.2.** Detalhe da extrusora utilizada no sistema de fiação por extrusão da solução polimérica.

As fibras formadas eram mantidas imersas em água microfiltrada e levadas a estufa a 60°C durante 24 horas para completa eliminação de solvente residual. Em seguida, a secagem dessas fibras era realizada em temperatura ambiente, após sua prévia imersão em um banho de água e glicerol (10:1) durante 4 horas.

Durante a síntese das fibras, as principais variáveis de estudo foram a composição da solução polimérica, em relação às quantidades do polímero base PEI e do aditivo PVP e a composição do líquido interno. As condições experimentais estudadas são apresentadas na Tabela 5.1, sendo a pressão indicada a mantida no tanque de alimentação da solução polimérica, e que determina a sua velocidade e vazão mássica. A temperatura de síntese variou em torno de 24°C a 25°C.

**Tabela 5.1.** Condições experimentais utilizadas na síntese das fibras ocas.

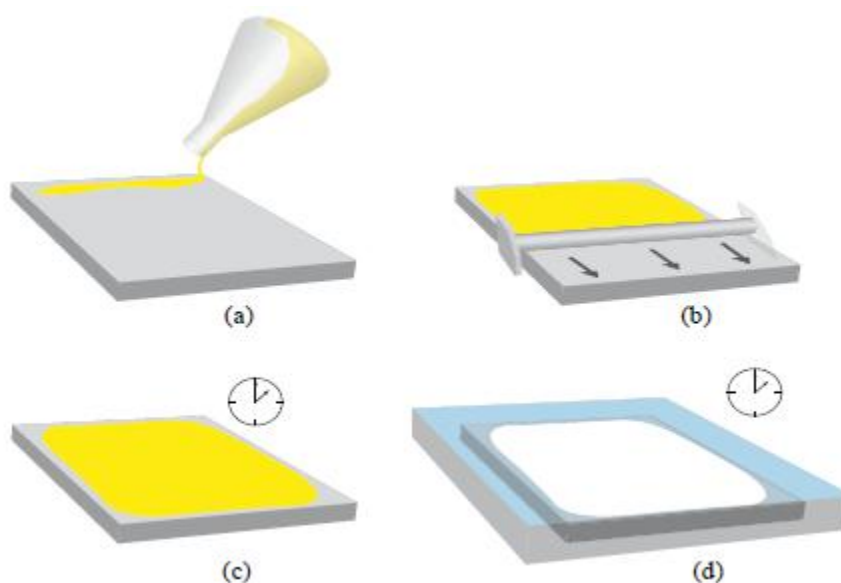
Condição	PEI (%)	PVP (%)	Líquido interno	Pressão (bar)
1	12	10	Água	3
2	12	10	Água:NMP (1:1)	3
3	15	05	Água	2
4	15	05	Água:NMP (1:1)	1
5	15	10	Água	4
6	15	10	Água:NMP (1:1)	4
7	12	05	Água	1
8	12	05	Água:NMP (1:1)	1

Além das condições experimentais, alguns parâmetros foram medidos em cada fiação: vazão de solução polimérica (g/min); DEB (cm); vazão de líquido interno (mL/min); e velocidade de fiação (cm/s). O tempo de exposição ao ar das fibras é calculado pela razão entre o DEB e a velocidade de fiação. Tais parâmetros são apresentados no Anexo A.

Para a realização de algumas análises, foi necessária a síntese de membranas planas. Para isso, foi realizado o espalhamento simples da solução polimérica, a qual foi vertida sobre uma placa de vidro de 20 cm x 30 cm, previamente lavada, seca e livre de material aderido. O espalhamento foi realizado manualmente, utilizando uma faca de aço inoxidável de espessura controlada de 0,15 mm. Após o espalhamento, o filme polimérico foi imerso no banho de não solvente, composto de água destilada microfiltrada e desmineralizada, quando ocorria a fixação da estrutura e formação da membrana.

Do mesmo modo realizado com as fibras ocas, as membranas planas formadas eram mantidas em um banho de água e levadas à estufa a 60°C durante 24 horas para eliminação de solvente (NMP) e aditivo (PVP) residuais. A secagem das membranas também foi realizada em temperatura ambiente, após a imersão das mesmas em um banho de água e glicerol (10:1) durante 4 horas.

As etapas envolvidas na síntese de membranas planas através do espalhamento simples estão esquematizadas na Figura 5.3.



**Figura 5.3.** Etapas da síntese de membranas planas por espalhamento. (a) Solução polimérica sendo vertida na placa de vidro; (b) Espalhamento com faca de espessura controlada; (c) Exposição ao ar ambiente; (d) Imersão no banho de precipitação.

### 5.3. SÍNTESE DOS MÓDULOS DE FIBRAS OCAS

Com as fibras ocas sintetizadas, foram montados módulos de permeação, dispondo as fibras longitudinalmente em tubos de CPVC da marca Amanco®. Os módulos compunham-se de um feixe de 10 fibras, as quais eram fixadas nas extremidades utilizando resina epóxi do tipo Araldite®. Após o tempo de cura da resina (aproximadamente 6 horas), as extremidades eram cortadas com o uso de uma faca de corte específica e conexões do tipo luva eram colocadas nessas extremidades para viabilizar as demais conexões necessárias.

Do mesmo modo, foram confeccionados módulos com fibras de uso clínico em hemodiálise, uma de polissulfona e outra de poli(éter sulfona). Neste caso, o feixe continha 62 fibras, a fim de obter área semelhante a dos demais módulos.

A Figura 5.4 apresenta o detalhe de um módulo de permeação montado conforme descrito anteriormente.



**Figura 5.4.** Módulo de permeação e detalhe da extremidade cortada para conexão da alimentação.

#### 5.4. MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL

A modificação superficial das membranas sintetizadas tinha como objetivo elevar a hemocompatibilidade das mesmas, viabilizando sua utilização em hemodiálise. Foram realizadas modificações por meio da imobilização de heparina e, como testes iniciais, imobilização de albumina, através da ligação covalente dos grupos funcionais dessas substâncias com grupos amino previamente inseridos na superfície da membrana.

Foram analisadas duas substâncias como doadoras de grupos amino: a etileno diamina (EDA) ou a Poli(etileno imina) (Pei). A utilização da Pei foi baseada em trabalho anterior do grupo, publicado por Santos *et al.* (2017), realizando-se algumas adaptações necessárias.

a) Metodologia 1: Rota utilizando poli(etileno imina) e maior tempo de reação (Pei\_30\_PEGDGE)

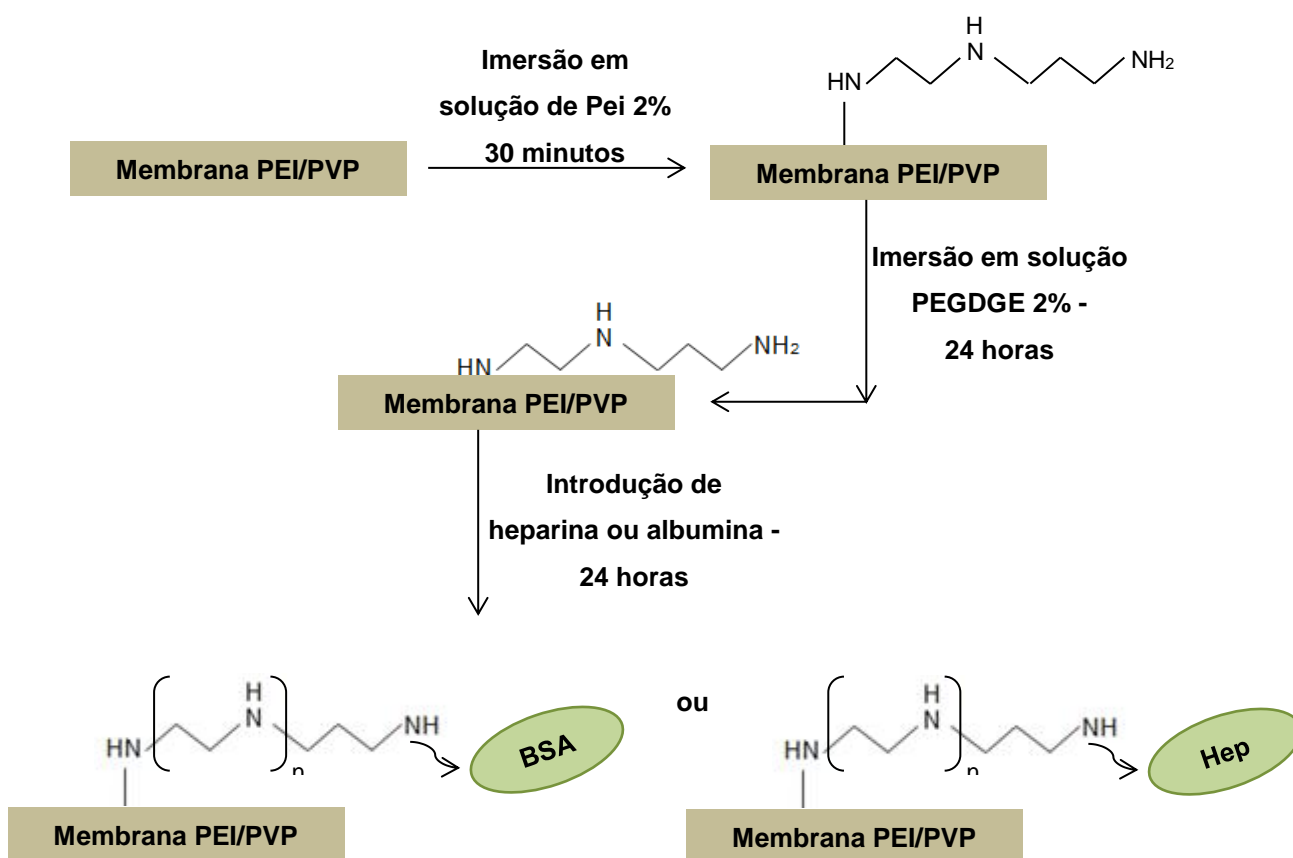
A primeira metodologia analisada utilizou a Pei como doador de grupos amino. As membranas foram colocadas em contato uma solução de Pei 2% em isopropanol e água (1:1) durante 30 minutos, a 70°C. Após a reação, as membranas foram lavadas com água desmineralizada e, em seguida, colocadas em contato com uma solução aquosa 2% de poli(etileno glicol) diglicil éter (PEGDGE), à temperatura ambiente,

durante 24 horas. Esta segunda etapa tinha função de estabilizar a superfície ativada da membrana, pois a camada de poli(etileno imina) formada não é estável em temperaturas superiores a 60°C (ALBRETCH *et al.*, 2006). Após a estabilização, as membranas foram novamente lavadas com água desmineralizada e, só então procedeu-se a imobilização de albumina ou heparina na superfície da membrana.

Para a imobilização de albumina ou heparina, foi preparada uma solução contendo 200 mL de tampão citrato (pH 5), 20 mg de EDC (1-etil-3-(3-dimetil amidopropil) carbodiimida) e 100 mg de albumina bovina sérica, adquirida da Sigma-Aldrich, ou 10 mg de heparina sódica, adquirida da *Tocris Bioscience*, com atividade biológica mínima >150 U.I./mg. O EDC é utilizado para ativar a cadeia carboxílica e, dessa forma, viabilizar a reação direta desta com a amina primária.

As membranas foram colocadas em contato com essa solução durante 24 horas, a 4°C, seguindo-se a lavagem com água desmineralizada.

Na Figura 5.5 é apresentado um esquema proposto da reação que ocorre através dessa metodologia de modificação superficial.

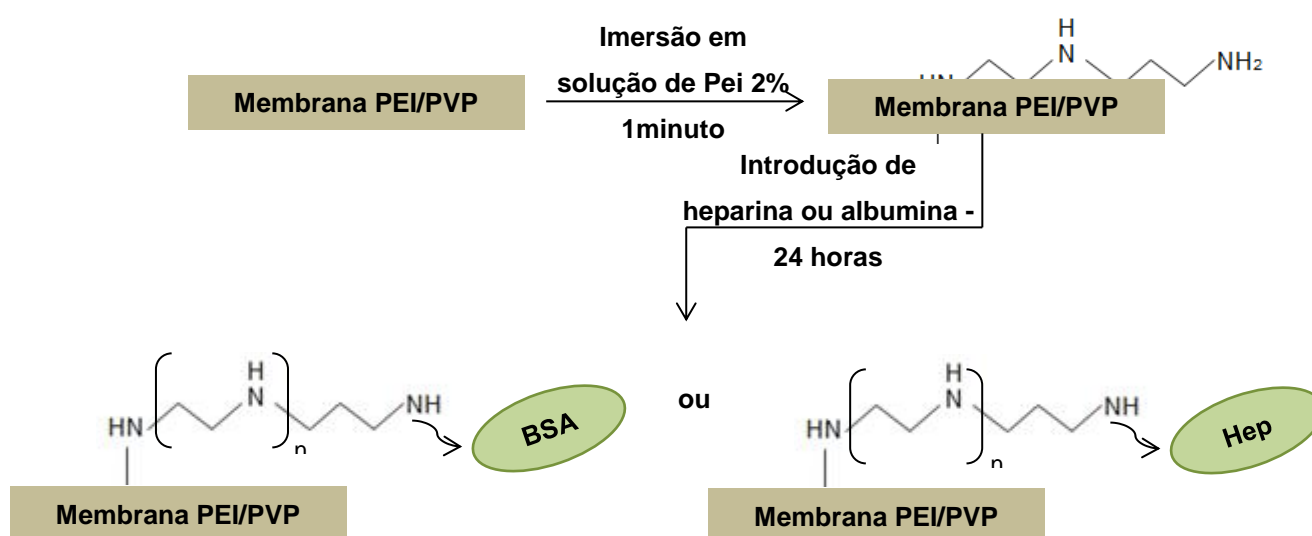


**Figura 5.5.** Esquema proposto para reação de modificação superficial através da Metodologia 1.

b) Metodologia 2: Rota utilizando poli(etileno imina) e menor tempo de reação (Pei\_1)

A segunda metodologia utilizou novamente Pei como doador de grupos amino, porém o tempo de reação foi reduzido para 1 minuto e a ligação covalente da albumina ou heparina foi realizada imediatamente após a introdução de grupos amino e lavagem das membranas, sem a etapa de estabilização com PEGDGE. A aplicação proposta para a membrana está na faixa de estabilidade da camada de poli(etileno imina) e, portanto, essa etapa da metodologia foi retirada.

Na Figura 5.6 é apresentado um esquema proposto para a reação que ocorre através dessa metodologia de modificação superficial.

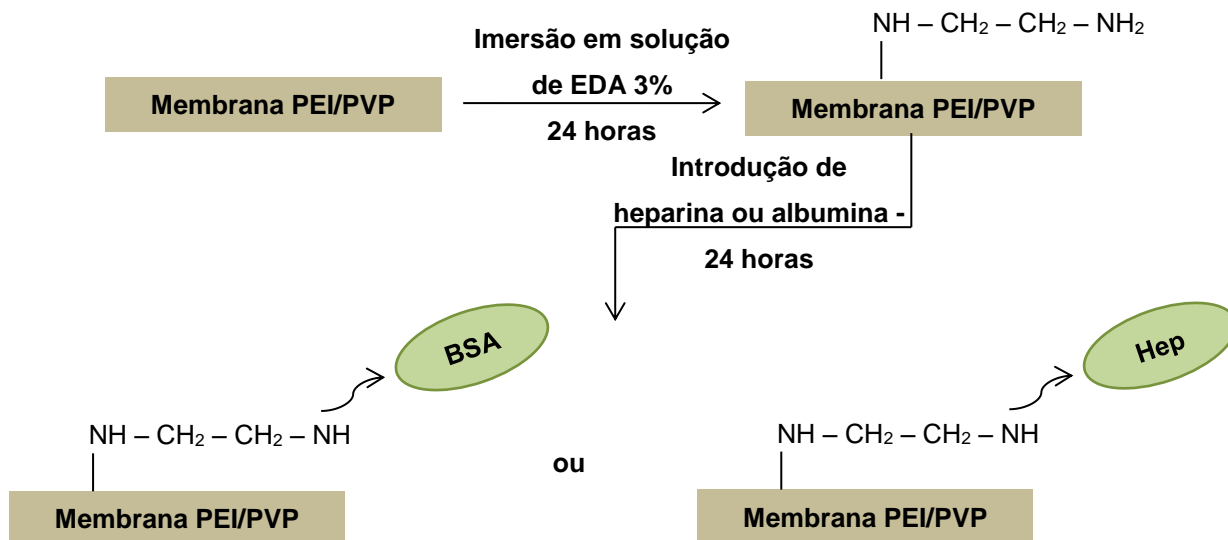


**Figura 5.6.** Esquema proposto para reação de modificação superficial através da Metodologia 2.

c) Metodologia 3: Rota utilizando etileno diamina (EDA\_24)

A terceira metodologia analisada utilizou EDA como agente doador de grupos amino, ao invés da Pei. A etapa de introdução de grupos amino foi então realizada com uma solução aquosa 3% de EDA, durante 24 horas, a 15°C. A estabilização com PEGDGE nessa metodologia não é necessária, pois ela está associada à camada não estável da poli(etileno imina) a temperaturas elevadas. Após a introdução dos grupos amino, segue-se a lavagem da membrana com água desmineralizada e ligação covalente da albumina ou heparina, do mesmo modo da metodologia 1.

Na Figura 5.7 é apresentado um esquema proposto para a reação de modificação superficial utilizando a etilenodiamina como doador de grupos amino.



**Figura 5.7.** Esquema proposto para a reação de modificação superficial através da Metodologia 3.

Para a realização da modificação da superfície das membranas na geometria fibra oca, foi realizado o bombeamento das soluções descritas por dentro das fibras, utilizando os módulos confeccionados conforme descrito no item 5.3. As temperaturas das soluções foram controladas utilizando uma placa de aquecimento e banho de refrigeração.

No caso da modificação realizada na superfície de membranas planas, foram cortados pedaços contendo aproximadamente 47 mm de diâmetro, os quais eram imersos nas soluções. O controle das temperaturas altas foi realizado utilizando placa de aquecimento, e para alcançar a temperatura de 4°C, as membranas planas reagem com as soluções de imobilização de albumina e heparina na geladeira, sob agitação magnética branda constante.

#### 5.4.1 Quantificação de Albumina Imobilizada

A quantificação da albumina imobilizada foi realizada utilizando a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976), baseado na adsorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250. Segundo essa metodologia, preparou-se 1 L do reagente utilizando-se 0,1 g de azul brilhante de Coomassie, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido ortofosfórico 85%, completando-se o restante com água destilada. O reagente foi armazenado em



frasco âmbar, a 4°C, mantendo-se estável por três meses. Antes de cada utilização, era realizada uma filtragem do reagente, para retenção de qualquer material precipitado.

A ligação do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 às proteínas induz a conversão do corante a uma forma estável não protonada, de coloração azul, e com um máximo de absorção a 595 nm. Esta forma, azul e não protonada é detectada pela leitura de absorbância a 595 nm por espectrofotometria, a fim de quantificar a concentração de proteínas. Dessa forma, amostras da solução de albumina antes e após a reação com as membranas foram analisadas e a quantidade imobilizada foi determinada por um balanço de massa.

Uma curva de calibração foi determinada antes de cada análise de Bradford, utilizando cinco soluções padrão de concentração conhecida de albumina (0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 g/L). O branco consistia da solução tampão de citrato de sódio com EDC.

O tempo de reação das amostras e soluções padrão com o reagente de Coomassie era de 10 minutos, após o qual era realizada a leitura da absorbância a 595 nm.

#### **5.4.2. Quantificação da Heparina Imobilizada**

A quantificação da heparina imobilizada na superfície da membrana foi realizada utilizando método colorimétrico da metacromasia proposto por FARNDALÉ et al (1986).

A solução de análise foi preparada através da dissolução de 16 mg de azul de metileno em 1 L de água destilada contendo 3,04 g de glicina, 2,37 g de NaCl e 95 mL de HCl 0,1 M. Este reagente é estável em vidraria âmbar durante três meses, a temperatura ambiente. Quando esta solução é estocada a 4°C, a cor é revertida, provavelmente devido à agregação de partículas do corante (FARNDALÉ et al, 1986).

Para a determinação da concentração de heparina, 100 µL de amostra, coletados antes e após a reação com as membranas, foram adicionados a 2,5 mL da solução de análise, realizando-se a leitura da absorbância a 550 nm. Da mesma forma que para a albumina, a quantidade de heparina imobilizada foi obtida por um balanço de massa a partir das concentrações da solução antes e após a imobilização.

Uma curva de calibração foi obtida a partir de soluções padrão de heparina, preparadas com concentrações conhecidas (7; 17,5; 35; 52,5; 70 mg/L) antes de cada análise. Assim como na análise de quantificação de albumina, o branco consistia da

solução tampão de citrato de sódio com EDC. Foi necessário realizar diluições para que as amostras entrassem na faixa de linearidade.

## 5.5. TESTES DE CARACTERIZAÇÃO

Para a caracterização das membranas, foram realizadas análises da morfologia, observando-se a superfície interna (SI), superfície externa (SE) e a seção transversal (ST) das mesmas; das propriedades de transporte, medindo-se a permeabilidade hidráulica, rejeição de solutos urêmicos, lisozima e albumina, através de testes de ultrafiltração, e Remoção de ureia, através de testes de diálise. As superfícies das membranas foram caracterizadas através de análises de hidrofiliicidade, potencial zeta e espectroscopia de infravermelho (FT-IR). Por fim, foram realizadas análises de hemocompatibilidade/biocompatibilidade por meio de testes de adsorção de proteínas, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e tempo de protrombina (PT), adesão plaquetária e hemólise, realizados segundo a ISO 10993 (2017), parte 4, que trata da seleção de testes para avaliação de interações de equipamentos médicos com o sangue. Essas últimas análises foram realizadas em parceria com a Escola de Enfermagem e Farmácia, da Universidade Federal de Alagoas, no Laboratório de Diagnósticos de Doenças Complexas e Terapia Celular/ Hematologia Clínica (LADITEC).

### 5.5.1. Análise morfológica

A análise morfológica das fibras foi realizada utilizando o microscópio de transmissão e varredura Jeol 200FX, localizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise, do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM), o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200, do Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros (PAM) e o microscópio eletrônico de varredura FEI - Inspect S50, do Instituto Nacional de Tecnologia (INT). Amostras das superfícies interna e externa e da seção transversal foram fixadas em um suporte metálico e metalizadas através do recobrimento com uma fina camada de ouro/platina, de aproximadamente 300 Å, em um metalizador do tipo *sputtering* (Quorum Q150RES). A metalização é necessária em materiais que não conduzem corrente elétrica, como é o caso das membranas analisadas. As amostras

das seções transversais foram fraturadas em banho de nitrogênio líquido, pois o congelamento rápido da membrana evita que ocorra a deformação dos poros, se presentes.

### 5.5.2. Permeabilidade hidráulica

Os módulos confeccionados conforme descrito no item 5.3 eram montados no sistema de permeação esquematizado na Figura 5.8 para medição da permeabilidade hidráulica. Neste sistema, a alimentação era bombeada por dentro das fibras, mantendo a extremidade inferior fechada e coletando o permeado pela lateral do módulo. O sistema era operado em regime contínuo, com retorno de parte da alimentação (água destilada, microfiltrada e desmineralizada) bombeada para as fibras, ajustando-se a pressão através de uma válvula reguladora. A vazão de permeado era medida com o auxílio de uma proveta de 10 mL e a pressão de operação variou na faixa de 0,4 até 1 bar.

A determinação da permeabilidade hidráulica se dava através da determinação do fluxo de permeado em diferentes pressões, segundo a Equação 5.1, após prévia compactação das membranas a uma pressão constante de 1 bar.

$$J_P = L_P \Delta P \quad (\text{Equação 5.1})$$

$J_P$  é o fluxo de permeado (L/h.m<sup>2</sup>)

$L_P$  é a permeabilidade hidráulica (L/h.m<sup>2</sup>.bar)

$\Delta P$  é o diferencial de pressão (bar)

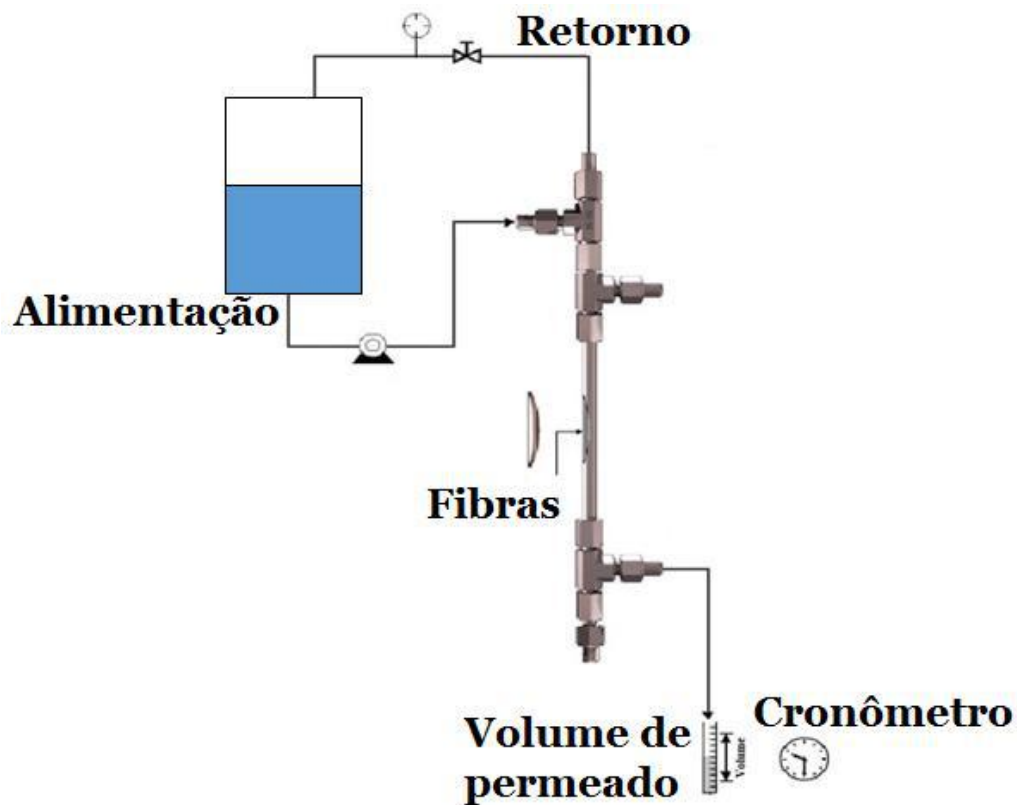
A área de superfície útil de permeação do feixe de fibras foi determinada utilizando-se a Equação 5.2.

$$A_{\text{útil}} = n\pi DL \quad (\text{Equação 5.2})$$

$n$  é o número de fibras no feixe

$D$  é o diâmetro interno médio das fibras (m)

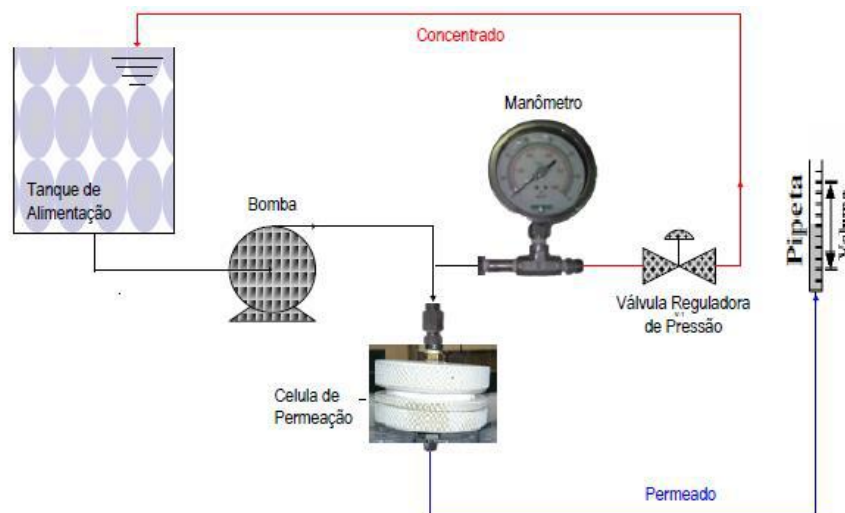
$L$  é o comprimento útil da fibra no módulo (m)



**Figura 5.8.** Esquema do sistema de permeação para determinação da permeabilidade hidráulica.

No caso das membranas planas, foi utilizada uma célula de permeação, acoplada a um sistema de permeação, conforme esquematizado na Figura 5.9. A membrana era cortada no formato circular, com diâmetro de 4,7 cm e colocada na célula de permeação. A célula era fechada e conectada ao sistema. O sistema de permeação utilizado era de fluxo contínuo, com reciclo de concentrado. O tanque de alimentação era preenchido com água desmineralizada.

A determinação da permeabilidade hidráulica foi realizada utilizando-se a Equação 5.1, medindo-se o fluxo de permeado variando a pressão de operação de 0,5 bar a 1,8 bar, pressão em que foi realizada a compactação das membranas.



**Figura 5.9.** Esquema do sistema de permeação das membranas planas.

### 5.5.3. Coeficiente de rejeição de solutos urêmicos, lisozima e albumina

Os coeficientes de rejeição de solutos urêmicos, lisozima e albumina foram determinados utilizando os sistemas de permeação esquematizados anteriormente nas Figuras 5.8 e 5.9. A pressão de operação foi fixada em 0,25 bar, coletando-se amostras da alimentação e permeado após o estado estacionário ser atingido. Foram analisados como solutos urêmicos creatinina, fosfato e vitamina B<sub>12</sub>, que apesar de não ser uma toxina urêmica, é utilizada como marcador para solutos moleculares na faixa de tamanho entre pequeno e médio. A lisozima foi utilizada como representante do soluto de massa molar média, especificamente a  $\beta_2$  – microglobulina, pois possuem massas molares semelhantes ( $\beta_2$  – microglobulina : 11,8 kDa; lisozima: 14,3 kDa). Na Tabela 5.2 são apresentadas as concentrações utilizadas das soluções de alimentação nos testes de ultrafiltração.

**Tabela 5.2.** Concentrações e massas molares dos solutos utilizados nos testes de ultrafiltração.

Soluto	Concentração	Massa molar (kDa)
<b>Creatinina (mmol/L)</b>	0,94	0,113
<b>Fosfato (mmol/L)</b>	1,7 (pH 7,4±0,1)	0,134
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (mmol/L)</b>	0,04	1,4
<b>Lisozima (mg/L)</b>	90	14,3
<b>Albumina (mg/L)</b>	1000	66

Para determinação da concentração de creatinina, foi utilizado um kit específico da marca Katal, o qual utiliza a metodologia de *Jaffé*, através da qual a creatinina reage com ácido pícrico em meio alcalino, formando complexos corados com um máximo de absorção em 510 nm. Para determinação da concentração de fosfato, também foi utilizado um kit específico, da marca Doles, o qual utiliza a metodologia de Gomori modificado, com reação do fósforo inorgânico com molibdato, formando um complexo fosfomolibdato de cor azul, realizando-se a leitura da absorbância das amostras a 660 nm. Os valores de absorbância de cada amostra analisada eram relacionados com uma curva de calibração previamente determinada a partir dos padrões de concentração conhecida fornecidos junto com os kits. As curvas de calibração utilizadas são apresentadas no Anexo B. A Tabela 5.3 descreve o conteúdo químico dos kits utilizados.

**Tabela 5.3.** Conteúdo químico dos kits para determinação da concentração de creatinina e fosfato.

	Kit	
	Creatinina	Fosfato
<b>Conteúdo químico</b>	Solução tampão	Ácido ascórbico
	Ácido pícrico	Reagente molibdato
	Acidificante (ácido acético)	Solução alcalina
	Solução padrão (3,0 mg/dL)	Solução padrão (5 mg/dL)

As análises das concentrações das amostras de alimentação e permeado de vitamina B<sub>12</sub>, lisozima e albumina foram realizadas através das leituras das absorbâncias das mesmas, utilizando um espectrofotômetro, sem a necessidade de kits específicos, pois estas substâncias apresentam pico de absorção característico de 560

nm para a vitamina B<sub>12</sub>, 281 nm para a lisozima e de 278 nm para a albumina. Curvas de calibração foram previamente obtidas a partir de soluções destes solutos com concentrações conhecidas e são apresentadas no Anexo B.

Conhecidas as concentrações de alimentação e permeado de cada um dos solutos analisados, o coeficiente de rejeição foi calculado a partir da Equação 5.3.

$$R(\%) = \left(1 - \frac{C_P}{C_A}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 5.3})$$

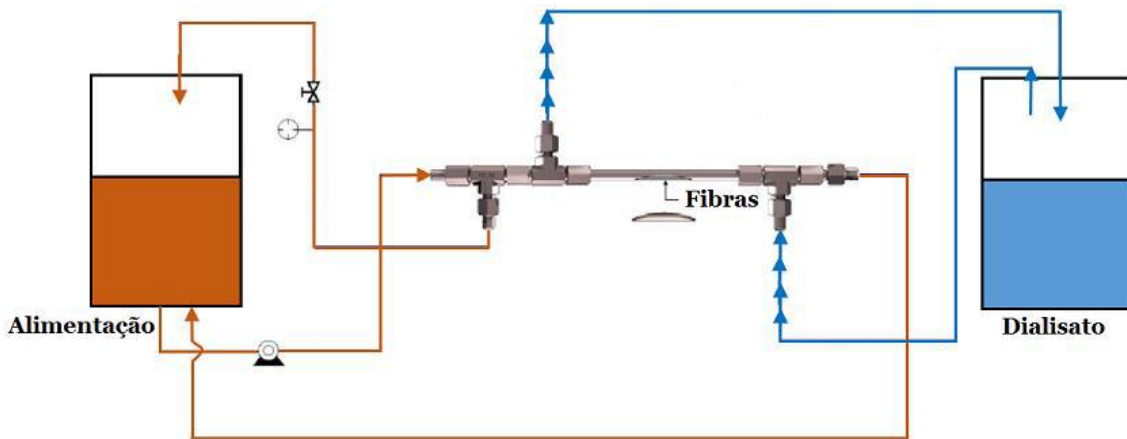
$C_P$  é a concentração do permeado

$C_A$  é a concentração da alimentação

A concentração das soluções de soluto utilizadas seguia a norma internacional para testes de hemodiálise, ISO 8637:2010.

#### **5.5.4. Remoção de ureia e *clearance***

Para determinar a remoção de ureia e o *clearance*, foram realizados testes de diálise com duração de 4 horas, alimentando-se uma solução aquosa de ureia a 1800 mg/L por dentro das fibras, e água desmineralizada entre a carcaça do módulo e as fibras, atuando como dialisato, conforme apresentado no esquema da Figura 5.10.



**Figura 5.10.** Esquema do sistema utilizado nos testes de diálise.

Conforme se pode observar na Figura 5.10, parte da solução de ureia alimentada retorna para o tanque de alimentação (para que haja um melhor controle da vazão de alimentação) e parte passa por dentro das fibras, retornando, então, para o tanque de alimentação. O dialisato é alimentado por fora das fibras, preenchendo o módulo de permeação e retornando para o tanque de dialisato. Amostras da alimentação e do dialisato foram coletadas no início e ao final do procedimento. As vazões de alimentação foram mantidas em torno de 225 mL/min e de dialisato, 450 mL/min. No caso dos testes com os módulos de fibras comerciais, as vazões de alimentação máximas atingidas eram de 25 mL/min, mantendo-se a de dialisato o dobro desse valor.

As concentrações das amostras coletadas foram medidas utilizando um kit específico de determinação de ureia, da marca Katal, o qual utiliza o método enzimático colorimétrico (metodologia Urease Berthelot). Por este método, inicialmente a ureia é hidrolisada pela enzima urease e produz gás carbônico e íons amônio. Estes íons, após reação, produzem o corante azul de indofenol, cuja cor formada é proporcional à concentração de ureia, fazendo-se a leitura da absorbância a 600 nm. Uma curva de calibração foi previamente determinada a partir de uma solução padrão a 700 ppm fornecida pelo kit (Anexo B).

A remoção de ureia foi determinada a partir da concentração final de dialisato (após 4 horas) e da concentração inicial da solução de alimentação, utilizando a Equação 5.4.

$$RU (\%) = \left(1 - \frac{C_{uf}}{C_{ui}}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 5.4})$$

$C_{uf}$  é a concentração de ureia pós-diálise

$C_{ui}$  é a concentração de ureia pré-diálise



O *clearance* de ureia foi calculado utilizando a definição do *clearance* difusivo dada pela Equação 2.12 e discutida anteriormente.

### **5.5.5. Caracterização das superfícies das membranas**

#### *5.5.5.1. Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)*

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula. Um espectro de infravermelho é geralmente obtido passando a radiação infravermelha através de uma amostra e determinando a fração da radiação incidente absorvida em uma determinada energia. A energia na qual qualquer pico em um espectro de absorção aparece corresponde à frequência de uma vibração de uma parte de uma molécula de amostra (STUART, 2004).

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho permite a avaliação de alterações nas amostras pela comparação das bandas de absorção, características de grupos funcionais específicos, em função do aparecimento, desaparecimento, aumento ou diminuição destas bandas. É uma técnica analítica que permite a identificação de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos, por meio das absorções características de grupos funcionais específicos. Para análise qualitativa, a interpretação de um espectro IR é feita com base na posição, formato da banda, comparação de espectros encontrados na literatura disponível e histórico da amostra (PANZARINI, 2003).

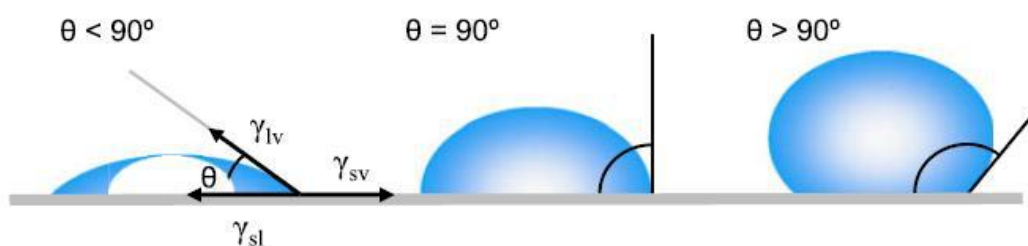
As membranas planas foram caracterizadas quanto à estrutura química, antes e depois da modificação superficial, por espectroscopia de infravermelho de refletância total atenuada (FT-IR/ATR), utilizando-se o espectrômetro da marca PerkinElmer, modelo Spectrum 100.

A região analisada foi entre 500 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando 16 varreduras para cada amostra, que foram colocadas sob o cristal em apenas um lado.

#### *5.5.5.2. Hidrofilicidade*

A hidrofilicidade das membranas foi avaliada por meio das análises de ângulo de contato e de absorção de água.

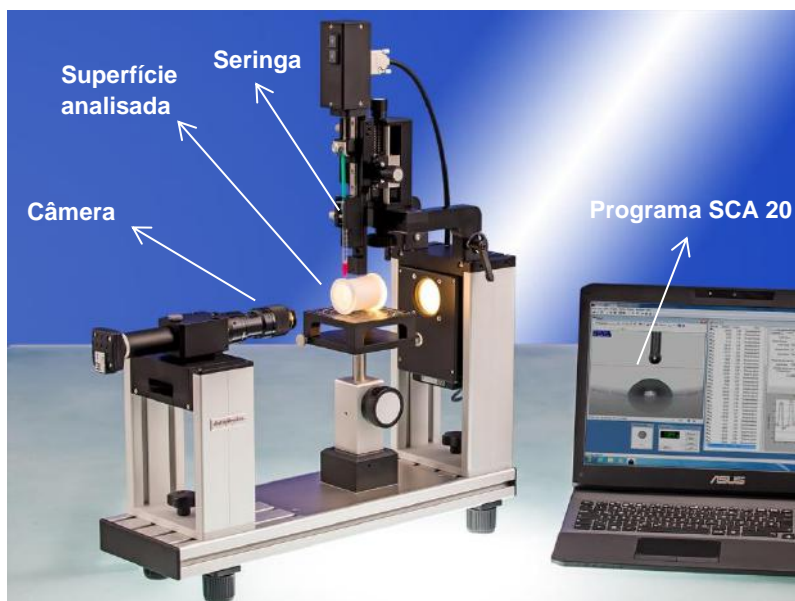
O ângulo de contato é definido como o ângulo formado pela interseção da interface líquido-sólido e a interface líquido-vapor (adquirida geometricamente aplicando uma linha tangente do ponto de contato ao longo da interface líquido-vapor no perfil da gota). A interface onde coexistem sólido, líquido e vapor é referida como a "linha de contato trifásico". A Figura 5.11 mostra que um pequeno ângulo de contato é observado quando o líquido se espalha na superfície, enquanto um grande ângulo de contato é observado quando o líquido não se espalha na superfície. Mais especificamente, um ângulo de contato inferior a  $90^\circ$  indica que o molhamento da superfície é favorável e o fluido se espalhará sobre uma grande área na superfície; enquanto ângulos de contato superiores a  $90^\circ$  geralmente significam que o molhamento da superfície é desfavorável, então o fluido minimiza o contato com a superfície e forma uma gota de líquido compacta (YUAN e LEE, 2013).



**Figura 5.11.** Ilustração dos ângulos de contato formados por gotas de líquido em superfícies lisas. Fonte: Yuan e Lee (2013).

Para a medição do ângulo de contato, foi gerada uma gota de água de no máximo  $10 \mu\text{L}$ , a qual foi colocada na superfície limpa e seca da membrana. Para isso, utilizou-se o goniômetro OCA 15EC, mostrado na Figura 5.12, e o programa SCA 20, ambos fornecidos pela *Dataphysics*. Nesse equipamento, uma seringa é preenchida com o líquido ao qual será medido o ângulo de contato com a superfície (neste caso, água) e uma gota do líquido é gerada perpendicularmente à superfície das membranas analisadas. O operador do equipamento regula a distância entre a gota e a superfície, movimentando a superfície. Gera-se um vídeo de todo o procedimento, desde a formação da gota, seu contato com a superfície e o possível espalhamento que pode ocorrer em superfícies muito hidrofílicas ou muito porosas. No instante do contato entre a gota e a superfície, uma fotografia é tirada e o próprio programa a analisa, dando como resultado os ângulos de contato direito e esquerdo e a média destes, o erro e o volume

da gota. O volume da gota não deve ser maior que 10  $\mu\text{L}$  para que os efeitos da força de gravidade possam ser desprezados.



**Figura 5.12.** Goniômetro OCA 15.

Outra técnica utilizada para avaliar a hidrofiliicidade das membranas antes e após a modificação superficial foi a análise de absorção de água, conforme Wang *et al* (2009). Uma quantidade conhecida de membrana seca, definida como  $m_1$ , foi imersa em água desmineralizada durante 8 horas, a 25°C. Após esse tempo, o excesso de água na superfície foi removido, a membrana foi pesada e sua nova massa, definida como  $m_2$ . A absorção de água foi calculada pela diferença entre as massa  $m_2$  e  $m_1$ , dividida pela massa de membrana inicial,  $m_1$ , e dada em mg de água/mg de membrana.

#### 5.5.5.3. Potencial zeta

As medidas do potencial zeta das membranas foram realizadas no equipamento SurPass (Anton Paar, Austria), baseando-se no fenômeno eletrocinético do potencial de escoamento (*streaming potential*). No equipamento utilizado, potencial zeta é calculado a partir do potencial de escoamento gerado pelo fluxo de uma solução eletrolítica diluída recirculada (solução de cloreto de potássio 1 mM) por um canal formado por um espaçador entre duas amostras de membranas idênticas, dispostas uma oposta a outra, segundo a Equação 5.5, de Fairbrother-Mastin (HURWITZ *et al.*, 2010):

$$\left(\frac{\Delta\varphi}{\Delta P}\right) = \zeta \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{\eta \lambda_0} \left(\frac{\lambda_h R_h}{R}\right) \quad (\text{Equação 5.5})$$

$\Delta\varphi$  é o potencial de escoamento (mV)

$\Delta P$  é a pressão aplicada na célula para forçar o eletrólito a fluir sobre a superfície carregada (mbar)

$\varepsilon_0$  é a permissividade no vácuo (As/Vm)

$\varepsilon_r$  é a constante dielétrica relativa do solvente do eletrólito

$\zeta$  é o potencial zeta (mV)

$\eta$  é a viscosidade dinâmica do eletrólito (mPa.s)

$\lambda_0$  é a condutividade elétrica do eletrólito em circulação (mS/m)

$\lambda_h$  é a condutividade elétrica da solução eletrolítica (mS/m)

$R_h$  é a resistência elétrica medida através do canal de escoamento

$R$  é a resistência elétrica medida através do canal em condições experimentais normais

Antes da realização da análise, as membranas antes e após a funcionalização da superfície eram imersas em solução de cloreto de potássio 1 mmol/L.

A montagem anteriormente descrita para a análise foi adaptada para as membranas desse trabalho, que apresentavam elevado vazamento na metodologia convencional. Dessa forma, o canal formado para o escoamento da solução eletrolítica continha apenas uma membrana e o espaçador. Os resultados para esse tipo de operação são analisados por comparação das amostras, não sendo levados em consideração os valores absolutos apresentados pelo equipamento. A faixa de pH analisada foi de 2 a 6, ajustado utilizando um titulador automático do próprio equipamento, pela adição de soluções de ácido clorídrico (HCl) e de hidróxido de sódio (NaOH), se necessário.

As medidas representam a média de quatro pontos realizados em um mesmo experimento.

#### 5.5.5.4. Adsorção de proteínas

Os testes de adsorção de proteínas são importantes em membranas para uso em hemodiálise porque a perda de proteínas durante o tratamento pode causar a hipoalbuminemia e, conseqüentemente, levar à morte dos pacientes.

Para determinação da adsorção de albumina na superfície das fibras, foi utilizado o método estático, através do qual uma massa de membrana conhecida (aproximadamente 50 mg) foi acondicionada em tubos de vidro contendo 10 mL de solução de albumina bovina a 40 mg/L (concentração similar à do sangue humano), sendo levados à agitação em um *shaker* à temperatura ambiente, durante 4 horas, tempo médio de uma sessão de hemodiálise. As concentrações das soluções de albumina foram determinadas no início e após o contato com as membranas, realizando-se a leitura da absorbância a 278 nm e fazendo-se a correlação com a curva de calibração pré-determinada (Anexo B).

A quantidade de albumina adsorvida, em mg de albumina por mg de membrana, foi determinada por diferença de concentração, considerando-se o volume de solução utilizado, através da Equação 5.6.

$$\text{Adsorção de albumina} = \left( \frac{m_i - m_f}{m_{\text{membrana}}} \right) \quad (\text{Equação 5.6})$$

$m_i$  é a massa inicial de albumina em solução

$m_f$  é a massa de albumina em solução após o tempo de contato com a membrana

#### 5.5.6. Análise da hemocompatibilidade

A hemocompatibilidade é uma das mais importantes propriedades dos materiais que possuem aplicação em contato com o sangue. Portanto, as interações adversas entre o material desenvolvido e o sangue deve ser avaliada a fim de prevenir a ativação e destruição de componentes do sangue durante a utilização (WEBER *et al.*, 2018).

A hemocompatibilidade de equipamentos médicos que possuem contato com sangue deve ser avaliada conforme a norma ISO 10993 – 4 (2017), que trata da seleção de testes que devem ser executados em equipamentos médicos e dentários cuja aplicação envolve o contato com o sangue. Esta norma contém cinco parâmetros de avaliação da hemocompatibilidade do material: adesão plaquetária, trombogenicidade,

avaliação hematológica, coagulação e sistema complemento. Nesta tese, foram realizadas análises relacionadas a esses parâmetros, todas *in vitro*, através de testes de tempo de protrombina e de tromboplastina parcial ativada (parâmetro de coagulação), hemólise (parâmetro de avaliação hematológica), adesão de plaquetas (parâmetro adesão plaquetária e trombogenicidade) e sistema complemento C3 e C4 (sistema complemento).

Para a realização dessas análises, foi necessária a submissão de um projeto para apreciação e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), nos termos da Resolução n. 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), segundo a qual todo e qualquer projeto de pesquisa relativo a seres humanos, seja direta ou indiretamente, deve ser submetido à apreciação de um CEP. O projeto foi aprovado para realização das análises em 02/09/2018 e o parecer aprovando a realização dos testes é apresentado no ANEXO C.2.

As análises de hemocompatibilidade foram realizadas no Laboratório de Diagnósticos de Doenças Complexas e Terapia Celular/Hematologia Clínica (LADITEC), da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). O LADITEC é um dos laboratórios que compõem o Centro de Diagnósticos Complexos – CDC da UFAL, responsável por fornecer serviços de diagnósticos de alta complexidade em biologia molecular para todo o estado de Alagoas e região próxima, sendo o LADITEC responsável pelos diagnósticos citogenéticos e moleculares na área de oncohematologia.

Todas as análises de hemocompatibilidade foram realizadas com membranas planas sintetizadas a partir de solução polimérica de mesma composição utilizada na síntese das fibras ocas utilizadas nesse estudo (solução polimérica composta por 12% de PEI, 05% de PVP e banho de coagulação composto por água desmineralizada e NMP na proporção de 1:1).

#### *5.5.6.1. Tempo de protrombina (TP)*

A coagulação sanguínea pode ser definida como a conversão de uma proteína solúvel do plasma, conhecida como fibrinogênio, em um polímero insolúvel, chamado de fibrina. Esse processo ocorre pela ação de uma enzima, a trombina. Envolve uma série de reações de conversão de pró-enzimas em enzimas, ambas denominadas fatores de coagulação (as enzimas são os fatores de coagulação ativados e as pró-

enzimas, os fatores antes de ativação) (CAGNOLATI *et al.*, 2017). Esses fatores são representados por algarismos romanos e a forma ativada respectiva, pelo número romano seguido da letra a.

A formação de fibrina pode ocorrer por dois princípios, a via intrínseca ou a via extrínseca, que se encontram em certo ponto, formando a via comum. O TP avalia o funcionamento adequado da via extrínseca de coagulação, que envolve os fatores VII, X, V, II e I (fibrinogênio).

A análise do tempo de protrombina foi realizada utilizando o kit TP, da Bioclin, o qual consiste na medida do tempo de coagulação após a adição do fator III (fonte de tromboplastina) e cálcio (reagente 1 do kit). Há, então, a ativação do fator VII, com formação de um complexo chamado FT – FVIIa, o qual ativa os fatores IX e X. O fator Xa, junto com os fosfolípidos do fator tissular, fator Va e Cálcio formam o complexo ativador de protrombina, o que faz a protrombina (fator II) se transformar em trombina (fator IIa). A trombina atua sobre o fibrinogênio, transformando-o em fibrina, formando o coágulo.

Quando há ativação do fator X em Xa, acaba a via extrínseca da coagulação e inicia-se a via comum, que leva à formação da rede de fibrina.

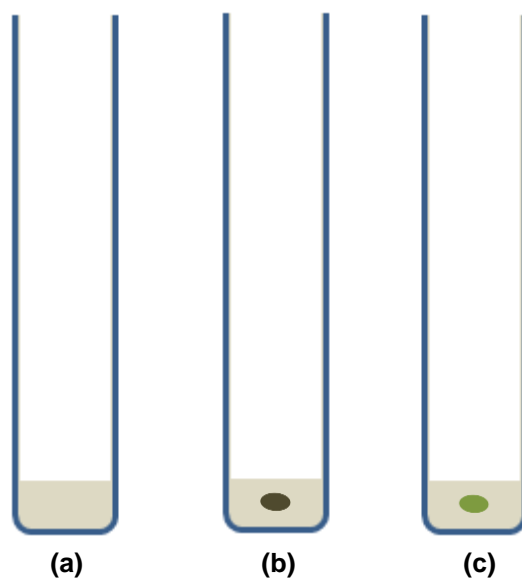
Para a realização do teste, foram coletados 5 mL de sangue, em citrato de sódio, de seis doadores voluntários, maiores de 18 anos, aparentemente saudáveis e sem história prévia de qualquer tipo de doença hemorrágica ou trombótica. Todos os doadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). O TCLE é a fonte de esclarecimento sobre a pesquisa e que garante os direitos aos participantes da pesquisa. O modelo de TCLE utilizado neste estudo é apresentado no Anexo C.3.

O sangue coletado foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos, à temperatura ambiente, na centrífuga refrigerada da Cientec, modelo CT – 5000 R. Em seguida, o plasma (conteúdo sobrenadante) foi retirado, preparando-se um *pool* de plasma (mistura dos plasmas coletados). Os *pools* foram acondicionados em *ependorfs* de 2 mL e a quantidade não utilizada imediatamente no teste foi mantida sob refrigeração a -20°C.

O reagente 1, foi, então, pré-aquecido a 37°C, em banho maria da Fanem, modelo 1100, durante 4 a 5 minutos. Em um tubo de ensaio de vidro limpo, foram pipetados 100 µL do plasma a ser medido, o qual foi incubado a 37°C, durante 2 a 3 minutos, no mesmo banho maria. Após esse tempo, 200 µL do reagente 1,

homogeneizado, foi adicionado ao tubo contendo o plasma e, nesse instante, foi disparado o cronômetro. O tubo foi recolocado no aquecimento, sendo agitado vagarosamente. Após 9 segundos, o tubo foi retirado do banho e observou-se a formação do coágulo. O cronômetro foi parado imediatamente ao se observar formação do coágulo, registrando-se o tempo de coagulação. Através dessa metodologia, obtém-se o tempo de protombina do controle negativo.

Para avaliar a influência das membranas no tempo de protombina, o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado com uma modificação na etapa de incubação do plasma a 37°C. Neste caso, o plasma foi incubado junto com um pedaço de membrana circular de 0,5 cm de diâmetro. Um esquema da montagem dos tubos, conforme utilizado nos testes, é apresentado na Figura 5.13.



**Figura 5.13.** Esquema da realização dos testes de tempo de protombina (a) Controle negativo (b) Plasma + Membrana antes da funcionalização (c) Plasma + Membrana após a funcionalização.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 5.5.6.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

Conforme descrito no item 5.5.6.1, a coagulação (ou formação de fibrina) pode ocorrer por dois princípios: a via intrínseca ou a via extrínseca. O TTPA avalia o funcionamento da via intrínseca da coagulação, que envolve os fatores XI, IX, VIII, X, V, II e I. Por essa via, que ocorre pelo sistema de contato, há ativação do fator XII, que faz



com que o fator XI seja ativado em XIa. Este, por sua vez, transforma o fator IX em IXa, que ativa o X em Xa. Neste ponto, a via intrínseca é finalizada e inicia-se a via comum, quando o fator Xa, juntamente com o cálcio, o fosfolípídeo e fator Va transformam a protrombina em trombina. O fibrinogênio é transformado em monômeros de fibrina, os quais se unem formando a rede de fibrina (coágulo).

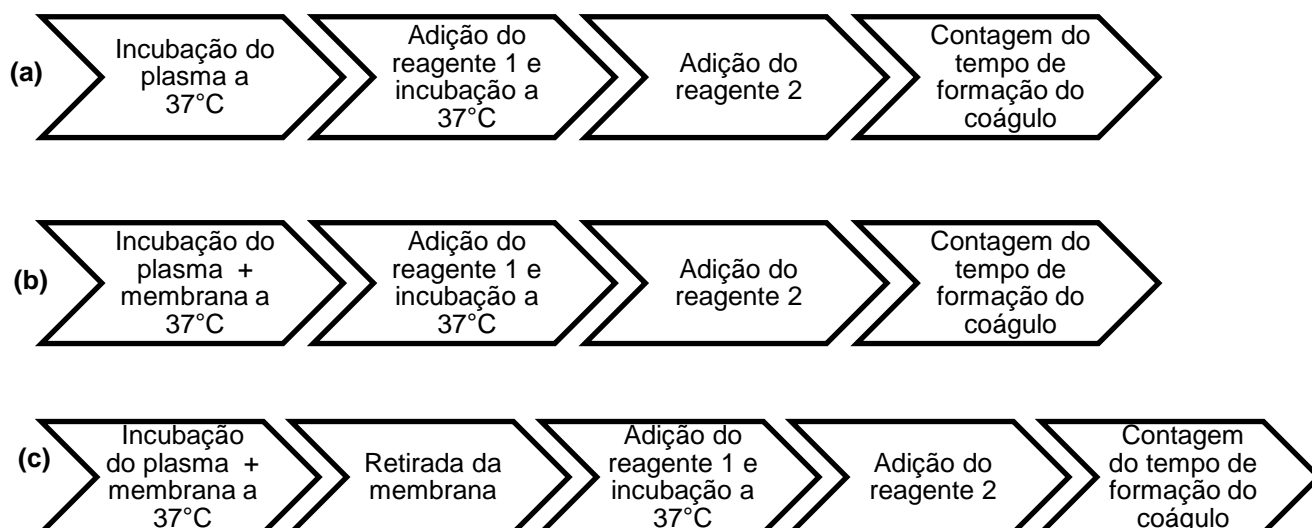
A análise do tempo de tromboplastina parcial ativada foi realizada utilizando o kit TTPA, da Bioclin, o qual consiste na determinação do tempo de coagulação do plasma citratado, após adição de dois reagentes: um contendo um ativador plasmático e fosfolípides (reagente 1), que atuam como substitutos das plaquetas; e outro contendo o formador de coágulo (cloreto de cálcio – reagente 2) para recalcificação, desencadeando o mecanismo de coagulação da via intrínseca.

Para a realização do teste, foi utilizado o *pool* de plasma obtido conforme descrito no item 5.5.6.1.

100 µL do *pool* de plasma foi adicionado a um tubo de ensaio de vidro limpo e levado para preaquecimento a 37°C em banho-maria, no mesmo banho utilizado na análise de TP, durante 2 a 3 minutos. Após esse tempo de incubação, 100 µL do reagente 1 foi pipetado ao plasma pré-aquecido, mantendo-se essa mistura incubada a 37°C por mais 2 a 3 minutos. Então, 100 µL do reagente 2, pré-aquecido a 37°C, foi adicionado ao conjunto anterior e, nesse instante, foi disparado o cronômetro. O tubo foi recolocado no aquecimento, sendo agitado vagarosamente. Após aproximadamente 20 segundos, o tubo foi retirado do banho e observou-se a formação do coágulo. O cronômetro foi parado imediatamente ao se observar formação do coágulo, registrando-se o tempo de coagulação. Assim, obtém-se o tempo de tromboplastina parcial ativada do controle negativo.

Para avaliar a influência das membranas no TTPA, o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado, porém o plasma foi incubado a 37°C juntamente com um pedaço de membrana circular de 0,5 cm de diâmetro, conforme esquematizado na Figura 5.13.

Para o caso do TTPA, também foi realizado o seguinte desenho experimental: o plasma foi incubado com amostras das membranas durante 2 a 3 min, a 37°C e, antes de adicionar o reagente 1, a membrana foi retirada do tubo contendo o plasma, seguindo-se o mesmo passo a passo descrito anteriormente. Esse experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a possibilidade de liberação de heparina pela membrana funcionalizada. Na Figura 5.14 são apresentados os passos executados nas análises de TTPA.



**Figura 5.14.** Passo a passo nas análises de TTPA (a) Controle negativo (b) Amostras das membranas antes e após a funcionalização e (c) Avaliação da liberação de heparina pela membrana.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

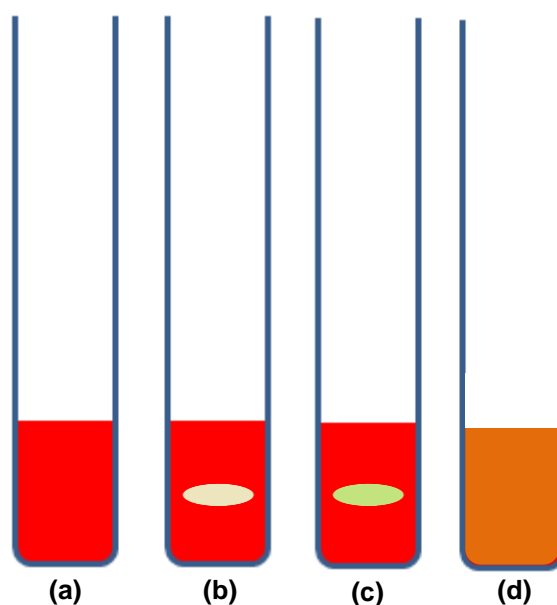
### 5.5.6.3. Hemólise

A hemólise é a ruptura dos eritrócitos, acompanhada da liberação de hemoglobinas por ruptura da membrana plasmática. Um aumento na concentração de hemoglobina livre no plasma é um indicador direto da destruição dos eritrócitos, fato associado à redução do transporte de oxigênio aos tecidos e órgãos; o aumento dos níveis de hemoglobina livre também pode induzir toxicidade ou alterar a função renal (QIAN *et al.*, 2010; WEBER *et al.*, 2018). Por isso a importância de avaliar se um material cuja aplicação é o contato com sangue tem potencial para causar hemólise. A hemólise pode ocorrer, por exemplo, quando o sangue entra em contato com a água, que é uma solução hipotônica, pelo fato de ter maior atividade na solução externa e, conseqüentemente, difundir-se pelo interior da hemácia. Isso provocará seu inchamento e, posteriormente, sua ruptura. Também há probabilidade de ocorrer hemólise caso o sangue seja estocado em temperaturas muito altas ou muito baixas, bem como nos casos de coleta inadequada do sangue.

Para avaliar a ocorrência de hemólise, foram coletados 5 mL de sangue, em citrato de sódio, de um doador voluntário, maior de 18 anos, aparentemente saudável e

sem história prévia de qualquer tipo de doença hemorrágica ou trombótica. Foi preparada uma solução de cloreto de sódio (0,9%) e sangue total a 5% a partir da mistura de 9,5 mL de soro fisiológico e 0,5 mL do sangue total. Essa mistura foi adotada como o controle negativo do teste de hemólise.

Amostras circulares de 1 cm de diâmetro das membranas, antes e após a imobilização de heparina, foram colocadas em um tubo de vidro limpo, ao qual adicionou-se 750  $\mu$ L da mistura do sangue total com soro fisiológico preparado conforme descrito anteriormente. As membranas foram previamente imersas em solução de cloreto de sódio (0,9%). Para o controle positivo do teste, foi adotada uma solução preparada com água estéril e sangue total, a uma concentração 5%. Na Figura 5.15 é apresentado um esquema da montagem do teste de hemólise.



**Figura 5.15.** Esquema de montagem do teste de hemólise (a) Controle negativo: Soro fisiológico + Sangue total a 5% (b) Soro fisiológico + Sangue total a 5% + Membrana antes da funcionalização (c) Soro fisiológico + Sangue total a 5% + Membrana após a funcionalização (d) Controle positivo: Água Estéril + Sangue total a 5%

Após homogeneização dos conteúdos, os mesmos foram mantidos em banho maria a 37°C durante 1 hora e, após incubação, os tubos foram levados para centrifugação a 1000 giros durante 10 minutos.

Então, foram lidas as absorvâncias do sobrenadante de cada tubo, a 540 nm, em um leitor de microplacas de modo múltiplo *FlexStation*, da *Molecular Devices*. A porcentagem de hemólise é dada pela Equação 5.7:

$$\%Hemólise = \frac{abs_{amostra} - abs_{negativo}}{abs_{positivo}} \times 100 \quad (\text{Equação 5.7})$$

$abs_{amostra}$  é a absorbância do sobrenadante do tubo contendo a membrana

$abs_{negativo}$  é a absorbância do controle negativo

$abs_{positivo}$  é a absorbância do controle positivo

Amostras com percentagem de hemólise inferiores a 5% foram consideradas não hemolíticas. A metodologia experimental utilizada foi adaptada de Almeida (2000) e de Valadares *et al.* (2012).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 5.5.6.4. Adesão de Plaquetas

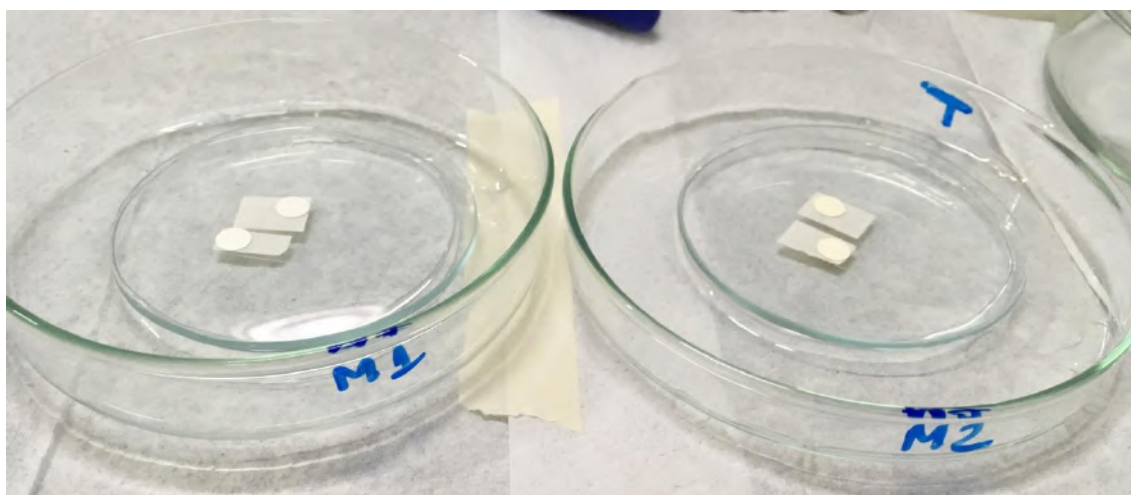
Plaquetas sanguíneas (ou trombócitos) são elementos do sangue não-nucleados, com formato de disco e com uma membrana muito frágil, presentes em grande quantidade no sangue em condições fisiológicas. A função das plaquetas está relacionada à coagulação do sangue e sua adesão a uma superfície exposta a um fluxo sanguíneo é a primeira e crítica reação de formação de trombo *in vivo*.

O contato do sangue com superfícies estranhas leva à adsorção de proteínas do plasma, como fibrinogênio, imunoglobulinas, fator XI e XII, que induzem a adesão de plaquetas (WEBER *et al.*, 2018). A adesão de plaquetas durante a hemodiálise pode causar trombose no dialisador. O fibrinogênio do plasma, ao ligar-se à membrana e causar adesão de plaquetas e ativação, enquanto o sangue escoar no dialisador, pode impactar a coagulação independentemente da composição química da membrana utilizada (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013).

Para as análises de adesão de plaquetas, foram coletados 5 mL de sangue humano em citrato de sódio, de um doador voluntário, maior de 18 anos, aparentemente saudável e sem história prévia de qualquer tipo de doença hemorrágica ou trombótica. O sangue coletado foi levado para centrifugação a 1000 rpm durante 15 minutos, à temperatura ambiente, na centrífuga refrigerada da Cientec, modelo CT – 5000 R.

Assim, as células vermelhas foram separadas e foi obtido um plasma rico em plaquetas (PRP).

Amostras circulares de 0,5 cm de diâmetro das membranas antes e após a funcionalização foram aderidas em lamínulas de vidro com o auxílio de uma fita dupla face. As lamínulas contendo as membranas foram acondicionadas em vidros de relógio e colocadas em uma placa de Petri contendo água, conforme montagem apresentada na Figura 5.16.



**Figura 5.16.** Esquema da montagem das membranas para a análise de adesão de plaquetas. Na imagem, M1 refere-se à membrana antes da modificação superficial, enquanto M2 refere-se à membrana após a funcionalização com heparina.

O conjunto contendo lamínulas, vidro de relógio e placa de Petri foi levado à estufa a 37°C durante 15 minutos para umidificação das membranas. Em seguida, as amostras das membranas foram totalmente recobertas com o PRP e novamente levadas à estufa a 37°C, durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução salina 0,2 M e imersas em solução de glutaraldeído 2,5% durante 15 horas em temperatura ambiente, para a fixação das plaquetas aderidas. Por fim, as membranas foram desidratadas em solução etanol em concentrações crescentes: 50% durante 5 minutos, 75% durante 10 minutos e 95% durante 15 minutos.

Após a secagem das membranas, as plaquetas aderidas foram observadas através da análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), no microscópio de transmissão e varredura Jeol 200FX, localizado no Laboratório Multiusuário de

Microscopia Eletrônica e Microanálise, do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM). Para isso, foi necessária a metalização das amostras, através do recobrimento com uma camada de ouro de aproximadamente 300 Å, em um metalizador do tipo *sputtering* (Quorum Q150RES).

#### 5.5.6.5. Sistema Complemento

O sistema complemento constitui um importante medidor da resposta inflamatória quando do contato do sangue com materiais e sua ativação serve como um índice da biocompatibilidade do material avaliado (HAKIM, 1993). O sistema complemento é composto por proteínas normalmente presente em sua forma inativa e que podem ser ativadas rapidamente após a influência de um estímulo específico, como a presença de agentes infecciosos ou materiais estranhos.

O nível de ativação do complemento produzido por uma membrana pode ser quantificado pela produção de anafilatoxinas C5a, C4a e C3a. Nesta tese, foram avaliados os níveis de ativação do complemento C3 e C4 pelas membranas antes e após a funcionalização com heparina, comparando-se os valores obtidos com valores de referência.

Para a análise, foram coletados 5 mL de sangue humano de um doador voluntário, maior de 18 anos, aparentemente saudável e sem história prévia de qualquer tipo de doença hemorrágica ou trombótica. O sangue foi coletado sem anticoagulante, incubado a 37°C durante 1 hora e, em seguida, foi centrifugado a 2000 giros durante 20 minutos para separar o soro, seguindo a metodologia proposta por Liu *et al* (2005).

Amostras circulares das membranas, com 0,5 cm de diâmetro, foram então imersas em 2 mL do soro obtido e o conjunto foi incubado a 37°C durante 1 hora. As concentrações dos componentes do complemento C3 e C4 no soro foram determinadas utilizando kits específicos da Abbott Architect, os quais medem o aumento da turbidez da amostra causado pela formação de complexos imunes insolúveis quando o anticorpo C3/C4 é adicionado à amostra (método imunoturbidimétrico).

As análises foram realizadas em triplicata.

# CAPÍTULO 6 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS OCAS DE POLI(ÉTER IMIDA) PARA HEMODIÁLISE

*Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões referentes à síntese e caracterização de membranas do tipo fibras ocas, em relação à morfologia e propriedades de transporte (permeabilidade hidráulica, rejeição de solutos urêmicos, lisozima e albumina e Remoção de ureia). Além disso, serão apresentados os resultados de adsorção de proteínas (albumina) na superfície das fibras sintetizadas, bem como das membranas de uso clínico atual na hemodiálise.*

## 6.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA

As membranas sintetizadas foram caracterizadas em relação à morfologia, através de microscopia eletrônica de varredura, observando as seções transversais (ST) e as superfícies externas (SE) e internas (SI) das fibras ocas.

Foram avaliados os efeitos da composição de solução polimérica em relação à quantidade do polímero PEI e do aditivo PVP e da composição do líquido interno nas características morfológicas das fibras ocas sintetizadas. Foram realizadas oito condições de fiação, mantendo-se fixos o banho externo de precipitação e a distância extrusora-banho, adaptando-se as demais variáveis (vazão de solução polimérica, velocidade de fiação) para obtenção da fibra sem deformação do seu canal interno. Em trabalhos anteriores deste laboratório, já foi demonstrado que, para o sistema PEI/PVP/NMP/água, a vazão da solução polimérica na fiação apresenta pouca influência na determinação da morfologia e das propriedades de transporte, havendo apenas alteração nas dimensões das mesmas (CARVALHO, 2005).

As diferentes condições de síntese das fibras ocas, bem como a nomenclatura adotada para cada condição são apresentadas na Tabela 6.1.

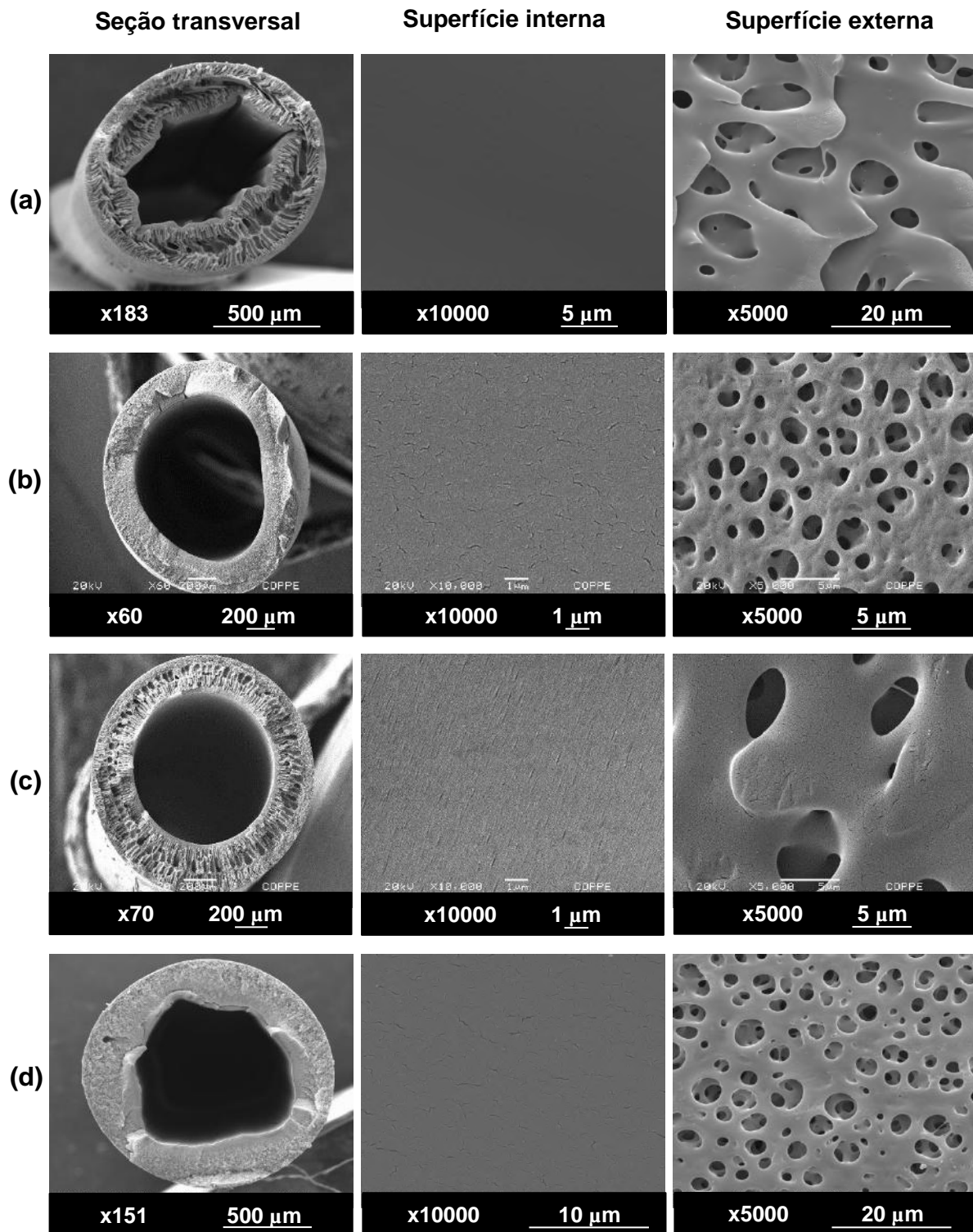
**Tabela 6.1.** Nomenclatura e respectivas variáveis de síntese das fibras ocas.

Nomenclatura	PEI (%)	PVP (%)	Líquido interno
F1205A	12	05	Água
F1205AN	12	05	Água:NMP (1:1)
F1210A	12	10	Água
F1210N	12	10	Água:NMP (1:1)
F1505A	15	05	Água
F1505AN	15	05	Água:NMP (1:1)
F1510A	15	10	Água
F1510AN	15	10	Água:NMP (1:1)

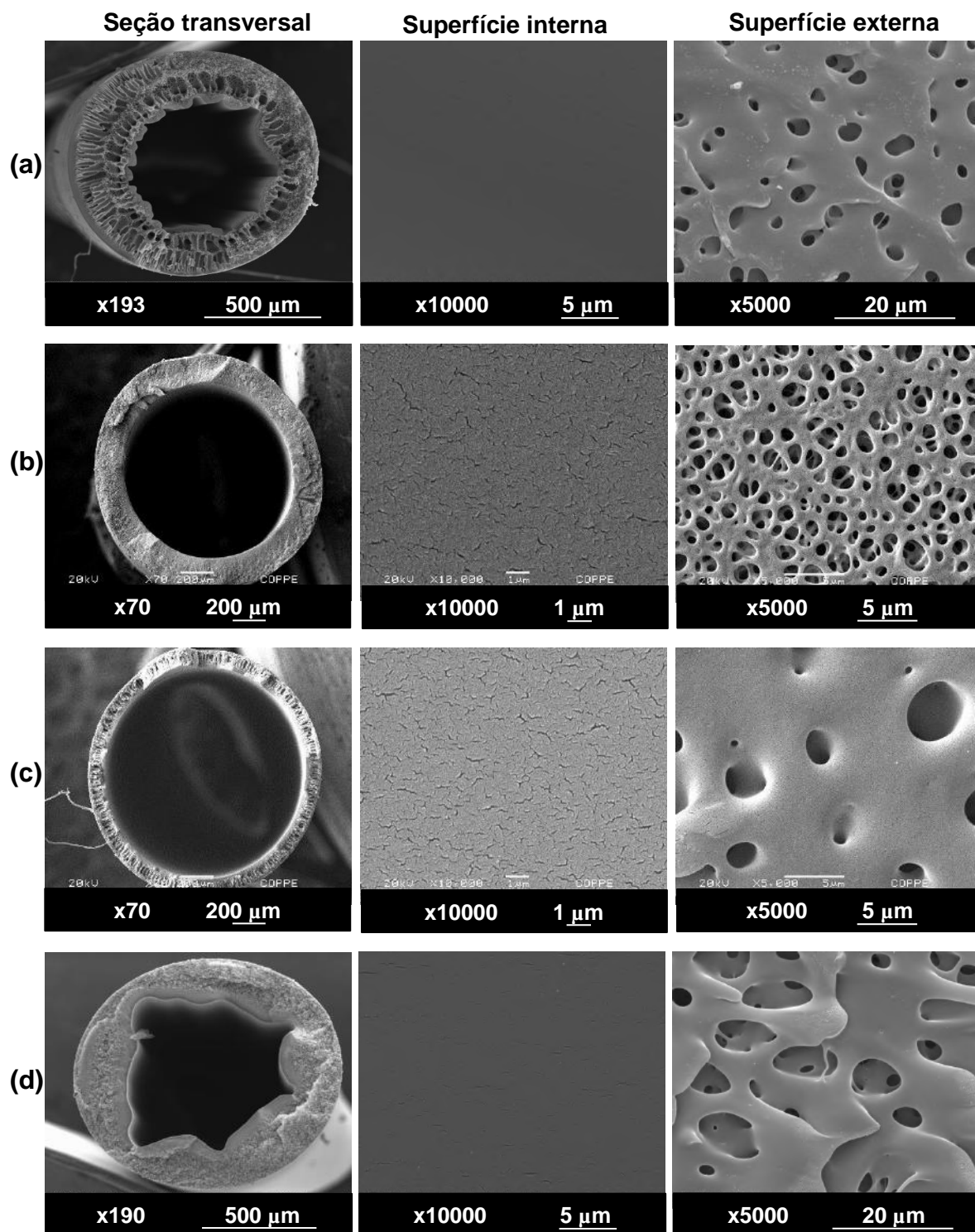
A Figura 6.1 apresenta as fotomicrografias das fibras ocas sintetizadas utilizando água desmineralizada como líquido interno, enquanto a Figura 6.2 apresenta as fotomicrografias das fibras ocas sintetizadas utilizando uma mistura de água e NMP (1:1) como líquido interno, após secagem através do procedimento de imersão em banho de água:glicerol (10:1).

Conforme podemos observar na Figura 6.1, o aumento na concentração de PVP na solução polimérica resultou em fibras com morfologias sem macrovazios (poros gigantes). O mesmo fenômeno foi observado quando o líquido interno foi uma mistura de solvente (água) e não solvente (NMP), como pode ser visualizado na Figura 6.2. Carvalho (2005) observou o mesmo efeito também em membranas de poli(éter imida), o qual pode ser explicado pelo fato de o aumento da concentração de PVP diminuir a região de miscibilidade do sistema. Com essa redução da região de miscibilidade, a fibra extrusada torna-se mais sensível a perturbações proporcionadas pela entrada de água, impedindo o crescimento dos núcleos da fase diluída em polímero e, como consequência, há o desfavorecimento da formação de macrovazios. Zhang *et al.* (2017) também observaram a supressão de formação de macrovazios em membranas de PEI com o aumento da concentração de PVP na solução polimérica. Os autores justificaram que isso ocorreu devido à diminuição do tempo de separação líquido-líquido, ocasionada pelo aumento da viscosidade da solução polimérica.





**Figura 6.1.** Fotomicrografias das membranas do tipo fibras ocas sintetizadas com diferentes soluções poliméricas, utilizando água desmineralizada como líquido interno: (a) F1205A (b) F1210A (c) F1505A (d) F1510A.



**Figura 6.2.** Fotomicrografias das membranas do tipo fibras ocas sintetizadas com diferentes soluções poliméricas, utilizando água desmineralizada e NMP (1:1 v/v) como líquido interno: (a) F1205AN (b) F1210AN (c) F1505AN (d) F1510AN.

Além disso, o aumento da concentração do PVP parece aumentar a formação de poros interconectados, indicando o favorecimento de separação espinodal, quando

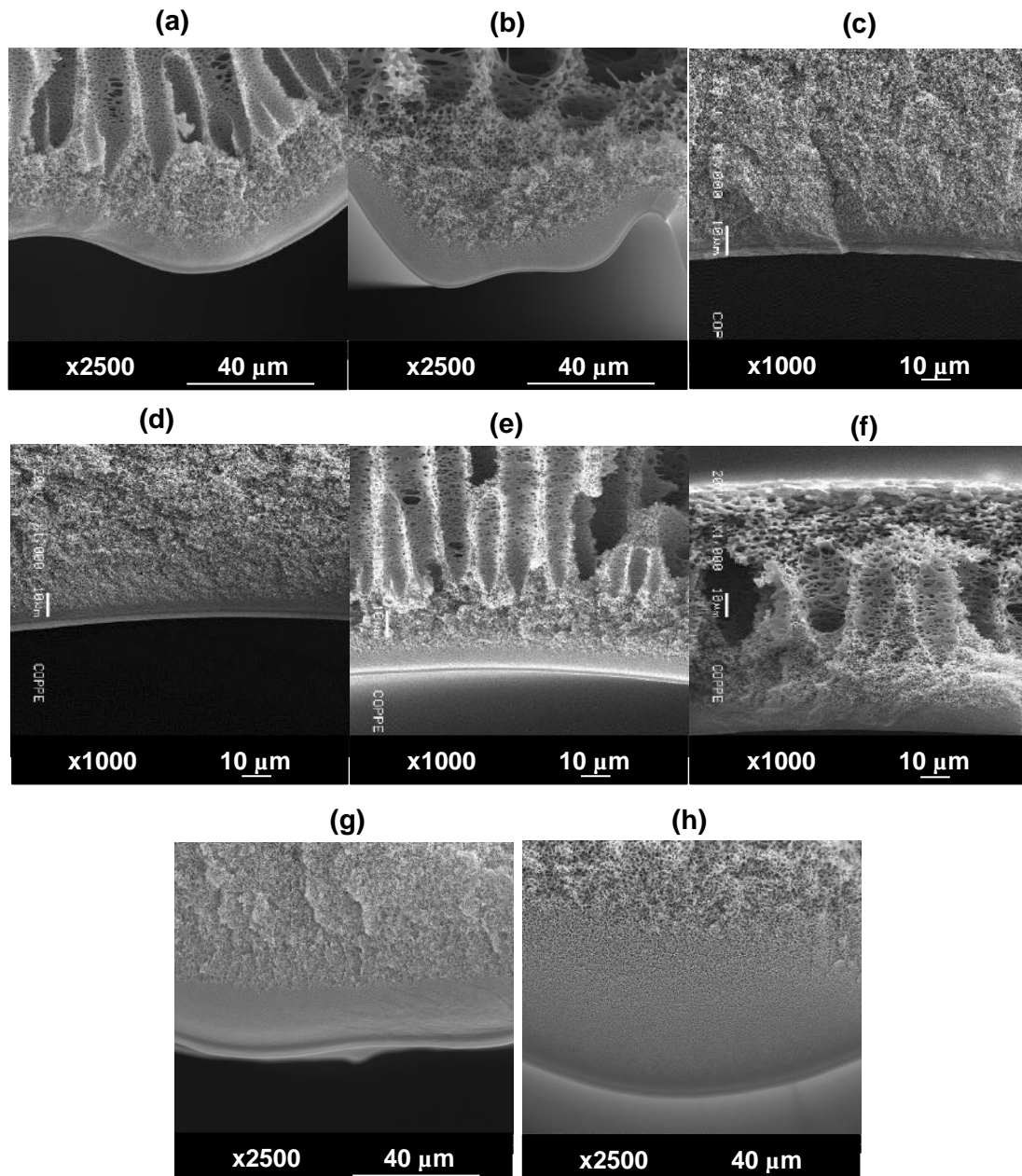
há separação líquido-líquido rápida, espontânea em pequenas regiões interconectadas de alta e baixa concentração de polímero. Em geral, a morfologia de membranas formadas pelo mecanismo de separação espinodal é caracterizada pela presença de poros com alto grau de interconectividade, o que está de acordo com o observado nas Figuras 6.1 e 6.2. O aumento da concentração de polímero na solução polimérica resultou no favorecimento da formação de poros, provavelmente por permitir à solução uma composição inicialmente estável, que pode ser levada diretamente à região de instabilidade, sem que haja formação de núcleos, o que é típico da separação espinodal (CARVALHO, 2005). Além disso, suprimiu a ocorrência de expansão viscoelástica da solução polimérica na saída da extrusora, fenômeno conhecido como *die-swell*. A ocorrência de *die-swell* é influenciada pelas vazões de solução polimérica e de líquido interno, pela distância da extrusora ao banho de precipitação, viscosidade do líquido interno e pela velocidade de fiação.

Neste caso, conforme observado também por Pereira *et al.* (2000), o aumento da viscosidade da solução polimérica, devido ao aumento da concentração de polímero, foi responsável por minimizar os efeitos da expansão viscoelástica, levando à redução da transferência de massa entre a solução polimérica e o banho de coagulação. Dessa forma, ocorre a precipitação com atraso, o que proporciona tempo suficiente para acomodar as tensões devido à expansão viscoelástica e, portanto, a deformação perimetral interna é inibida.

Em relação à composição do líquido interno, observou-se que as fibras preparadas a partir da solução utilizando água desmineralizada como líquido interno (Figura 6.1) apresentaram uma superfície interna composta por uma pele densificada e superfície externa porosa, indicando uma estrutura anisotrópica. Quando o líquido interno é o coagulante puro (água), a diferença de potencial químico entre os meios extrusados simultaneamente é máxima e, portanto, há uma perda rápida de solvente quando a fibra entra em contato com o líquido interno na saída da extrusora. Dessa forma, a precipitação do lado interno do filme inicia-se instantaneamente, devido ao rápido processo de transferência de massa, formando uma camada interfacial concentrada em polímero. Essa camada mais densa gera uma resistência à transferência de massa entre banho de não solvente e solução polimérica, resultando em subcamadas porosas, devido à precipitação mais lenta.

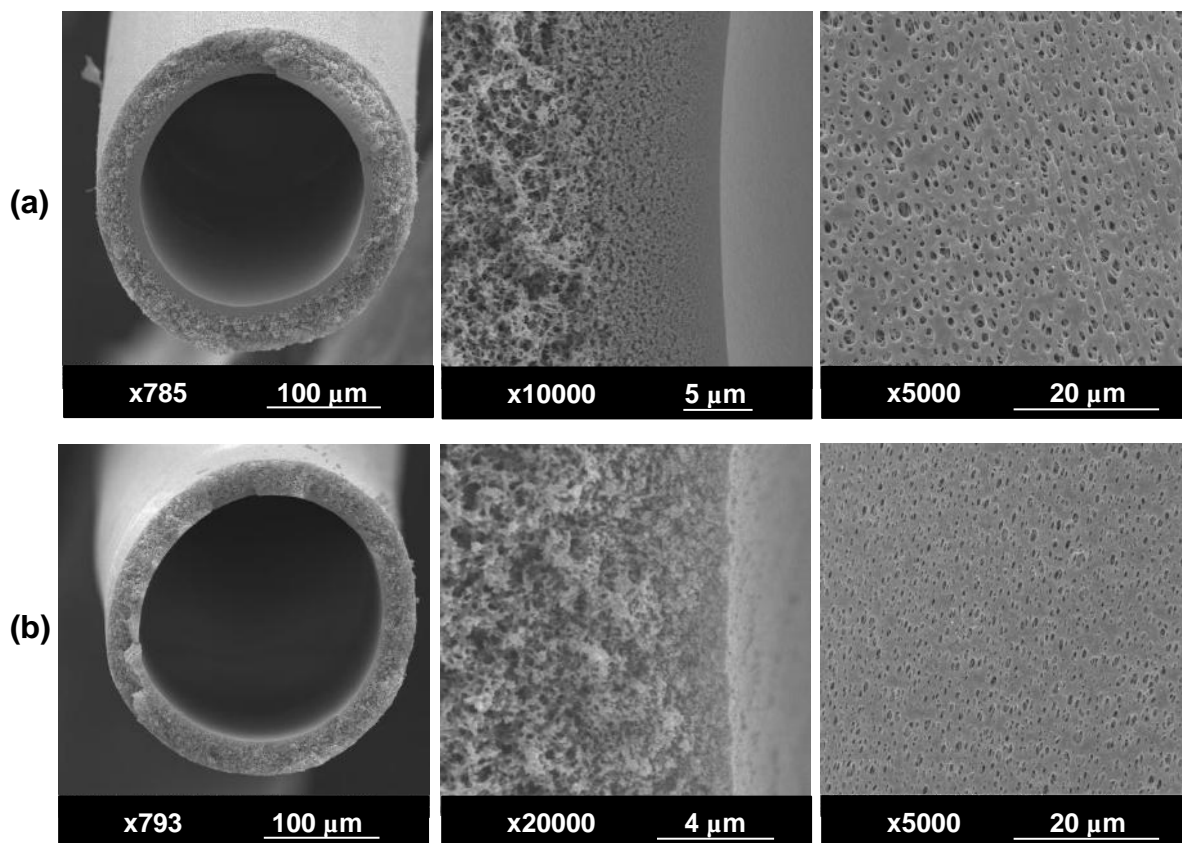
Com a adição do solvente NMP no líquido interno, esperava-se que a superfície interna das fibras se tornasse mais porosa, porque o fluxo de solvente da fase da solução polimérica para a fase coagulante é reduzido na presença de solvente (NMP) no coagulante. Como consequência, uma grande quantidade de NMP permanece na

interface polímero/coagulante, evitando a formação de camada de pele densa, conforme observado por Othman *et al.* (2017). Entretanto, mesmo em concentração significativa (1:1 v/v), a pele densa continua sendo formada, porém com menor espessura, o que ainda está de acordo com o proposto por Othman e colaboradores. A superfície externa porosa forma-se em função da entrada de água da atmosfera durante o tempo de exposição. Na Figura 6.3 observa-se em detalhe a pele densa interna de todas as fibras sintetizadas.



**Figura 6.3.** Detalhe da pele interna densa de todas as fibras sintetizadas (a) F1205A (b) F1205AN (c) F1210A (d) F1210AN (e) F1505A (f) F1505AN (g) F1510A (h) F1510AN.

Em geral, a morfologia final das fibras sintetizadas, composta por uma superfície interna densificada e uma superfície externa porosa é similar à morfologia de membranas de uso clínico de hemodiálise, conforme anteriormente discutido no Capítulo 2. Na Figura 6.4 são apresentadas fotomicrografias de duas fibras ocas de hemodiálise comerciais, uma de polissulfona (PSf) e outra de poli(éter sulfona) (PES), as quais foram utilizadas para comparação de propriedades com as membranas de PEI propostas neste trabalho.



**Figura 6.4.** Fotomicrografias de fibras ocas de uso clínico de hemodiálise (a) PSf (b) PES.

Apesar da similaridade na morfologia, as fibras comerciais de hemodiálise apresentam menores diâmetros externos que os diâmetros das fibras sintetizadas neste trabalho, bem como quanto aos valores de espessura da pele densa interna e de tamanho de poros na superfície externa, conforme podemos verificar pelos dados apresentados na Tabela 6.2. Essa diferença nos diâmetros das fibras resultaria em dialisadores de maior volume para uma mesma área de transferência de massa. Além disso, como os diâmetros internos das fibras sintetizadas também são maiores que os

diâmetros internos das fibras comerciais (aproximadamente 3 a 5 vezes maiores), o volume inicial de sangue (*priming*) necessário para o preenchimento do dialisador seria mais elevado. A retirada de um grande volume de sangue do paciente de hemodiálise pode levar à hipovolemia, principalmente em crianças e adultos de pequena estatura (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013). O volume de *priming* de um dialisador comercial varia em torno de 75 a 200 mL (PAL, 2014) e, supondo um dialisador de 1 m<sup>2</sup>, o diâmetro interno máximo para que o *priming* esteja dentro dessa faixa é de 0,8 mm. Dessa forma, entre as membranas sintetizadas, apenas a F1205A, F1205AN e F1510AN estariam adequadas para utilização. Para a obtenção de fibras com menores diâmetros, modificações nas condições de síntese poderiam ser realizadas, como a confecção de extrusora com dimensões menores e aumento da distância entre banho e extrusora.

Os valores apresentados na Tabela 6.2 foram obtidos a partir da análise por microscopia eletrônica de varredura e podem embutir erros inerentes ao processo de preparo das amostras (ruptura em nitrogênio líquido) e da medição efetuada no próprio equipamento, porém são importantes para mostrar a ordem de grandeza das características das fibras.

**Tabela 6.2.** Comparação entre as dimensões das fibras sintetizadas e comerciais.

<b>Membrana</b>	<b>D<sub>externo</sub> (mm)</b>	<b>Espessura de parede (µm)</b>	<b>Diâmetro do poro (µm)*</b>
<b>F1205A</b>	1,13 ± 0,07	253,3 ± 59,82	4,60 ± 4,00
<b>F1205AN</b>	0,99 ± 0,07	215,40 ± 36,61	2,72 ± 0,76
<b>F1210A</b>	1,40 ± 0,04	223,2 ± 47,76	1,78 ± 0,84
<b>F1210AN</b>	1,29 ± 0,07	174 ± 20,91	1,24 ± 0,49
<b>F1505A</b>	1,32 ± 0,06	252 ± 38,89	4,01 ± 1,17
<b>F1505AN</b>	1,35 ± 0,03	100 ± 18,84	3,57 ± 1,21
<b>F1510A</b>	1,44 ± 0,06	277,30 ± 34,44	2,40 ± 1,07
<b>F1510AN</b>	1,13 ± 0,05	231,92 ± 22,74	1,19 ± 0,49
<b>Clínica PES</b>	0,26 ± 0,01	28,43 ± 1,16	0,50 ± 0,07
<b>Clínica PSf</b>	0,28 ± 0,01	49,77 ± 3,70	0,88 ± 0,20

\*Refere-se ao diâmetro do poro observado na superfície externa das fibras.

## 6.2. PROPRIEDADES DE TRANSPORTE

As fibras sintetizadas foram caracterizadas quanto às suas propriedades de transporte em relação à permeabilidade hidráulica, rejeição aos solutos urêmicos, através de testes de ultrafiltração e testes de diálise para determinação da Remoção de ureia.

### 6.2.1. Permeabilidade hidráulica

A permeabilidade hidráulica das membranas foi medida utilizando-se água destilada, acoplado-se os módulos de permeação confeccionados ao sistema esquematizado na Figura 5.8. Os testes foram realizados a temperatura ambiente, após compactação na pressão de 1 bar. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.3, a qual contém, além das permeabilidades hidráulicas das fibras sintetizadas, as permeabilidades das fibras de uso clínico de polissulfona e poli(éter sulfona), medidas utilizando o mesmo procedimento, através da confecção de um módulo de permeação de área de superfície similar aos demais, conforme descrito no Capítulo 6.

**Tabela 6.3.** Permeabilidades hidráulicas das fibras ocas sintetizadas e de fibras comerciais de hemodiálise.

<b>Membrana</b>	<b>Permeabilidade hidráulica (L/h.m<sup>2</sup>.bar)</b>
<b>F1205A</b>	56,9 ± 2,7
<b>F1205AN</b>	104,4 ± 2,5
<b>F1210A</b>	6,1 ± 2,3
<b>F1210AN</b>	7,1 ± 1,5
<b>F1505A</b>	43,0 ± 1,8
<b>F1505AN</b>	67,4 ± 2,1
<b>F1510A</b>	18,8 ± 1,4
<b>F1510AN</b>	42,6 ± 1,6
<b>Clínica de PSf</b>	8,2 ± 1,2
<b>Clínica de PES</b>	137,5 ± 0,8

Avaliando os dados apresentados na Tabela 6.3, observamos que a mudança do líquido interno para a mistura água:NMP (1:1 v/v) resultou em um aumento da permeabilidade hidráulica, o que pode estar associado à redução da espessura da parede das fibras, bem como da camada densificada interna, a qual é responsável pela resistência ao transporte. Tais valores de espessura podem ser consultados na Tabela 6.2.

O aumento na concentração do PVP na composição da solução polimérica resultou em uma redução da permeabilidade hidráulica, fato que é associado à sua retenção na matriz polimérica da fibra formada. Neste caso, em presença de água, o PVP residual levaria a um inchamento da fibra e conseqüente redução da interconectividade dos poros da mesma, aumentando a resistência ao transporte (SANTOS, 2014; CARVALHO, 2005). Este resultado vai de encontro ao observado por Kanagaraji *et al.* (2015), que sintetizaram membranas de poli(éter imida) e avaliaram a influência da concentração de PVP na solução polimérica. Os autores verificaram que, com o aumento da concentração de PVP, houve aumento progressivo da permeabilidade hidráulica das membranas, o que eles atribuíram ao aumento da hidrofiliabilidade e da porosidade e tamanho dos poros de suas membranas.

De modo geral, a adição de PVP na solução polimérica resulta em aumento do tamanho do poro e da porosidade da membrana e um aumento adicional do conteúdo de PVP pode suprimir a formação de macroporos e promover uma transição de estrutura para a morfologia porosa do tipo esponjosa. Entretanto, com altos teores de PVP, a camada de pele da membrana torna-se mais densa, levando à diminuição do fluxo, ou da permeabilidade hidráulica. Esta explicação parece ser válida para o presente estudo e foi observada em outros trabalhos reportados na literatura, como Zhang *et al.* (2017), Saljoughi *et al.* (2009) e Cranford *et al.* (1999).

O efeito da diminuição da composição de poli(éter imida) na solução polimérica não aparece muito claro quando avaliado isoladamente. O conjunto como um todo (concentração de aditivo, composição do líquido interno e dados da morfologia obtida, como espessura da parede e da pele) parece favorecer certas condições para a obtenção de permeabilidades hidráulicas menores ou maiores. É possível, então, obter membranas com características distintas, de alto ou baixo fluxo, manipulando-se as condições de síntese das membranas.

Em hemodiálise, raramente são reportados dados de permeabilidade hidráulica, porque a exposição das membranas ao sangue afeta o valor deste parâmetro. O coeficiente de ultrafiltração ( $K_{UF}$ ), definido através da Equação 2.15, é mais utilizado,



sendo obtido de modo similar à permeabilidade hidráulica, porém utilizando sangue bovino em experimentos *in vitro* e medindo-se a taxa de filtração em função da pressão. O coeficiente de ultrafiltração é uma propriedade do dialisador e não da membrana e é utilizado para classificar as membranas como sendo de baixo fluxo ou de alto fluxo ( $K_{UF} > 11,3 \text{ L/h bar}$ ) (OFSTHUN *et al.*, 2008). Em trabalho de 2005, Ward classificou membranas de alto fluxo como aquelas que possuem permeabilidade hidráulica entre 15 e 30 L/h.m<sup>2</sup>.bar.

Nestes testes, foram verificadas as permeabilidades das membranas comerciais de baixo fluxo (PSf) e de alto fluxo (PES) para comparação com as fibras sintetizadas. Observa-se da Tabela 6.3 que apenas as membranas F1210A e F1210AN são de baixo fluxo, com valores de permeabilidade hidráulica bem próximos aos da membrana clínica de PSf. As membranas de alto fluxo são as mais utilizadas nos tratamentos de hemodiálise, pois em geral elas apresentam maiores *clearances* de solutos de baixa massa molar, como a ureia, melhores remoções de moléculas de tamanho médio, e são associadas à redução potencial da morbidade e ao aumento das taxas de sobrevivência (TAN *et al.*, 2018; OSHVANDI *et al.*, 2014; BOURÈ e VANHOLDER, 2004; AMBALAVANAN *et al.*, 1999). Além disso, membranas de alta permeabilidade são indicadas para os tratamentos de hemofiltração e hemodiafiltração, modificações da hemodiálise que têm ganhado espaço em clínicas de diálise, conforme comentado anteriormente.

Segundo dados de uma pesquisa de mercado realizada pela *Fresenius Medical Care*, em 2014, aproximadamente 70% das membranas utilizadas em filtros dialisadores são de alto fluxo.

### **6.2.2. Rejeição de solutos urêmicos, lisozima e albumina**

Foram analisadas as rejeições dos solutos urêmicos creatinina, fosfato e vitamina B<sub>12</sub>, pois são produtos residuais eliminados do sangue durante a filtração renal e, conseqüentemente, durante a hemodiálise. De modo geral, o acúmulo de creatinina, produto da decomposição do metabolismo muscular, não está associado a efeito tóxico, entretanto o acúmulo de fosfato pode levar à osteodistrofia e a doenças cardiovasculares.

O fosfato é um soluto pequeno, com massa molecular em torno de 97 Da, mas comporta-se como um grande soluto, pois forma grandes agregados que não passam facilmente pela membrana porque ligam-se às proteínas. A vitamina B<sub>12</sub> não é uma

substância tóxica, mas é utilizada como marcador de moléculas com 1,7 nm de diâmetro.

Como resultado de rejeição de solutos urêmicos, não foi identificada retenção de nenhum dos três solutos (creatinina, fosfato e vitamina B<sub>12</sub>), de modo que a rejeição observada foi de 0% (a concentração do permeado foi a mesma concentração da alimentação), calculada utilizando a Equação 5.3. Não foram realizados testes de diálise com esses solutos, os resultados obtidos indicam que apenas o processo convectivo (ultrafiltração) é capaz de remover seu conteúdo do sangue, conforme desejado.

O teste de rejeição de solutos de média e alta massa molar foi realizado para verificar a adequabilidade das fibras sintetizadas ao processo de hemodiálise. Neste teste, a  $\beta_2$  – microglobulina foi representada pela lisozima, devido à proximidade entre suas massas molares, e as proteínas de alta massa molar foram representadas pela albumina.

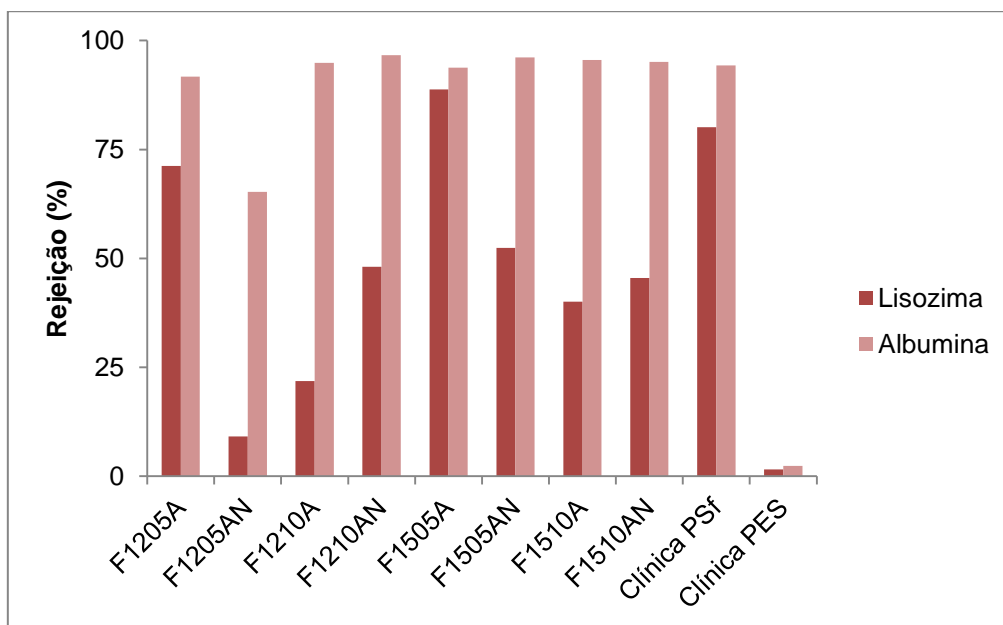
A  $\beta_2$  – microglobulina deve ser removida durante a hemodiálise porque seu acúmulo no organismo está associado à ocorrência de amiloidose secundária, uma complicação que contribui para a dor articular, a deformidade e a imobilidade e pode exacerbar a doença óssea.

Os resultados obtidos de rejeição são apresentados na Figura 6.5, a qual também contempla testes realizados nas membranas comerciais de hemodiálise. Os valores de rejeição foram calculados utilizando a Equação 5.3.

Conforme se observa da Figura 6.5, a maioria das fibras sintetizadas apresentou uma boa combinação entre a remoção de lisozima e a retenção de albumina, mesmo as membranas classificadas como de baixo fluxo (F1210A e F1210AN). Apenas as fibras F1205A e F1505A apresentaram alta rejeição à lisozima, resultado que não é adequado para a hemodiálise. Observa-se que a membrana clínica de PSf, de baixo fluxo, apresenta a limitação mencionada em capítulos anteriores, que é a desejável alta rejeição de albumina, mas exibe a indesejável alta rejeição de lisozima. Já a membrana de PES, de alto fluxo, apresentou o resultado oposto, com baixa rejeição de lisozima, mas ao mesmo tempo, grande perda de albumina. As fibras sintetizadas nesta pesquisa apresentaram um melhor desempenho em relação à exclusão de solutos urêmicos, o que pode indicar um bom potencial para seu uso no tratamento por hemodiálise.

De acordo com classificação de Ward (2005), dialisadores de alto fluxo devem ter permeabilidade hidráulica entre 15 e 30 L/h.m<sup>2</sup>.bar, e rejeição de  $\beta_2$ –microglobulina entre 20% e 30%, com perda de albumina menor que 0,5 g por sessão de hemodiálise de 4 horas. As membranas sintetizadas F1505AN e F1510AN apresentam alta rejeição

de albumina (aproximadamente 95%) e rejeição de lisozima na faixa de 45% a 52%, sendo promissoras para esta aplicação. Testes com  $\beta_2$ -microglobulina revelariam com melhor segurança se estas membranas poderiam ser classificadas com alto fluxo.



**Figura 6.5.** Rejeição aos solutos de média e alta massa molar das fibras sintetizadas e das fibras comerciais.

A título de comparação com dados da literatura, vale mencionar que Zhang *et al.* (2015) sintetizaram fibras ocas de PVDF para aplicação em diálise e avaliaram seu desempenho em termos de permeabilidade hidráulica, rejeição de albumina e de lisozima. Os autores conseguiram sintetizar membranas com fluxo de 108,2 L/hm<sup>2</sup> apresentando uma rejeição de albumina de 82,3% e de lisozima de 33,2%, obtendo melhores propriedades de separação que membranas de alto fluxo comerciais de polissulfona. Os autores conseguiram o resultado desejado avaliando mudanças nas condições de síntese e a morfologia obtida das membranas sintetizadas.

Nessa mesma linha de pesquisa, Gao *et al.* (2014) produziram membranas de poli(ácido láctico) (PLA) com superfície modificada com heparina, visando seu uso em hemodiálise. Os autores testaram as membranas em relação à rejeição de lisozima e de albumina. Foram obtidas rejeições à lisozima de 86,3% para a membrana sem modificação e de 81,5% para a membrana com heparina em sua superfície, e de 93,7% e 90,8% de rejeição de albumina para as membranas sem modificação e com modificação, respectivamente. Esses valores de rejeição são elevados, comparáveis

com os valores das comerciais de baixo fluxo (80,1% de rejeição de lisozima e 94,3% de rejeição de albumina), e menos adequados do que os resultados obtidos com as fibras sintetizadas nesta tese.

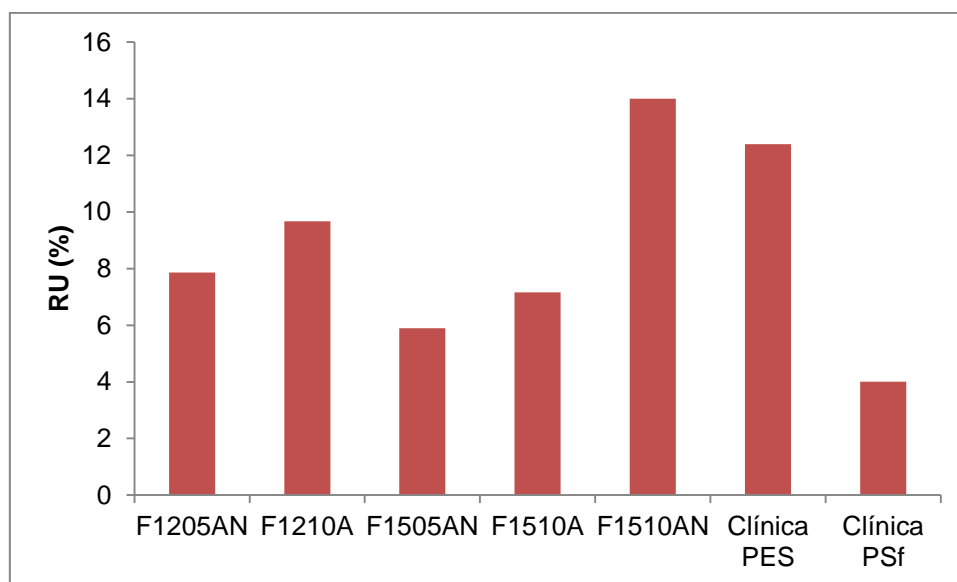
Ahrenholz *et al* (2004) investigaram oito dialisadores considerados de alto fluxo, os quais utilizavam membranas de diferentes permeabilidades, com o objetivo de comparar a capacidade dos mesmos em eliminar solutos urêmicos maiores, utilizando a  $\beta_2$  – microglobulina como representante dos solutos de média massa molar. Os autores avaliaram a capacidade dos dialisadores de remover a  $\beta_2$  – microglobulina sem causar perdas significativas de importantes proteínas do sangue, como a albumina e observaram um aumento exponencial da perda de albumina com o aumento das taxas de ultrafiltração e da diferença de pressão através da membrana. Em relação à remoção de  $\beta_2$  – microglobulina, os dialisadores analisados foram classificados em baixos, médios e altos removedores de moléculas de média massa molar, caso as taxas de remoção fossem menores que 50%, entre 50% e 70% ou maiores que 70%, respectivamente. A maioria das membranas analisadas mostrou baixa perda de albumina combinada à baixa remoção de  $\beta_2$  – microglobulina, ou alta remoção de  $\beta_2$  – microglobulina, porém perdas de albumina relativamente altas, observando apenas dois dialisadores que foram completamente eficazes em manter o balanço desejado de alta remoção de moléculas de média massa molar e baixa perda de importantes proteínas do sangue. Os resultados de Ahrenholz e colaboradores estão condizentes com os resultados obtidos para a membrana de alto fluxo de uso clínico caracterizada neste trabalho. Além disso, uma comparação com os resultados de rejeição à lisozima apresentados pelas fibras aqui sintetizadas indica que há três membranas classificadas como baixas removedoras de moléculas de média massa molar (F1205A, F1505A, F1505AN), três membranas classificadas como médias removedoras (F1210AN, F1510A e F1510AN) e duas classificadas como altas removedoras (F1205AN e F1210A).

### **6.2.3. Remoção de ureia**

Tendo em vista os resultados anteriores em relação à permeabilidade hidráulica e rejeição à lisozima e à albumina, foram escolhidas cinco das fibras sintetizadas para continuar a caracterização em testes de diálise. Uma das fibras de baixo fluxo com melhor resultado de rejeição à lisozima e quatro fibras de alto fluxo com valores adequados para remoção de lisozima e retenção de albumina foram escolhidas. Apenas

uma fibra de baixo fluxo foi escolhida porque este tipo de fibra é o menos utilizado em hemodiálise atualmente, conforme discutido anteriormente no item 6.2.1.

Na Figura 6.6 são apresentadas as remoções de ureia (% RU) para as cinco fibras escolhidas e as duas fibras comerciais, calculadas utilizando a Equação 5.4.



**Figura 6.6.** Resultados de Remoção de ureia para fibras sintetizadas e comerciais.

Conforme se pode observar, a passagem de ureia para a solução de diálise durante os testes apresentou valores comparáveis aos das membranas clínicas. A duração dos testes foi de quatro horas com recirculação da solução de ureia e os módulos de permeação foram confeccionados com áreas de permeação na mesma ordem de grandeza (60 cm<sup>2</sup>), para uma comparação mais adequada.

Deve-se notar que os valores de remoção de ureia foram relativamente baixos devido aos testes terem sido realizados a partir de módulos de permeação com pequena área. Além disso, na metodologia utilizada, a diferença de concentração de ureia entre as soluções de alimentação e do dialisato diminuiu ao longo do tempo, reduzindo a força motriz para a difusão da ureia, diferentemente do que ocorre na hemodiálise. Porém, como as membranas comerciais apresentaram a mesma ordem de grandeza nas reduções percentuais, pode-se inferir que tais valores estão na faixa adequada para o tratamento. A remoção de ureia para uma hemodiálise adequada deve ser de, no mínimo, 60%.

Zhang *et al.* (2015) avaliaram a remoção de ureia (razão de redução de ureia) e lisozima em fibras ocas de PVDF, modificando a área útil do módulo e avaliando a influência da mesma nos resultados de *clearance*. Os autores observaram que dialisadores com diferentes áreas apresentam diferentes resultados de remoção de solutos em testes de diálise realizadas nas mesmas condições. Os autores variaram as áreas dos dialisadores em 0,49 m<sup>2</sup>, 0,69 m<sup>2</sup> e 0,95 m<sup>2</sup> e obtiveram a maior remoção de ureia e lisozima, 87,7% e 66,8%, respectivamente, quando o dialisador tinha 0,69 m<sup>2</sup>. Segundo os autores, isso ocorreu porque a taxa de difusão dos solutos na diálise aumenta com o aumento da área, porém esse aumento pode ser limitado devido à limitação da área da carcaça do módulo do dialisador. Comparando os resultados de Zhang e colaboradores com os resultados obtidos nesse trabalho, observa-se que as áreas de membranas nos módulos são muito diferentes e as dessa tese são muito menores, na ordem de 0,006 m<sup>2</sup>, justificando os baixos valores de redução de ureia, que poderiam ser proporcionalmente elevados caso as áreas fossem maiores.

Além dos valores de remoção de ureia, os testes de diálise permitiram calcular os valores de *clearance* de ureia, através da Equação 5.5. Os resultados são apresentados na Tabela 6.4, a qual contém também os resultados de permeabilidade hidráulica das respectivas membranas.

Dos resultados da Tabela 6.4, observa-se que a membrana F1510AN apresentou os melhores resultados, com alto *clearance* associado à elevada permeabilidade hidráulica. Observa-se também que uma elevada permeabilidade hidráulica nem sempre está associada a um elevado *clearance* de ureia. Isso pode estar associado à distribuição de poros nas membranas. Uma distribuição de poros uniforme permite a difusão das moléculas de ureia, desde que o tamanho do poro seja superior ao tamanho da molécula. Entretanto, membranas que possuem poros muito grandes e muito pequenos pode dificultar a difusão das moléculas, ainda que sua permeabilidade hidráulica seja elevada. Alguns autores apresentam estudos que não mostram diferença de resultados entre a utilização de membranas de baixo ou alto fluxo (EKNOYAN *et al.*, 2002; CHEUNG *et al.*, 2003), enquanto outros relatam que as membranas de alto fluxo são realmente mais eficientes (MUNSHI e AHMAD, 2013; WOODS e NANDAKUMAR, 2000). De modo geral, as membranas de alto fluxo elevam o *clearance* de moléculas de tamanho médio e grande, mas não possuem a mesma correlação para moléculas pequenas.

**Tabela 6.4.** *Clearances* de ureia das membranas sintetizadas e clínicas e respectivas permeabilidades hidráulicas.

Membrana	<i>Clearance</i> (mL/min)	Permeabilidade hidráulica (L/h.m <sup>2</sup> .bar)
F1205AN	35,4	104,4 ± 2,5
F1210A	43,5	6,1 ± 2,3
F1505AN	26,6	67,4 ± 2,1
F1510A	32,2	18,8 ± 1,4
F1510AN	63,0	42,6 ± 1,6
Clínica PSf	55,8	8,2 ± 1,2
Clínica PES	18,0	137,5 ± 0,8

Zhu *et al.* (2015) sintetizaram membranas planas de poli(ácido lático) para aplicação em hemodiálise e analisaram o *clearance* de ureia apresentado pelas membranas sintetizadas. Os autores obtiveram valores próximos a 0,8 mL/min, utilizando em seus testes de diálise uma área de membrana de 0,29 cm<sup>2</sup>. Os resultados apresentados pelos autores são inferiores aos obtidos nessa tese, bem como a área de membrana utilizada no teste.

Entretanto, os valores de *clearance* de ureia dos dialisadores comerciais são bem maiores que os apresentados na Tabela 6.4. Como exemplo, um dialisador de alto fluxo da *Fresenius* apresenta um *clearance* de ureia de 178 mL/min, em um dialisador de 1 m<sup>2</sup> de área.

### 6.3. CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL

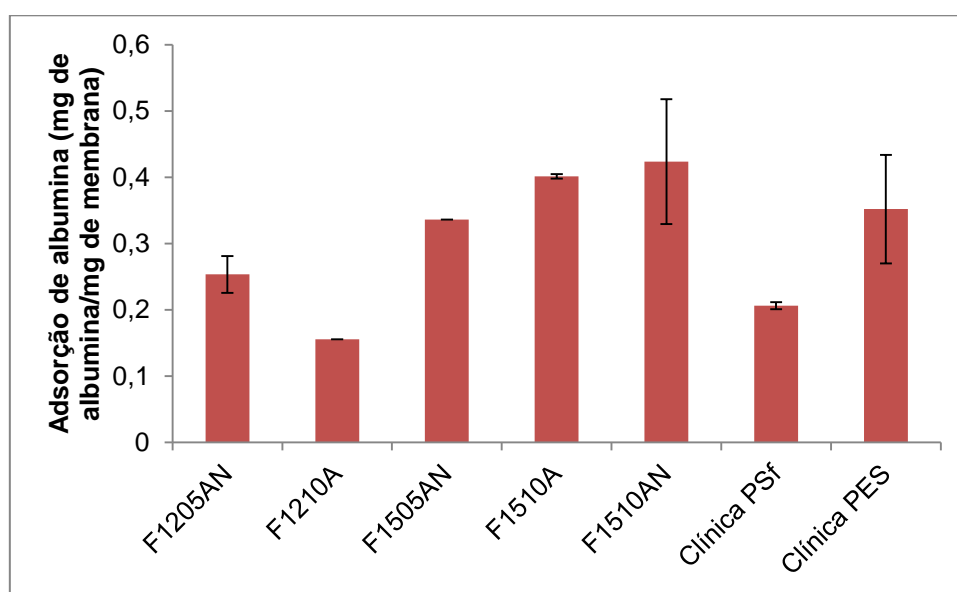
#### 6.3.1. Adsorção de proteína

Os testes de adsorção de proteínas são importantes para identificar prováveis perdas dessas substâncias durante o tratamento de hemodiálise. Como pacientes de hemodiálise muitas vezes apresentam déficit nutricional, a perda de proteínas do plasma não é aceitável clinicamente. Além disso, mesmo pequenas quantidades de proteína nos fluxos de dialisato criam um problema de formação de espuma gerada nas linhas de drenagem (OFSTHUN *et al.*, 2008). O controle da perda de albumina geralmente é

realizado através da medição de sua concentração no dialisato, porém se a membrana tiver a tendência a adsorver esta proteína, a perda real será maior que a perda medida.

A deposição de proteínas na superfície e nos poros das membranas também pode causar a queda do fluxo e afetar a biocompatibilidade, podendo ser seguida da ativação de diferentes sistemas de defesa no sangue, como coagulação, complemento e fibrinólise, bem como de adesão e ativação de células sanguíneas (SUN *et al*, 2003).

Desta forma, testes de adsorção de proteínas foram realizados com as cinco fibras selecionadas e com as duas fibras comerciais, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 6.7, calculados de acordo com a Equação 5.7.



**Figura 6.7.** Quantidade de albumina adsorvida na superfície das fibras.

Através da Figura 6.7, podemos observar uma adsorção máxima de albumina de aproximadamente 0,5 mg/mg de membrana. Os resultados observados para as membranas sintetizadas foram comparáveis com os das membranas comerciais de poli(éter sulfona), indicando que as membranas de poli(éter imida), a princípio, estariam aptas para a aplicação pretendida, com um efeito de hemocompatibilidade similar aos de membranas utilizadas clinicamente no tratamento. A adsorção de proteínas é considerada a primeira etapa do fenômeno de coagulação do sangue.

Os resultados de adsorção de proteínas em membranas de poli(éter imida) está de acordo com trabalhos reportados na literatura, como apresentado por Roesink *et al.* (1991). Neste trabalho, foram sintetizadas membranas de poli(éter imida) e poli(vinil



pirrolidona), avaliando-se a adsorção de albumina sérica bovina em sua superfície. Os autores observaram uma adsorção de aproximadamente 0,35 mg de albumina por mg de membrana, partindo de uma solução de albumina de concentração inicial de 40 g/L. Shi *et al.* (2014) também avaliaram a adsorção de albumina em membranas de poli(éter imida) e observaram que aproximadamente 0,033 mg de albumina foram adsorvidos para cada mg de membrana. Entretanto, os autores utilizaram uma solução inicial de albumina com concentração de 2,0 g/L. A solução inicial de adsorção utilizada nos demais trabalhos era cerca de vinte vezes mais concentrada que a utilizada por Shi e colaboradores, o que pode explicar a menor adsorção de albumina observada por estes autores.

A posterior modificação da superfície das fibras sintetizadas visa promover a elevação da compatibilidade sanguínea, de modo a reduzir/eliminar o uso de heparina durante a hemodiálise, evitando as reações que o uso intravenoso dessa substância pode causar em alguns pacientes. Espera-se, então, que a adsorção de proteínas na superfície das membranas seja reduzida.

#### 6.4. CONCLUSÕES PRELIMINARES

A avaliação das condições de síntese de fibras ocas a partir do sistema PEI/PVP/NMP permitiu concluir que o aumento da concentração de PVP na solução polimérica resulta na supressão da formação de macrovazios, efeito similar ao da adição de solvente ao líquido interno. As dimensões das fibras obtidas foram bastante superiores às membranas comerciais de hemodiálise, chegando a apresentar diâmetros externos cinco vezes maiores, como esperado pela metodologia adotada no seu preparo. A morfologia geral, por sua vez, foi similar à das membranas clínicas, que em geral apresentam uma fina pele densa na superfície interna, suportada por uma camada porosa.

Foram obtidas fibras classificadas tanto como de baixo fluxo quanto de alto fluxo, com permeabilidades hidráulicas variando de 6,1 a 102,0 L/hm<sup>2</sup>bar. Observou-se uma eficiente remoção de lisozima e concomitante retenção de albumina, conforme desejado no tratamento. As membranas comerciais de hemodiálise testadas apresentaram altas remoções de lisozima combinadas com alta perda de albumina ou alta retenção de albumina com acúmulo de lisozima, indicando um desempenho inadequado para o tratamento. As fibras sintetizadas apresentaram melhores resultados em relação a estas análises, indicando potencial para uso em hemodiálise.

As razões de redução de ureia e de *clearance* apresentaram valores bastante próximos aos das membranas comerciais de mesma área, podendo-se também inferir que elas apresentam potencial para uso em hemodiálise.

Os testes de adsorção de proteínas mostraram que as fibras de poli(éter imida) podem ser adequadas à aplicação em hemodiálise, pois a adsorção de albumina na superfície das mesmas foi similar aos de membranas de uso clínico testadas. A posterior modificação superficial visa à redução da quantidade de albumina adsorvida.

Em resumo, as membranas de poli(éter imida) apresentaram boas propriedades de transporte em relação à purificação de toxinas urêmicas, com resultados superiores aos das membranas clínicas testadas, associadas à tendência de boa compatibilidade sanguínea, isto ainda avaliado antes da modificação superficial, podendo portanto constituir-se como material alternativo para uso em hemodiálise.

# CAPÍTULO 7 – MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DAS FIBRAS

*Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes à modificação superficial das membranas através da imobilização de heparina. Foram avaliadas a eficiência da imobilização, através da quantificação e confirmação da presença de heparina, por meio de análises de espectroscopia de infravermelho. As propriedades de transporte foram novamente analisadas, bem como foi realizada a caracterização superficial e da hemocompatibilidade.*

## 7.1. AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS PROPOSTAS

Conforme descrito no Capítulo 5, foram avaliadas três metodologias de modificação da superfície das membranas e essa avaliação preliminar foi realizada utilizando membranas planas e com a imobilização de albumina sérica bovina (BSA). Isso foi feito porque a análise realizada com membranas planas é mais rápida e prática, bem como uso de BSA em vez de heparina facilitava a quantificação da imobilização nesses testes de seleção de metodologia.

Nesta avaliação preliminar para determinação da metodologia mais adequada, foi levada em consideração a manutenção das propriedades de transporte (permeabilidade hidráulica e rejeição de lisozima e albumina), pois o interesse da tese é o desenvolvimento de uma membrana compatível com o sangue e que seja de alto fluxo.

Na Tabela 7.1 são apresentados os resultados em relação à permeabilidade das membranas planas antes e após a modificação superficial, bem como da quantificação de albumina imobilizada. A nomenclatura das metodologias foi definida no Capítulo 5.

Observa-se dos resultados apresentados que a metodologia proposta utilizando a poli(etileno imina) como doador de grupos amino não se mostrou adequada por reduzir a permeabilidade hidráulica de modo que não foi possível medi-la nas condições operacionais utilizadas. Essa metodologia é composta de três etapas (ativação dos grupos amino, estabilização da ativação e imobilização de albumina) e, avaliando-se a redução da permeabilidade em cada uma das etapas observou-se que há redução da permeabilidade quando da reação com Pei, e que a etapa de estabilização com PEGDGE foi determinante para essa redução.

A utilização do PEGDGE, proposta por Albrecht *et al.* (2006b), objetiva promover a estabilidade da camada de Pei em temperaturas superiores a 60°C. Dessa forma, foi proposta a não utilização dessa estabilização, bem como a redução do tempo de aaminação, pois os mesmos autores afirmam que a reação se processa em tempo inferior a cinco minutos, resultando na metodologia designada por Pei\_1.

**Tabela 7.1.** Dados de permeabilidade hidráulica e quantidade de albumina imobilizada pelas três metodologias de modificação superficial propostas em membranas planas.

Metodologia	Permeabilidade Hidráulica (L/h.m <sup>2</sup> .bar)		Quantidade imobilizada (mg/cm <sup>2</sup> )
	Antes	Depois	
Pei_30_PEDGE	4,4	-*	0,14
Pei_1	4,9	2,4	0,18
EDA_24	4,4	9,1	0,30

\*Não foi observado nenhum fluxo no diferencial de pressão aplicado.

Tanto a metodologia sem o uso de PEGDGE (método Pei\_1) quanto a etilenodiamina (método EDA\_24) mostraram-se adequadas para a proposta dessa tese. A utilização da etilenodiamina ainda apresenta a vantagem de elevar a permeabilidade hidráulica das membranas modificadas superficialmente, pois possui baixa massa molecular e hidrofiliçidade. A Pei é um modificador de alta massa molecular, capaz de preencher pequenos poros presentes na membrana (ALBRECHT *et al.*, 2006b) e, por isso, observa-se a redução da permeabilidade hidráulica.

Dessa forma, prosseguiu-se com a utilização da metodologia EDA\_24, a qual foi aplicada às membranas do tipo fibra oca. Foi escolhido o módulo F1510AN, de alto fluxo, com rejeição de lisozima de 45,5% e de albumina de 95,1% e Remoção de ureia de 14%. Na Tabela 7.2 são apresentados os resultados de permeabilidade hidráulica, rejeição de lisozima e de albumina das fibras ocas antes e após a modificação superficial, tanto pela imobilização de albumina quanto de heparina, bem como a quantidade de substância imobilizada.

**Tabela 7.2.** Propriedades de transporte das fibras ocas antes e após a modificação superficial utilizando a metodologia EDA\_24.

<b>Membrana</b>	<b>Permeabilidade Hidráulica (L/h.m<sup>2</sup>.bar)</b>	<b>Rejeição de Lisozima (%)</b>	<b>Rejeição de Albumina (%)</b>	<b>Quantidade imobilizada (mg/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>F1510AN</b>	42,7	45,5	95,1	-
<b>F1510AN + EDA_24 + Albumina</b>	67,0	25,6	76,0	0,38
<b>F1510AN + EDA_24 + Heparina</b>	51,7	41,5	91,0	0,12

Pelos dados da Tabela 7.2, pode-se inferir que a modificação com EDA resulta, nas caracterizações realizadas, em membranas com características compatíveis para utilização em hemodiálise, conforme discutido no Capítulo 6 e, a modificação com heparina praticamente não influencia nessas propriedades. Entretanto, foi observado que, com o tempo, as membranas modificadas se tornaram quebradiças e frágeis, conforme mostra a Figura 7.1.

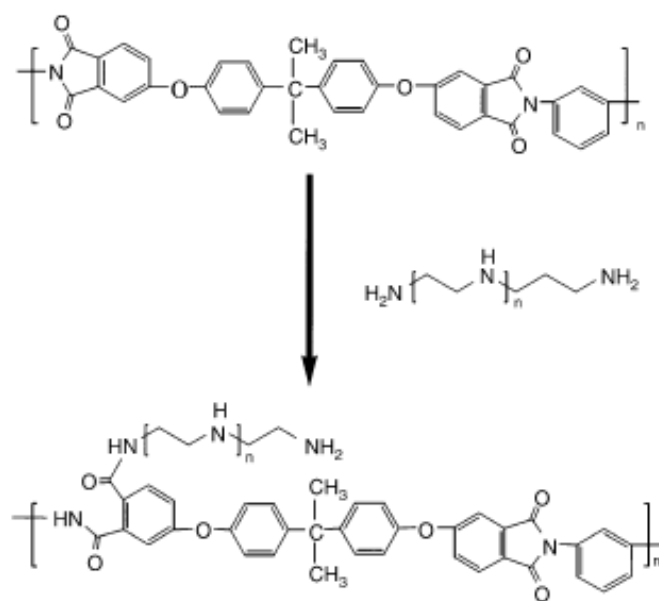


**Figura 7.1.** Fibras ocas quebradiças após modificação com a metodologia EDA\_24.

Dessa forma, a modificação com EDA torna-se inadequada e, analisando os resultados das três metodologias propostas, optou-se pela continuação da tese com a

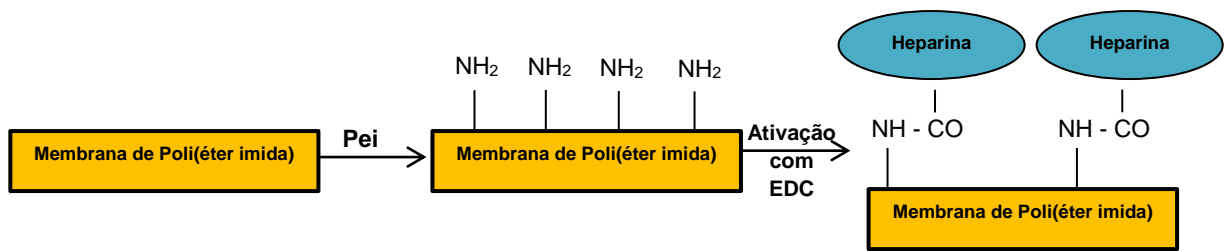
metodologia Pei\_1. Portanto, os resultados apresentados a partir desse tópico referem-se à utilização dessa metodologia, a qual foi aplicada ao módulo F1205AN, o qual apresentava a maior permeabilidade hidráulica dentre as membranas sintetizadas, rejeição de lisozima de 9,1%, de albumina de 65,2% e Remoção de ureia de 7,8%. Essa membrana foi escolhida visto que sua permeabilidade hidráulica inicial era elevada e se esperava uma redução destas após a imobilização da heparina.

Pela metodologia escolhida, segundo Albrecht *et al.* (2006b), o grupo imida da poli(éter imida) reage com um grupo de amina nucleofílicas da poli(etileno imina), levando à formação de dois grupos amida: um fazendo uma ligação com a cadeia macromolecular principal da PEI e um outro conectando a molécula de PEI com a poli(etileno imina), conforme esquematizado na Figura 7.2. A Pei covalentemente ligada à molécula da poli(éter imida) forma uma fina camada na superfície superior da membrana, a qual contém grupos amino disponíveis para reações adicionais.



**Figura 7.2.** Esquema da reação da poli(éter imida) com poliaminas. Fonte: Albrecht *et al.* (2006).

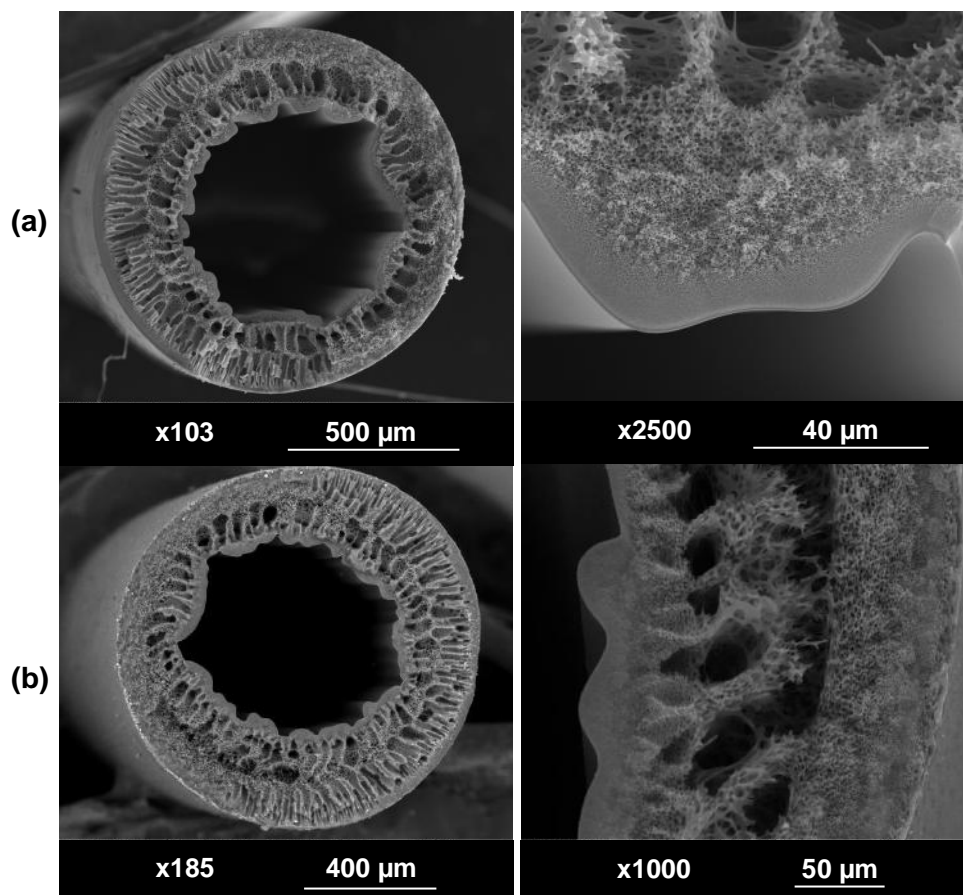
Os grupos amino disponíveis na superfície da membrana de PEI ligam-se aos grupos carboxílicos da heparina, e supõe-se que a estrutura formada fica de acordo com o esquematizado na Figura 7.3.



**Figura 7.3.** Esquema da imobilização de heparina na superfície da membrana de Poli(éter imida). Fonte: Adaptado de Ren *et al.* (2013).

## 7.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Após a modificação superficial, as fibras ocas foram caracterizadas em relação à estrutura morfológica, fazendo-se a observação microscópica da seção transversal (ST). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 7.4, a qual também apresenta as fotomicrografias das fibras sem modificação.



**Figura 7.4.** Fotomicrografias das membranas do tipo fibras ocas F1205AN antes e depois da modificação superficial: (a) Antes da modificação (b) Após a modificação.

Observa-se que a estrutura morfológica da fibra oca não foi alterada após a modificação superficial, mantendo-se uma superfície interna densificada suportada por uma camada porosa. A seção transversal apresenta macrovazios, conforme discutido no Capítulo 6.

Percebe-se, entretanto, um aumento considerável da espessura da pele densa quando da fibra modificada. Essa alteração pode, então, influenciar as propriedades de transporte das membranas, conforme será discutido posteriormente. O aumento da espessura da pele densificada pode ser explicado pela camada de polietilenimina formada, a qual pode preencher pequenos poros presentes da estrutura da membrana.

### 8.3. QUANTIFICAÇÃO DE HEPARINA IMOBILIZADA

A heparina imobilizada na superfície da membrana foi quantificada através da diferença de concentração na solução de imobilização, antes e após a reação. Foi observada uma imobilização de  $176 \pm 52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de membrana.

Na literatura, alguns trabalhos que modificam a superfície de um material com heparina reportam quantidades imobilizadas, de modo geral inferiores aos valores encontrados nessa tese. A Tabela 7.3 apresenta alguns valores de imobilização de heparina reportados na literatura.

**Tabela 7.3.** Resultados de imobilização de heparina em superfícies reportados na literatura.

<b>Autor (ano)</b>	<b>Heparina imobilizada (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Material</b>
<b>Sailynoja <i>et al.</i> (1999)</b>	98	Poliacrilamida
<b>Kang <i>et al.</i> (2001)</b>	1,1 – 1,3	Poliuretano
<b>Michanetzi <i>et al.</i> (2003)</b>	9,76	PVC
<b>Chen <i>et al.</i> (2005)</b>	0,68	Silicone
<b>Huang <i>et al.</i> (2010)</b>	0,86	Polissulfona
<b>Wang <i>et al.</i> (2017)</b>	2,69	Polissulfona
<b>Santos <i>et al.</i> (2017)</b>	272	Poli(éter imida)
<b>Esse estudo</b>	176	Poli(éter imida)



Observa-se que há uma variação grande de densidade de heparina imobilizada reportada na literatura e, nessa tese foi obtido um dos maiores valores de heparina por  $\text{cm}^2$  de membrana. Isso pode ser explicado pela diferença de metodologia de imobilização utilizada em cada trabalho, bem como pela quantidade de heparina disponibilizada para a imobilização. O cálculo da área de membrana também pode influenciar nos resultados reportados na Tabela 7.3. Nessa tese, foi utilizada a área útil de membrana, calculada conforme a Equação 5.2. Entretanto, pela metodologia de imobilização utilizada, a área disponível para a imobilização de heparina é maior que o calculado por essa Equação, pois durante o bombeamento da solução de imobilização por dentro das fibras pode ocorrer a permeação através da parede das mesmas, havendo imobilização ao longo da espessura da fibra, podendo chegar à superfície externa da mesma. Com isso, a área de imobilização é de fato maior e, neste caso, a quantidade imobilizada por unidade de área seria bem menor que o valor apresentado.

Segundo Ren *et al.* (2013), durante uma sessão de hemodiálise são utilizados aproximadamente 20 a 40 mg de heparina. Supondo um dialisador de  $1 \text{ m}^2$  de área, a imobilização de heparina proposta nessa tese ( $176 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) proveria uma quantidade suficiente de coagulante para uma hemodiálise livre de heparina ou, ao menos, com redução da dose necessária, o que poderia evitar problemas de trombocitopenia, condição na qual há uma deficiência de plaquetas (trombócitos) no sangue, células fundamentais para a coagulação, e hemorragias, devido a elevadas quantidades de heparina intravenosa.

#### 7.4. PERMEABILIDADE HIDRÁULICA

A permeabilidade hidráulica foi avaliada antes e depois da modificação superficial das fibras. Antes da modificação, conforme discutido no Capítulo 6, item 6.2.1, as fibras utilizadas no procedimento de modificação foram as que apresentaram maiores valores de permeabilidade, aproximando-se das fibras de alto fluxo comerciais de Poli(éter sulfona). Na Tabela 7.4 apresentam-se os resultados de permeabilidade após a modificação com heparina.

**Tabela 7.4.** Permeabilidade hidráulica antes e após a modificação superficial com heparina.

<b>Membrana</b>	<b>Permeabilidade hidráulica (L/h.m<sup>2</sup>.bar)</b>
<b>PEI/PVP sem modificação</b>	104,4 ± 2,5
<b>PEI/PVP modificada com heparina</b>	63,8 ± 2,3

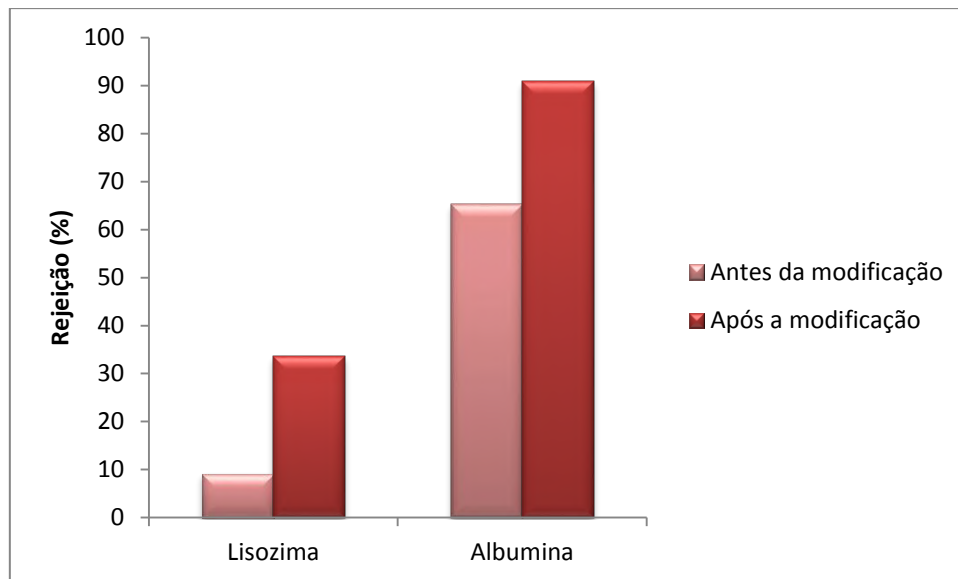
Observa-se dos resultados da Tabela 7.4 que há uma redução da permeabilidade hidráulica após a funcionalização com heparina, porém os novos valores continuam caracterizando os módulos confeccionados com essas fibras como sendo de alto fluxo, ideal para a aplicação pretendida.

A redução da permeabilidade está associada com a fina camada de poli(etileno imina) formada na etapa de introdução dos grupos amino, a qual acaba por preencher pequenos poros que estejam presentes, resultando em uma maior resistência ao transporte, conforme discutido anteriormente. Essa camada foi confirmada através da análise morfológica, que demonstrou um aumento da espessura da pele densificada na superfície interna da fibra apresentada no item 7.2.

#### 7.5. REJEIÇÃO DE SOLUTOS URÊMICOS E DE LISOZIMA E ALBUMINA

Assim como verificado com as membranas antes da modificação, as membranas modificadas superficialmente também apresentaram rejeição nula de solutos urêmicos creatinina, fosfato e vitamina B<sub>12</sub>.

Em relação à rejeição de lisozima e de albumina, os resultados são apresentados na Figura 7.5.



**Figura 7.5.** Rejeição de lisozima e de albumina antes e após a modificação superficial.

Observa-se, dos dados apresentados na Figura 7.5, que a rejeição tanto de lisozima quanto de albumina foram maiores após a modificação, o que está relacionado ao mesmo fato da redução da permeabilidade hidráulica: formação da camada superficial de Pei, com preenchimento de poros pequenos. Antes da modificação, a membrana selecionada possuía uma rejeição muito baixa de albumina, indicando que haveria uma elevada perda dessa proteína durante o tratamento por hemodiálise. Ao mesmo tempo, a rejeição de lisozima era praticamente irrelevante, indicando uma boa remoção dessa toxina urêmica. Com a modificação superficial, a rejeição de lisozima aumentou, mas ainda indicando uma boa remoção dessa substância, enquanto a de albumina aumentou consideravelmente, com valores superiores a 90% de retenção dessa proteína. Esses resultados indicam que a modificação superficial permitiu que a membrana adquirisse propriedades satisfatórias em relação à remoção de lisozima e retenção de proteínas, avaliada por meio da albumina.

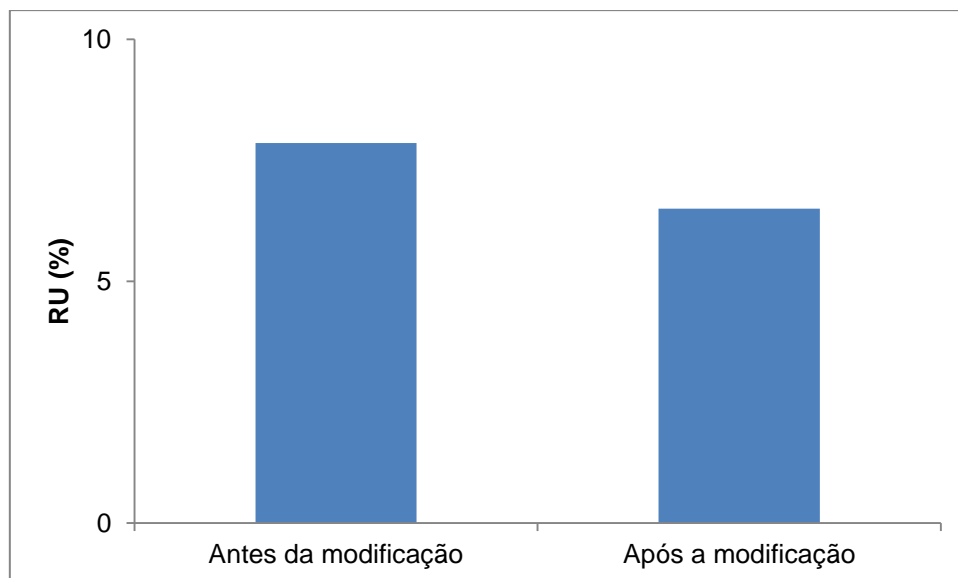
Nos trabalhos reportados na literatura, sobre membranas para hemodiálise, valores de rejeição característicos são similares aos reportados nessa tese, conforme podemos observar nos dados apresentados na Tabela 7.5.

**Tabela 7.5.** Rejeição de lisozima (ou  $\beta_2$ -microglobulina) e de albumina reportadas na literatura.

<b>Autor (ano)</b>	<b>Material membrana</b>	<b>Rejeição de lisozima (%)</b>	<b>Rejeição de albumina (%)</b>
<b>Huang <i>et al.</i> (2011)</b>	Polissulfona + heparina	-	90,9
<b>Gao <i>et al.</i> (2014)</b>	Poli(ácido láctico) + heparina	18	90
<b>Zhang <i>et al.</i> (2015)</b>	Poli(fluoreto de vinilideno)	33,2	82,3
<b>Abidin <i>et al.</i> (2017)</b>	Poli(éter sulfona) + poli(ácido cítrico) + nanotubos de carbono	-	97,7
<b>Santos <i>et al.</i> (2017)</b>	Poli(éter imida) + heparina	89	99
<b>Yu <i>et al.</i> (2017)</b>	Poli(álcool vinílico) e poliacrilonitrila	45,8	98,8
<b>Esse estudo</b>	Poli(éter imida) + Poli(vinil pirrolidona) funcionalizada com heparina	33,6	90,9

## 7.6. REMOÇÃO DE UREIA e *CLEARANCE*

Experimentos de diálise foram realizados com os módulos confeccionados com as fibras após a modificação superficial e os resultados de remoção de ureia são apresentados na Figura 7.6.



**Figura 7.6.** Remoção de ureia antes e após a modificação superficial.

Observa-se que houve uma leve redução da Remoção de ureia, fato associado ao aumento da camada de resistência ao transporte na membrana. Com isso, *clearance* difusivo foi reduzido de 35,4 mL/min para 29,2 mL/min.

Entretanto, os valores tanto de remoção de ureia quanto de *clearance* estão de acordo com os valores comparados na literatura anteriormente no item 6.2.3. Espera-se que o aumento da área de superfície útil do módulo para a ordem de m<sup>2</sup> levará a valores de RU superiores a 60% e de *clearance* de ureia, superiores a 150 mL/min.

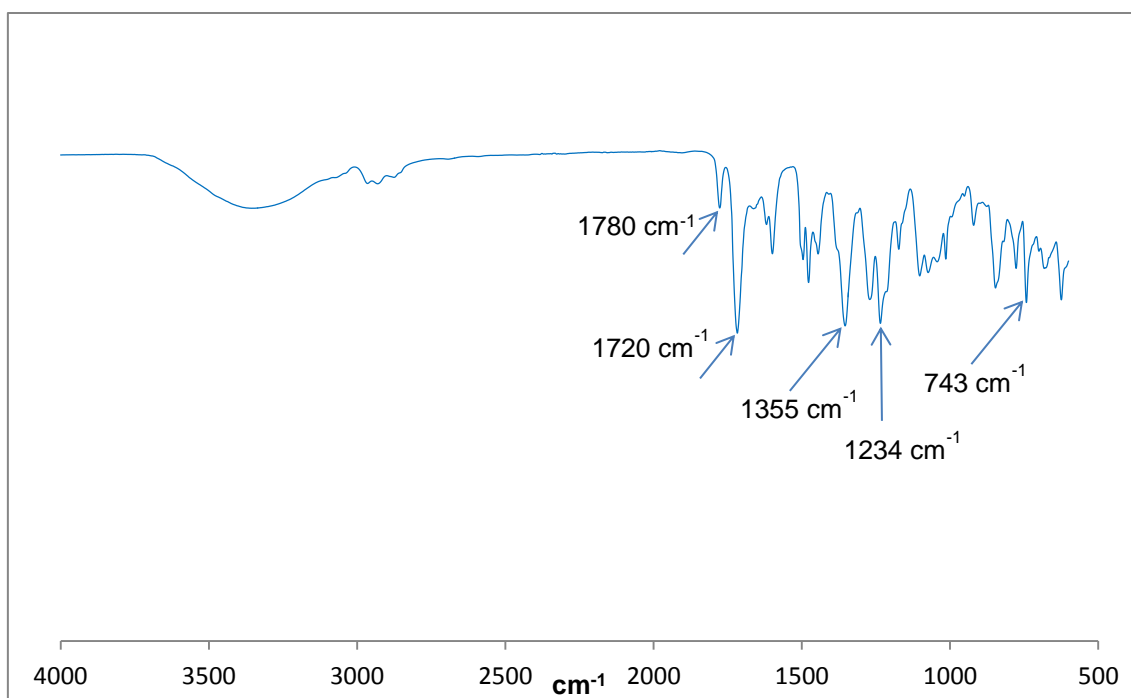
## 7.7. CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL

### 7.7.1. Espectroscopia de Infravermelho (ATR-FTIR)

Para confirmar a imobilização de heparina na superfície das membranas, foi realizada a análise de espectroscopia de infravermelho a fim de detectar a presença de grupos funcionais que não existiam antes da modificação.

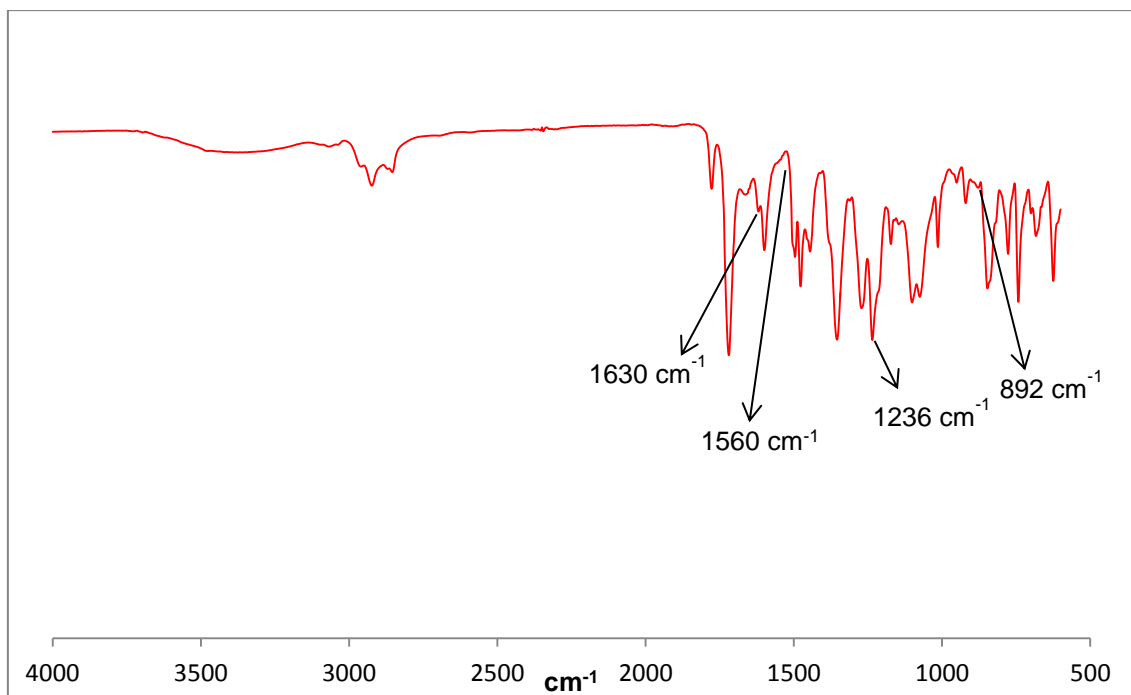
A Figura 7.7 apresenta o espectro obtido para as membranas de poli(éter imida) antes da funcionalização com heparina. O espectro da membrana de PEI antes da modificação exibe absorções características do grupo imida a 1780 cm<sup>-1</sup> e a 1720 cm<sup>-1</sup>, típico do alongamento simétrico e assimétrico dos grupos carbonila presentes no grupamento imida; a 1355 cm<sup>-1</sup> e 743 cm<sup>-1</sup>, referente ao alongamento e flexão C-N; e a

1234  $\text{cm}^{-1}$ , típico do éter aromático C-O-C, assim como reportado por Chen *et al.* (2006) e García *et al.* (2017).



**Figura 7.7.** Espectro da membrana antes da modificação superficial com heparina.

Após a modificação pela imobilização de heparina, observam-se alguns picos característicos de grupos funcionais da heparina: em 1630  $\text{cm}^{-1}$ , banda característica da ligação C = O; 1234  $\text{cm}^{-1}$ , característico da deformação axial assimétrica do grupo C – O – C; 1560  $\text{cm}^{-1}$ , o qual pode ser atribuído à ligação N - H, de amina primária, presente na estrutura da heparina; 892  $\text{cm}^{-1}$ , do grupo N – H fora do plano (COELHO, 2004). O pico de absorção característica do grupo  $\text{SO}_3^-$  da heparina, em 1230  $\text{cm}^{-1}$  e 796  $\text{cm}^{-1}$ , não está bem evidenciado, o que pode ser explicado por sobreposição de outras bandas nessa região (PANZARINI e GUEDES, 2005). A Figura 7.8 apresenta o espectro obtido para a análise com a membrana após a modificação superficial.



**Figura 7.8.** Espectro da membrana após a modificação superficial com heparina.

Aksoy *et al.* (2008) modificaram a superfície de membranas de poliuretano através da imobilização covalente de heparina e caracterizaram as superfícies antes e após a modificação por meio de análises de espectroscopia de infravermelho. Os autores identificaram picos de absorção, após a introdução da heparina, na faixa de  $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ , os quais foram atribuídos ao estiramento assimétrico do  $\text{S}=\text{O}$  e  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  no grupo sacarídeo da heparina. Do mesmo modo, Huang *et al.* (2010) imobilizaram heparina na superfície de membranas de polissulfona e verificaram que, após a imobilização, surgiram picos de absorção em  $1725\text{ cm}^{-1}$ , o qual foi atribuído ao grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ) da heparina imobilizada e em  $1050\text{ cm}^{-1}$ , o qual foi atribuído ao estiramento assimétrico do grupo  $-\text{SO}_3^-$ . Além disso, assim como observado nos resultados apresentados nesta tese, os demais picos de absorção apresentados na membrana antes da modificação também podem ser visualizados após a introdução da heparina.

Com estes resultados, pode-se sugerir que a imobilização de heparina na superfície da membrana foi realizada, confirmando-se o sucesso do procedimento com a quantificação de heparina imobilizada e com as análises das demais propriedades superficiais da membrana, apresentadas nos itens seguintes.

### 7.7.2. Hidrofilicidade

Os resultados das medidas de ângulo de contato das membranas planas são apresentados na Tabela 7.6. Observa-se que antes da modificação, as membranas de poli(éter imida) com poli(vinil pirrolidona) como aditivo apresentaram os maior valores de ângulo de contato. Ainda assim, como foram obtidos valores menores que 90°, as membranas podem ser classificadas como hidrofílicas, quando a molhagem da superfície é favorável. Essa hidrofilicidade pode ser atribuída ao PVP, um aditivo hidrofílico (YUAN e DAN-LI, 2008; SU *et al.*, 2011; SON *et al.*, 2017).

**Tabela 7.6.** Ângulo de contato das membranas antes e após a modificação superficial.

<b>Membrana</b>	<b>Ângulo de contato (°)</b>
<b>Antes da modificação</b>	76,52 ± 4,96
<b>Ativada com grupos amino</b>	61,90 ± 7,07
<b>Após a introdução de heparina</b>	58,53 ± 2,03

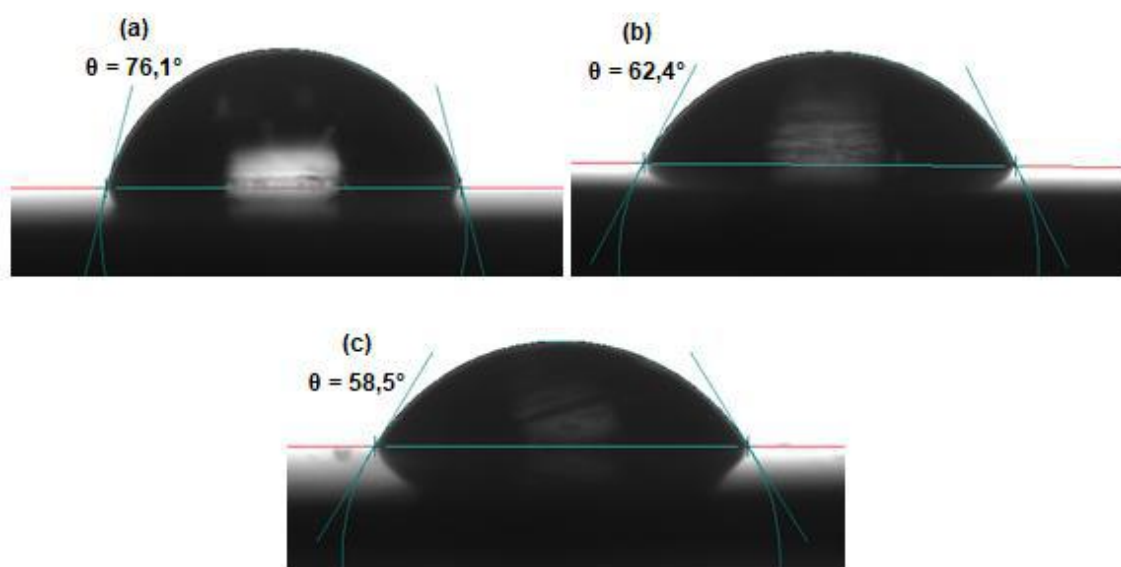
A redução do ângulo de contato para a superfície ativada ocorre devido à presença dos grupos amino hidrofílicos. Resultados similares foram reportados por Li *et al.* (2011), Ren *et al.* (2013) e Wang *et al.* (2017). A introdução da heparina resultou em ângulos de contato um pouco menores que aqueles da membrana ativada, mas considerando o erro associado, pode-se considerar que os ângulos são iguais. Esse pequeno aumento da hidrofilicidade com a introdução da heparina na superfície da membrana está associado com a presença de grupos funcionais hidrofílicos na estrutura da heparina, como hidroxilas, grupos carboxílicos e grupos de ácido sulfúrico (GAO *et al.*, 2014).

Resultados similares são reportados na literatura. Lin *et al.* (2005) modificaram a superfície de membranas de poliuretano com quitosana e heparina, com o objetivo de elevar a hemocompatibilidade. A hidrofilicidade das membranas foi avaliada por meio de análises de ângulo de contato e observou-se que a membrana sem modificação apresentou menor hidrofilicidade, com um ângulo de contato de 68° ± 3° e, com as modificações com quitosana e heparina, os ângulos reduziram para 52° ± 4° e 51° ± 3°, respectivamente, apresentando tendências similares às encontradas nessa tese. Do mesmo modo, Gao *et al.* (2014) imobilizaram heparina na superfície de membranas de



poli(ácido láctico), após seu recobrimento com polidopamina. Os autores observaram um redução no ângulo de contato das membranas de poli(ácido láctico) de 84° para 75° devido ao recobrimento com a polidopamina e, conseqüentemente, introdução de grupos funcionais hidrofílicos, como o grupo hidróxibenzeno. Com a introdução da heparina, o ângulo de contato reduziu para 51°, resultado da adição de mais grupos funcionais hidrofílicos.

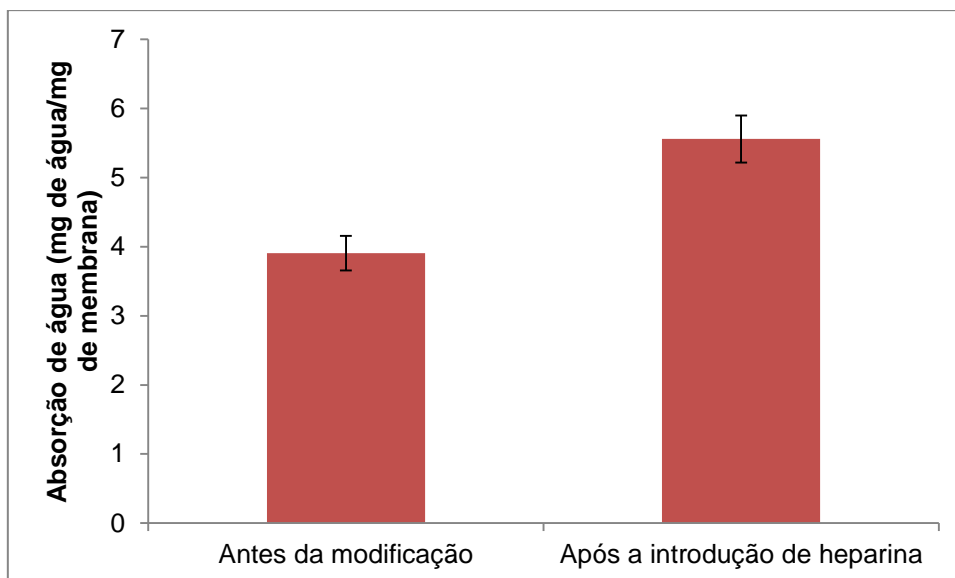
A Figura 7.9 apresenta imagens das gotas de água formadas quando em contato com cada uma das membranas indicadas na Tabela 7.6.



**Figura 7.9.** Gotas de água formadas na análise do ângulo de contato das membranas antes e após a modificação superficial (a) Antes da modificação (b) Ativada com grupos amino e (c) Após a introdução de heparina.

As análises de ângulo de contato foram realizadas com membranas planas e, por isso, representam o efeito qualitativo da modificação superficial realizadas nas membranas na geometria fibra oca.

Para avaliar a hidrofiliçidade das membranas na geometria fibra oca, foram realizadas análises de absorção de água. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 7.10.

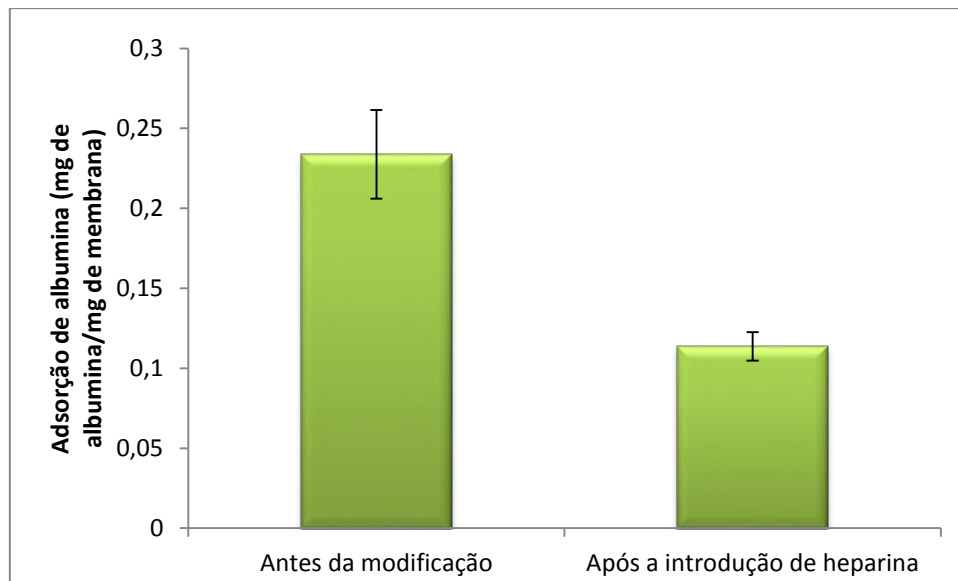


**Figura 7.10.** Absorção de água nas membranas do tipo fibra oca antes e após a modificação com heparina.

A maior absorção de água apresentada pelas membranas após a modificação confirma que há um aumento da hidrofiliicidade também das fibras ocas, resultado da introdução de heparina em sua superfície. Essa observação está de acordo com as análises de ângulo de contato das membranas planas, discutida anteriormente.

### 7.7.3. Adsorção de proteínas

Os testes de adsorção de proteínas foram realizados após a modificação superficial a fim de verificar o efeito da introdução de heparina em reduzir a ocorrência deste fenômeno. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 7.11, a qual compara a adsorção de albumina nas fibras antes e após a introdução de heparina.



**Figura 7.11.** Adsorção de albumina na superfície das fibras antes e após a introdução de heparina em sua superfície.

Observa-se da Figura 7.11 que a introdução de heparina resultou em redução considerável da adsorção de albumina (menos da metade da quantidade adsorvida antes da modificação). Essa menor adsorção pode indicar melhor compatibilidade sanguínea da membrana, o que foi confirmado através das análises de hemocompatibilidade que serão discutidas nos próximos tópicos.

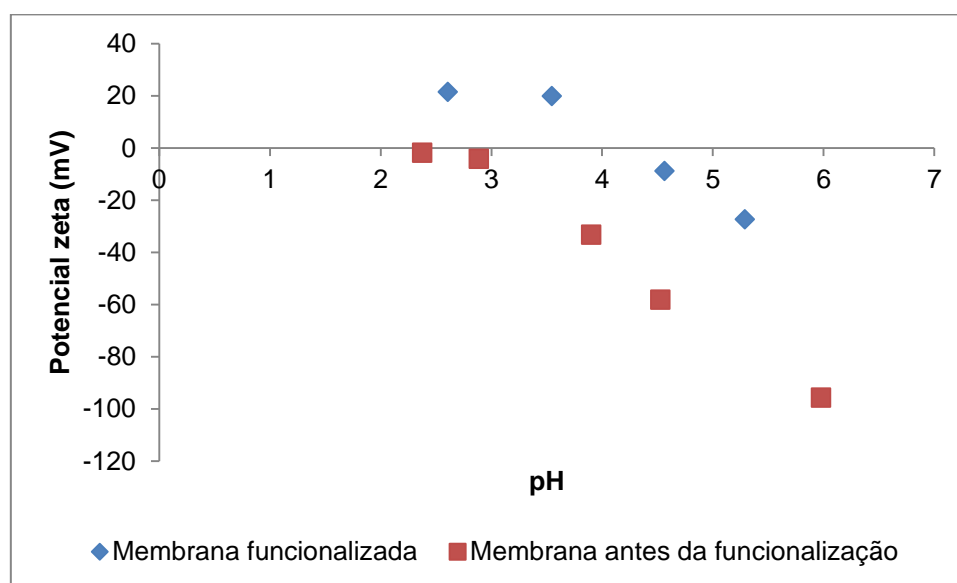
As moléculas de albumina possuem ponto isoelétrico de 4,9 e, portanto, a albumina bovina sérica exibe carga negativa em uma solução neutra. A superfície da membrana, após a introdução de heparina, também está negativamente carregada, conforme será discutido no item 7.7.4, o que resulta em forte repulsão eletrostática entre as moléculas de albumina e a superfície da membrana e, conseqüentemente, há menor adsorção dessa substância. Resultados similares são reportados por Hebbar *et al.* (2015). Além disso, conforme confirmado através das análises de ângulo de contato e absorção de água, a hidrofiliçidade das membranas modificadas é maior e superfícies hidrofílicas são menos propensas a adsorverem proteínas.

Xie *et al.* (2016) imobilizaram heparina na superfície de membranas de polissulfona e avaliaram a adsorção de albumina antes e após a modificação superficial. Os autores observaram que houve adsorção de uma quantidade muito maior de albumina na membrana de polissulfona sem heparina, o que foi atribuído ao fato das membranas com heparina serem mais hidrofílicas. Do mesmo modo, Yang e Lin (2003) observaram a supressão da adsorção de proteínas em membranas de polissulfona modificadas com heparina, o que foi explicado com base na repulsão eletrostática entre

as proteínas negativamente carregadas e os grupos  $\text{SO}_3^-$  e  $\text{COO}^-$  presentes na heparina.

#### 7.7.4. Potencial zeta

A determinação dos valores de potencial zeta em solução de KCl 1 mM das membranas antes e após a modificação superficial com heparina foram realizadas a partir de medições baseadas no potencial de escoamento. Cada medição foi realizada no intervalo aproximado de pH de 2 a 6, iniciando do pH mais básico para o pH mais ácido, e os resultados são apresentados na Figura 7.12. Observa-se que a membrana original de poli(éter imida) apresenta carga negativa em toda faixa de pH investigada. Na literatura, o ponto isoelétrico reportado para a PEI encontra-se em torno de 3,5 (HEBBAR *et al.*, 2017). A diferença entre o resultado aqui obtido e o da literatura decorre da metodologia experimental utilizada neste trabalho.



**Figura 7.12.** Variação do potencial zeta em função do pH da solução de KCl 1 mM das membranas de PEI/PVP antes e após a funcionalização com heparina.

Após a modificação, a membrana contendo heparina apresentou um ponto isoelétrico de aproximadamente 4,25. Esse deslocamento do ponto isoelétrico para valores mais básicos é consequência da introdução de grupos amino encontrados na heparina, o que é mais uma evidência de que a funcionalização ocorreu com sucesso.

Comportamento semelhante do potencial zeta em função do pH também foi observado na literatura para membranas de PEI. Seifert *et al.* (2002) avaliaram o potencial zeta de membranas de PEI, na faixa de pH de aproximadamente 4 a 9 e verificaram que em toda essa faixa, o potencial zeta apresenta carga negativa, que diminui à medida que o pH aumenta, assim como os resultados obtidos nesse estudo. Além disso, os autores também avaliaram o potencial zeta de membranas de PEI modificadas com poli(etileno imina) (introdução de grupos amino) e observaram que neste caso, o potencial zeta é maior na mesma faixa de pH, apresentando ponto isoelétrico em pH 9 e carga negativa apenas a partir desse valor de pH.

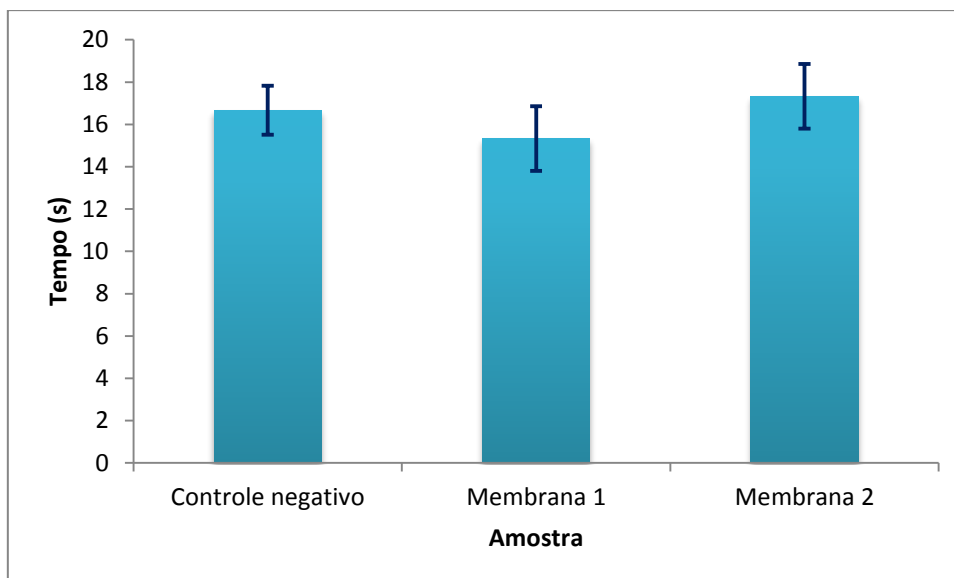
Esse comportamento das membranas analisadas, de apresentar carga negativa na maior faixa analisada, pode ser relacionado a propriedades antitrombogênicas no material.

## 7.8. HEMOCOMPATIBILIDADE

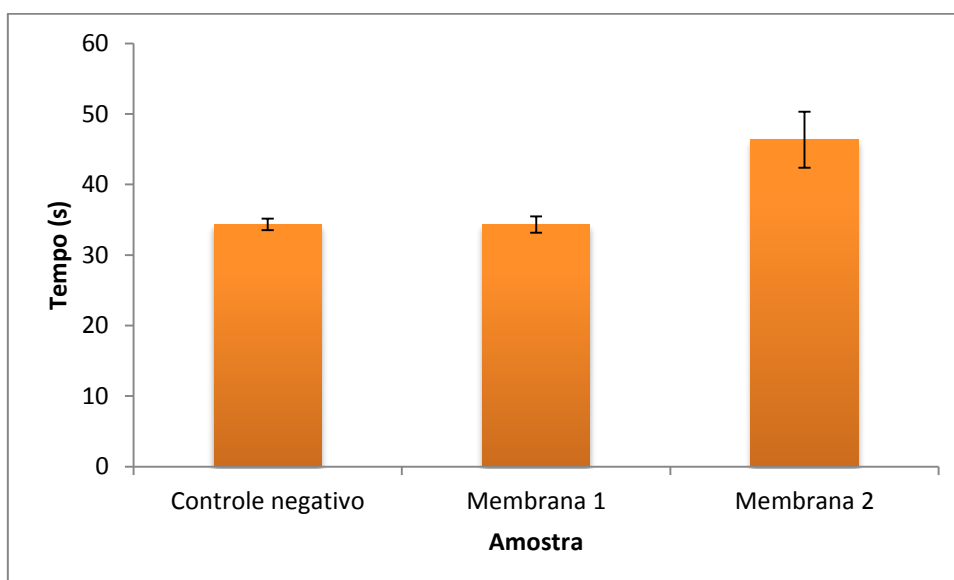
### **7.8.1. Tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)**

As análises de TP e de TTPA foram realizadas para avaliar o parâmetro de coagulação, recomendado pela ISO 10993-4. Conforme descrito anteriormente, o TP descreve o tempo para formação de coágulo ativada pela via extrínseca de coagulação, enquanto o TTPA descreve o funcionamento da via intrínseca de coagulação e, por isso, os resultados das análises desses parâmetros serão discutidos numa mesma seção.

Na Figura 7.13 são apresentados os resultados das análises do TP, enquanto a Figura 7.14 apresenta os resultados do TTPA.



**Figura 7.13.** Resultados das análises do tempo de protrombina. Membrana 1: antes da funcionalização e Membrana 2: após a funcionalização com heparina.



**Figura 7.14.** Resultados das análises do tempo de tromboplastina parcial ativada. Membrana 1: antes da funcionalização e Membrana 2: após a funcionalização com heparina.

Conforme podemos observar da Figura 7.13, o TP não foi alterado na presença das membranas, enquanto da Figura 7.14 observamos que a presença da membrana funcionalizada levou a um aumento do TTPA. Ou seja, houve influência no funcionamento apenas da via intrínseca da coagulação.

De fato, o TTPA é utilizado para controlar o tratamento com heparina, a qual costuma elevá-lo de 1,5 a 2 vezes em relação ao valor controle (EBY, 1997). A heparina promove a inibição da trombina e do fator Xa pela antitrombina III (AT III). Conforme discutido nos itens 5.5.6.1 e 5.5.6.2, esses fatores estão envolvidos na via comum de coagulação, ponto a partir do qual as vias intrínseca e extrínseca se encontram e finalizam. Dessa forma, seria esperado que a heparina não influenciasse os tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada.

Porém, conforme os resultados obtidos, a presença da heparina na superfície da membrana levou a um aumento do TTPA, o que pode ser explicado pelo fato de que, além de inibir a trombina e o fator Xa, a heparina também atua sobre outros fatores, como fator XIa e IXa, que fazem parte da via intrínseca de coagulação, mas não estão presentes na via extrínseca. Dessa forma, a heparina possui um efeito sinérgico envolvendo múltiplos fatores no TTPA, porém não altera o TP (FRITAMA, 2010) e, por esse motivo, é utilizada também clinicamente para acompanhar o tratamento de pacientes com heparina.

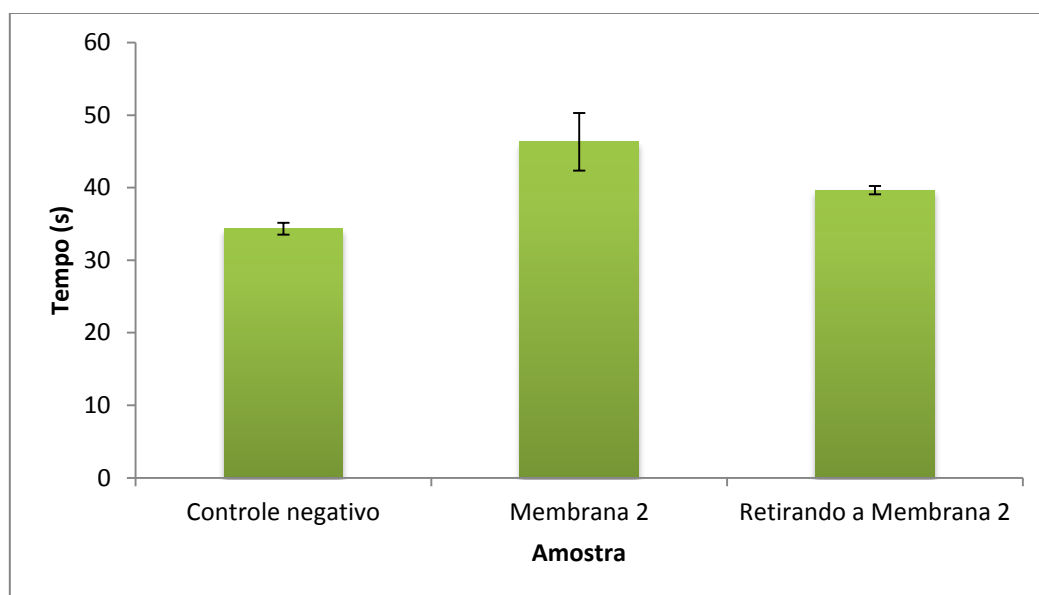
Os resultados de TTPA estão de acordo com alguns resultados reportados na literatura, como o de Jee *et al.* (2004), que avaliou o tempo de tromboplastina parcial ativada de membranas de poli(ácido láctico) e heparina. Os autores observaram aumento no tempo de coagulação pela via intrínseca de  $31,8 \pm 0,2$  s (para a membrana de PLA sem heparina) para  $49,9 \pm 0,2$  s (para a membrana com heparina) e explicaram esse resultado baseado no fato da heparina ligar-se à antitrombina III do plasma e ser apta a neutralizar os fatores de coagulação gerados na interface material-sangue. De forma similar, Ji *et al.* (2017) avaliaram o TTPA de membranas de poli(éter sulfona) modificadas com microgéis semelhantes à heparina. Os autores observaram aumento do TTPA com o aumento do conteúdo de microgel adicionado à membrana, obtendo-se um TTPA superior a 60 s.

Em relação ao TP, também são reportados resultados similares ao observado nesse estudo. Wang *et al.* (2017) avaliaram o TP de membranas de polissulfona modificadas com heparina e não foi observada mudança no TP quando comparadas as análises das membranas antes e após a modificação superficial. Os autores concluíram que as superfícies das membranas não exibiram coagulação pela via extrínseca.

Na análise do TTPA, também foi proposto um desenho experimental em que a membrana (apenas a heparinizada) fosse retirada do tubo contendo o plasma após o tempo de incubação inicial e antes de iniciar a indução da coagulação. Nesse caso, apenas a membrana modificada superficialmente foi utilizada porque foi a única que

alterou o valor do TTPA e esse mesmo teste não foi realizado com o TP porque não houve influência nesse parâmetro com nenhuma das membranas analisadas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 7.15.

Conforme se pode observar da Figura 7.15, mesmo com a retirada da membrana funcionalizada com heparina antes da indução da coagulação, o TTPA é aumentado em relação ao controle negativo, porém levemente inferior ao TTPA do sistema contendo a membrana em todo o procedimento. Esses resultados indicam que há liberação de alguma quantidade de heparina pela membrana, de forma que a metodologia proposta de modificação superficial não provê uma ligação muito estável entre a membrana e a heparina. A extensão da liberação poderia ser melhor avaliada a fim de determinar por quanto tempo a membrana permanece funcionalizada. Entretanto, cabe ressaltar que os dialisadores idealmente não deveriam ser reutilizados e, se o forem, o número de vezes deve ser muito reduzido. Desta forma, uma pequena liberação de heparina ao longo da sessão de diálise não inviabiliza seu uso, especialmente quando se tem em mente que na prática clínica heparina já é administrada na forma livre.



**Figura 7.15.** Resultados de TTPA no desenho experimental em que a membrana é retirada do plasma antes de induzir à coagulação.

Outra observação que podemos inferir a partir dos resultados de TTPA com a membrana após a funcionalização (membrana 2) é que o erro experimental obtido é o mais elevado de todos. Isso pode indicar que a funcionalização de heparina na superfície da membrana não ocorreu de maneira uniforme e diferentes amostras de



membrana possuem diferentes quantidades de heparina. No caso da retirada da membrana funcionalizada antes da indução da coagulação, o erro experimental obtido foi muito pequeno, indicando que a liberação de heparina é praticamente a mesma em todas as repetições.

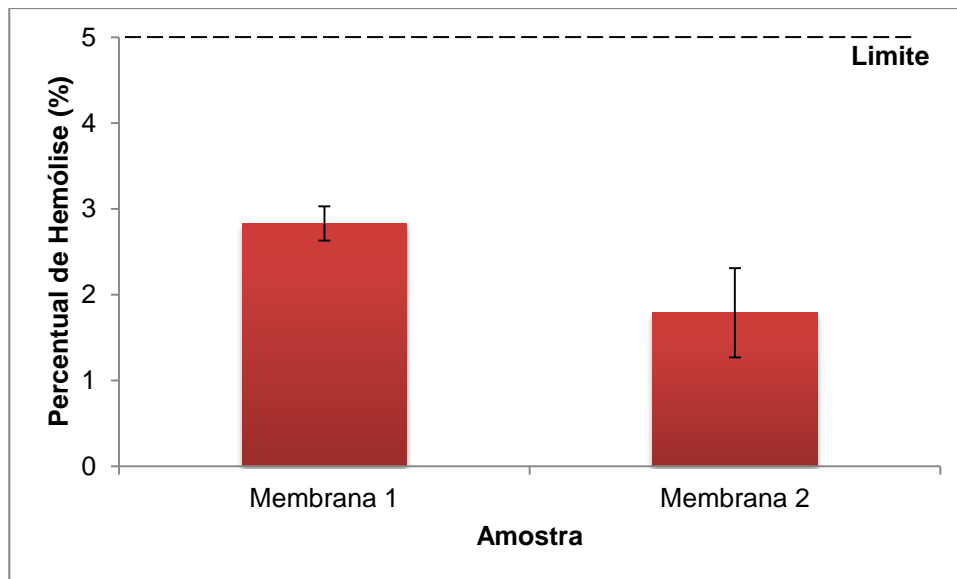
### 7.8.2. Atividade hemolítica

A análise da atividade hemolítica das membranas foi realizada para avaliar o parâmetro de avaliação hematológica da ISO 10993-4. Este objetivou avaliar se as membranas induziam à ocorrência de hemólise quando do seu contato com o sangue. Em geral, este teste é utilizado para detectar danos aos eritrócitos causados pelos materiais. Na Tabela 7.7 são apresentados os valores médios observados de absorbância, a partir dos quais se infere a ocorrência da hemólise.

**Tabela 7.7.** Valores médios de absorbância observados no teste de hemólise.

<b>Amostra</b>	<b>Absorbância (a 540 nm)</b>
<b>Controle negativo</b>	0,559
<b>Controle positivo</b>	2,849
<b>Membrana 1</b>	0,640
<b>Membrana 2</b>	0,610

A partir dos valores apresentados na Tabela 7.7, calculou-se o percentual de hemólise através da Equação 5.8. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 7.16.



**Figura 7.16.** Percentual de hemólise calculado para as membranas. Membrana 1: Antes da modificação superficial e Membrana 2: após a modificação superficial.

Amostras com percentual de hemólise inferiores a 5% são consideradas não hemolíticas e, pelos resultados apresentados na Figura 7.16, podemos afirmar que nem a membrana de PEI/PVP antes da funcionalização com heparina nem a membrana heparinizada causam danos aos eritrócitos quando do seu contato com o sangue.

Resultados similares foram obtidos por Santos *et al.* (2017), que observaram a não ocorrência de hemólise em membranas de poli(éter imida) funcionalizadas com heparina; por Gao *et al.* (2014), em membranas de poli(ácido láctico) também funcionalizadas com heparina; e por Verma *et al.* (2017), em membranas de poli(éter sulfona) com elevada hemocompatibilidade por modificação superficial, que obtiveram percentagens de hemólise dentro do percentual limite de 5%.

O teste de hemólise não garante que as membranas são não trombogênicas, apenas indica que as mesmas não são capazes de causar danos aos eritrócitos.

### 7.8.3. Adesão de Plaquetas

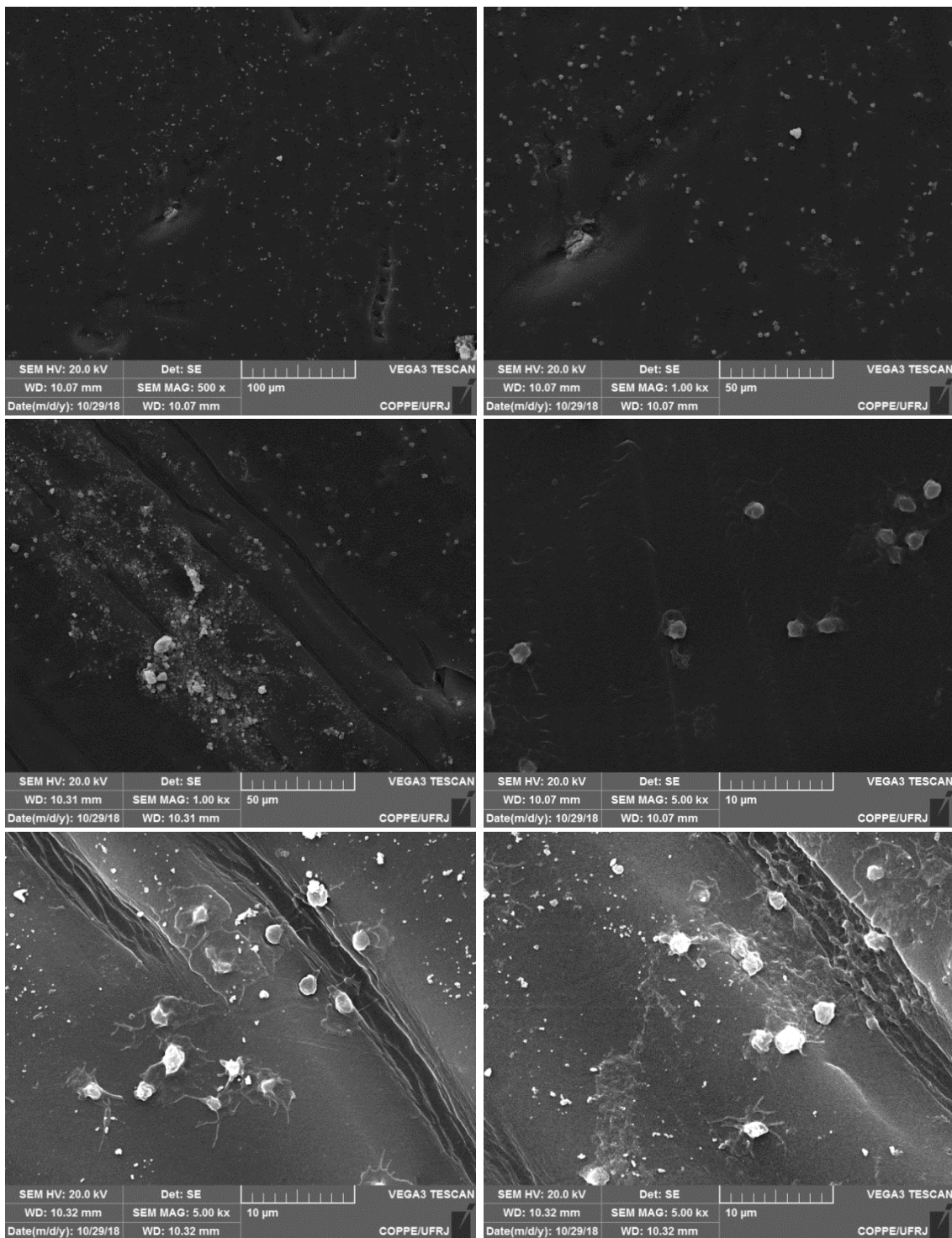
A adesão de plaquetas a uma superfície estranha é o estágio inicial na formação de trombo e um importante teste na avaliação da trombogenicidade de um material. Em condições fisiológicas normais, as plaquetas possuem o formato de um disco, porém, quando ativadas (por estímulos externos, como a presença de uma superfície

trombogênica, por exemplo), podem sofrer transformações conformacionais (GARCIA, 1995).

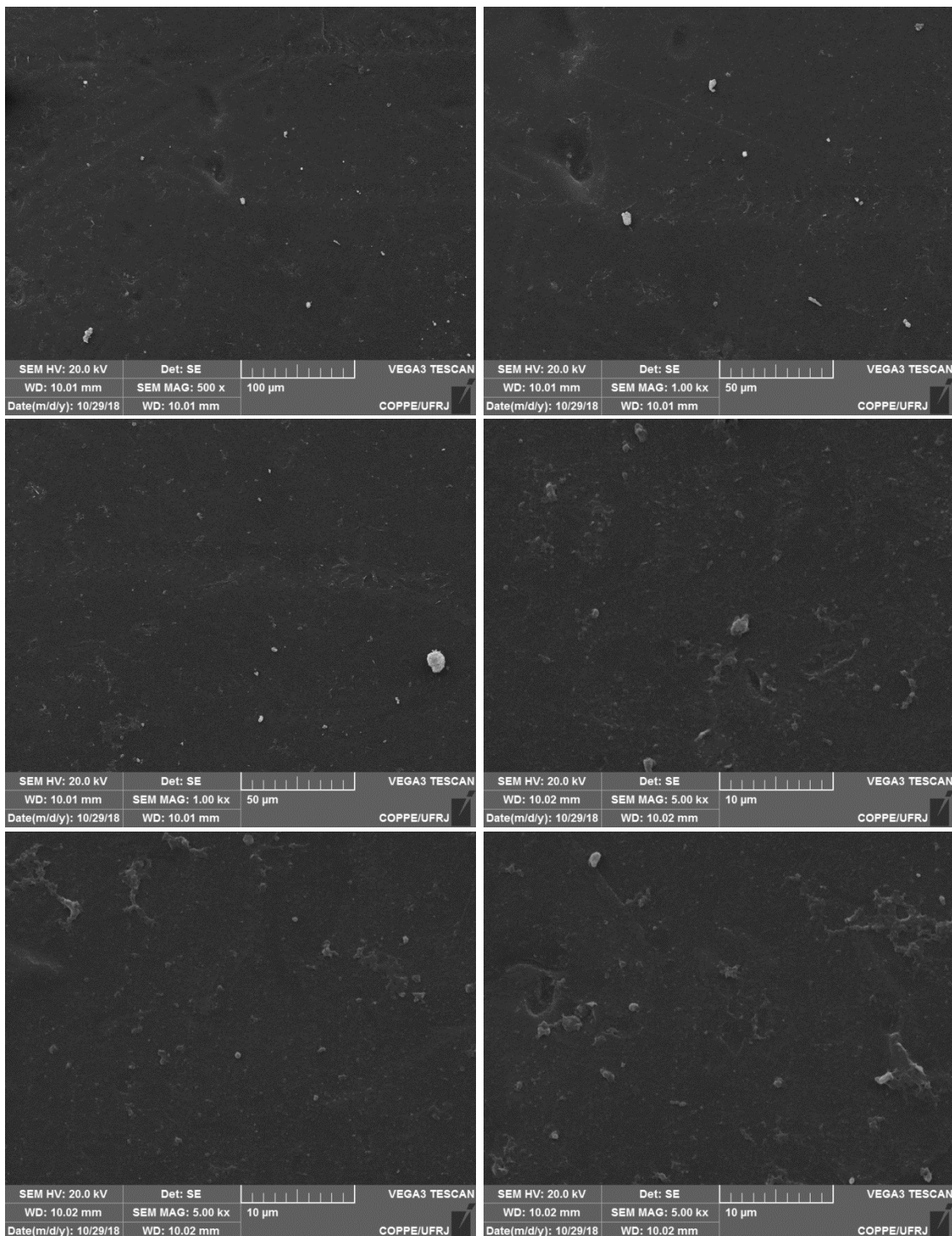
Na Figura 7.17 são apresentados os resultados obtidos do teste de adesão de plaquetas, após visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV), das membranas antes da funcionalização com heparina, enquanto na Figura 7.18 são apresentados os resultados do teste realizado com as membranas funcionalizadas.

Observa-se das Figuras 7.17 e 7.18 que a imobilização de heparina na superfície das membranas resultou em redução da ocorrência de adesão de plaquetas, o que dá indícios de que propriedades antitrombogênicas foram adquiridas pelas membranas com a modificação superficial. Resultados similares são reportados na literatura, e indicam a redução ou até mesmo a supressão da ocorrência de plaquetas aderidas quando da imobilização de heparina em superfícies de materiais diversos (MOLLNES *et al*, 1999; WEBER *et al*, 2000; WEBER *et al*, 2002; GAO *et al*, 2014).

Segundo Wendel e Zimer (1999), a redução da adesão plaquetária em uma superfície é atribuída à redução da deposição de fibrinogênio, produzida a partir de uma superfície de heparina funcionalmente ativa, e a extensão da redução está correlacionada com a extensão da captação de antitrombina.



**Figura 7.17.** Fotomicrografias da superfície de amostras das membranas antes da funcionalização, mostrando que há adesão de plaquetas.



**Figura 7.18.** Fotomicrografias da superfície de amostras das membranas após a funcionalização, mostrando que adesão de plaquetas é muito reduzida.

Conforme discutido no item 7.7.3, as membranas de PEI após a funcionalização com heparina também apresentaram reduzida adsorção de proteínas (albumina), em comparação com as membranas não modificadas superficialmente. O aumento da

hidrofilicidade da superfície da membrana após a introdução da heparina pode justificar a redução na adesão.

#### 7.8.4. Sistema Complemento

Durante o procedimento de hemodiálise, a ativação do complemento pode ser causada principalmente pela interação do sangue com o material de confecção dos filtros dos dialisadores. Por esse motivo, as membranas a serem utilizadas no tratamento devem possuir biocompatibilidade suficiente para evitar ou reduzir a ocorrência desse fenômeno.

Na Tabela 7.8 são apresentados os resultados da análise do sistema complemento, avaliado através da concentração dos complementos C3 e C4 após contato do soro humano com as membranas antes e após a funcionalização com heparina. Na Tabela, a amostra controle refere-se à medição da concentração dos complementos no soro que não foi colocado em contato com membrana.

**Tabela 7.8.** Resultados da análise de ativação do sistema complemento.

<b>Amostra</b>	<b>C3 (mg/dL)</b>	<b>C4 (mg/dL)</b>
<b>Referência (adulto saudável)*</b>	58 - 170	7 - 49
<b>Controle</b>	102	16,1
<b>Membrana antes da funcionalização</b>	104,7 ± 1,53	16,7 ± 0,06
<b>Membrana após a funcionalização</b>	108,0 ± 1,73	17,1 ± 0,10

\*Referência fornecida pelo kit utilizado na análise.

Observa-se pelos dados da Tabela 7.8 que nenhuma das membranas (antes e após a modificação superficial) ativou o sistema complemento, em relação aos complementos C3 e C4. Apesar de ter ocorrido um leve aumento das concentrações em relação ao controle, os valores continuam bem abaixo da referência utilizada para um adulto saudável. Esse resultado indica que a membrana de poli(éter imida) possui características de ser biocompatível, sem a necessidade de modificação superficial, o que está de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura (BRAUNE *et al*, 2013; TZONEVA *et al*, 2008a).

Além de ser utilizada como índice de medição da biocompatibilidade do material, a avaliação da ativação do sistema complemento em hemodiálise é importante porque está associada a inflamações e ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, principal causa de morte de pacientes com doenças renais em estágio terminal (DE BORST, 2016). Particularmente, um elevado nível circulante de C3 tem sido associado à resistência à insulina e à incidência de diabetes (WLAZLO *et al*, 2014), metabolismo lipídico alterado (BARBU *et al*, 2015) e à incidência de doença coronariana (ONAT *et al*, 2010). Além disso, níveis circulantes mais elevados de C4 foram associados ao desenvolvimento de acidente vascular cerebral (CAVISOGLU *et al*, 2007).

Portanto, o desenvolvimento e utilização de membranas que possuam como característica a não ativação do sistema complemento pode levar a uma melhoria na sobrevida e qualidade de vida dos pacientes dialisados, com menor incidência das principais doenças causadoras de óbito.

## 7.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste capítulo indicam a potencialidade da utilização da poli(éter imida) modificada através da funcionalização pela imobilização de heparina em sua superfície como em filtros de hemodiálise, pois foram obtidas propriedades de transporte comparáveis com as membranas clínicas utilizadas atualmente no tratamento. Além disso, com a modificação superficial, houve aumento da hidrofiliabilidade e redução da adsorção de proteínas. Nos testes de hemocompatibilidade, as membranas modificadas apresentaram aumento do tempo de coagulação, redução da ocorrência da adesão de plaquetas e não causaram ativação do sistema complemento, apresentando propriedades antitrombogênicas e de biocompatibilidade muito importantes para a aplicação pretendida. Além disso, quando do contato com o sangue, não causaram hemólise, apresentando-se seguras nesse sentido.

# CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

## 8.1. CONCLUSÕES

Membranas na forma de fibras ocas baseadas em poli(éter imida) (PEI) e destinadas a uso em hemodiálise foram obtidas nesta tese, utilizando a técnica de inversão de fases na extrusão de solução polimérica em presença de líquido coagulante. A avaliação das condições de fabricação de fibras ocas a partir de soluções de PEI/PVP/NMP permitiu concluir que o aumento da concentração de PVP na solução resulta na supressão da formação de macrovazios na morfologia da membrana, efeito similar ao da adição de solvente ao líquido interno.

A morfologia das membranas obtidas, por sua vez, foi similar à das membranas clínicas, que em geral apresentam uma fina pele densa na superfície interna da fibra, adjacente a uma camada porosa que caracteriza a maior parte da espessura da fibra. As dimensões das fibras obtidas foram bastante superiores às membranas comerciais de uso clínico, chegando a apresentar diâmetros externos até cinco vezes maiores, o que pode implicar eventualmente na sua adequação de uso, pois o volume de sangue necessário para enchimento inicial do módulo de hemodiálise pode ser superior ao recomendado (ocorrência de hipovolemia).

Foi possível obter fibras classificadas tanto como de baixo fluxo quanto de alto fluxo, com permeabilidades hidráulicas variando de 6,1 a 102,0 L/hm<sup>2</sup>bar. Observou-se uma eficiente remoção de lisozima e concomitante retenção de albumina, conforme desejado no tratamento. As membranas comerciais de uso clínico testadas apresentaram altas remoções de lisozima combinadas com alta perda de albumina ou alta retenção de albumina com acúmulo de lisozima, indicando um desempenho inadequado para o tratamento. As fibras sintetizadas apresentaram melhores resultados em relação a estas análises, indicando excelente potencial para uso em hemodiálise.

As razões de redução de ureia e o *clearance* de ureia apresentaram valores bastante próximos aos das membranas comerciais, considerando as mesmas áreas, podendo-se também inferir que elas apresentam bom potencial para uso em hemodiálise.



A imobilização de heparina na superfície da membrana foi alcançada com sucesso com a utilização da poli(etileno imina) como doador de grupos amino, através de reação desta com a PEI durante exposição de 1 minuto. Confirmada através da presença de bandas de absorção característica de grupos funcionais presentes na estrutura da heparina, a modificação superficial não alterou a morfologia da membrana, conforme esperado, porém resultou em aumento da camada seletiva densificada na superfície interna da membrana. Como consequência, as propriedades de transporte das fibras foram alteradas: a permeabilidade hidráulica diminuiu (de 104 L/h.m<sup>2</sup>.bar para 63 L/h.m<sup>2</sup>.bar), as rejeições de lisozima e albumina aumentaram (a de lisozima, de 9% para 34% e a de albumina, de 65% para 91%), bem como a Remoção de ureia e o *clearance* de ureia foram reduzidos, porém em menor proporção. Esses resultados podem ser explicados pelo fato da poli(etileno imina) preencher pequenos poros presentes na membrana.

A imobilização de 0,176 mg/cm<sup>2</sup> de heparina na superfície da fibra oca também resultou em uma redução do ângulo de contato (de 76,4° para 58,5°), o que confirma um aumento da hidrofiliabilidade da membrana. Este fato, aliado à carga negativa que proporciona a heparina resultaram em um efeito benéfico, já que as membranas apresentaram adsorção reduzida de proteína, bem como reduzida adesão de plaquetas em relação à membrana de PEI sem modificação superficial.

A análise do tempo de tromboelastina parcial ativada (TTPA) demonstrou o caráter anticoagulante das membranas funcionalizadas, pois foi observado aumento no tempo de formação de trombo de aproximadamente 35%. Quando em contato com a membrana antes da funcionalização, houve coagulação do plasma em um tempo muito próximo ao tempo da referência, indicando que a coagulação do sangue na presença destas membranas não foi afetada.

A avaliação do sistema complemento demonstrou que as membranas de PEI, com e sem modificação superficial, não causam ativação do complemento, resultado que indica que as membranas possuem características biocompatíveis importantes para o aumento da expectativa de vida dos pacientes em tratamento dialítico.

Portanto, as membranas do tipo fibras ocas de PEI/PVP fabricadas por extrusão úmida e submetidas à modificação de sua superfície apresentam características antitrombogênicas e de biocompatibilidade, altamente desejáveis para a utilização em cartuchos de hemodiálise.

## 8.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Modificar condições de síntese das fibras ocas, incluindo as dimensões da extrusora, a fim de obter fibras com menores diâmetros interno e externo;
- Configurar módulos de maior área para realização dos testes na máquina de hemodiálise, em termos de *clearance* e coeficiente de ultrafiltração;
- Determinação experimental do volume de *priming* de módulos de hemodiálise de área compatível com os módulos clínicos atuais;
- Fazer um estudo da estabilidade da ligação da heparina com a superfície da membrana e explorar o efeito da heparina imobilizada no TTPA;
- Avaliar se o procedimento de esterilização das membranas causará efeitos em suas propriedades mecânicas e de transporte;
- Realização de testes de hemodiálise com sangue, com módulos de pequeno tamanho, para avaliação da ocorrência de reações adversas em processo.
- Fazer uma análise econômica para avaliar a viabilidade de utilização das membranas sintetizadas na fabricação de módulos de hemodiálise nacionais.

# CAPÍTULO 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIDIN, M. N. Z.; GOH, P. S.; ISMAIL, A. F. *et al.* "Development of Biocompatible and Safe Polyethersulfone Hemodialysis Membrane Incorporated with Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes". **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 572-582, 2017.
- ABIDIN, M. N. Z.; GOH, P. S.; ISMAIL, A. F. *et al.* "Antifouling Polyethersulfone Hemodialysis Membranes Incorporated with Poly (citric acid) Polymerized Multi-Walled Carbon Nanotubes". **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 540-550, 2016.
- AHMAD, A. L.; SALAUDEEN, Y. O.; JAWAD, Z. A. "Synthesis of Asymmetric Polyetherimide Membrane for CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> Separation". In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, v. 206, n. 1, 2017.
- AHRENHOLZ, P. G.; WINKLER, R. E.; MICHELSEN, A. *et al.* "Dialysis Membrane-Dependent Removal of Middle-Molecules during Hemodiafiltration: the Beta2-Microglobulin/Albumin Relationship". **Clinical Nephrology**, v. 62, n. 1, pp. 21-28, 2004.
- AKSOY, A. E.; HASIRCI, V.; HASIRCI, N. "Surface Modification of Polyurethanes with Covalent Immobilization of Heparin". In: **Macromolecular Symposia**, v. 269, n. 1, p. 145-153, 2008.
- ALBRECHT, W.; KNEIFEL, K.; WEIGEL, T. H.; HILKE, R.; JUST, R.; SCHOSSIG, M.; EBERT, K.; LENDLEIN, A. "Preparation of Highly Asymmetric Hollow Fiber Membranes from Poly(ether imide) by a Modified Dry-Wet Phase Inversion Technique using a Triple Spinneret". **Journal of Membrane Science**, v. 262, pp. 69-80, 2005.
- ALBRECHT, W.; LÜTZOW, K.; WEIGEL, Th.; GROTH, T.; SCHOSSIG, M.; LENDLEIN, A. "Development of Highly Porous Microparticles from Poly(ether imide) Prepared by a Spraying/Coagulation Process". **Journal of Membrane Science**, v. 273, pp. 106-115, 2006a.
- ALBRECHT, W.; SANTOSO, F.; LÜTZOW, K.; WEIGEL, Th.; SCHOMACKER, R.; LENDLEIN, A. "Preparation of Aminated Microfiltration Membranes by Degradable

Functionalization using Plain PEI membranes with Various Morphologies”. **Journal of Membrane Science**, v. 292, pp. 145-157, 2007a.

ALBRECHT, W.; SCHAUER, J.; WEIGEL, Th. *et al.* “Preparation of Novel Composite Membranes: Reactive Coating on Microporous Poly(ether imide) Support Membranes”. **Journal of Membrane Science**, v. 269, pp. 49-59, 2006b.

ALBRECHT, W.; SCHAUER, J.; WEIGEL, T. H.; RICHAU, K.; GROTH, Th.; LENDLEIN, A. “Modification of Poly(ether imide) Membranes with Brominated Polyvinylpyrrolidone”. **Journal of Membrane Science**, v. 291, pp. 10-18, 2007b.

ALLEN, D. J. **Transport Phenomena and Blood Platelet**. Ph.D. Thesis, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, 1976.

ALMEIDA, A. T. **Obtenção de Superfícies Hemocompatíveis por Meio da Modificação de Materiais Poliméricos pela Radiação Ionizante**. Dissertação de M.Sc., Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2000.

ALTANKOV, G.; ALBRECHT, W.; RICHAU, K.; GROTH, TH.; LENDLEIN, A. “On the Tissue Compatibility of Poly(ether imide) Membranes: an *in vitro* Study on their Interaction with Human Dermal Fibroblasts and Keratinocytes”. **Journal of Biomaterials Science – Polymer Edition**, v. 16, pp. 23-42, 2005.

AMBALAVANAN, S.; RABETOY, G.; CHEUNG, A. K. “High-Efficiency and High-Flux Hemodialysis”. In: Henrich, W. L.; BENNET, W. M. (eds.), **Atlas of Diseases of the Kidney**, v. 5, cap. 3, 1999.

AMIJI, M.; PARK, K. “Surface Modification of Polymeric Biomaterials with Poly(ethylene oxide), albumin, and heparin for reduced thrombogenicity”. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 4, n. 3, pp. 217-234, 1993.

AOUN, B.; JANSSEN-LOZINSKA, Y.; ULINSKI, T. “Effect of Vitamin E Coated Dialyzers on Anticoagulation Requirement in Hemodialyzed Children”. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 21, n. 3, p. 466, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. “Dados Numéricos da Doação de Órgãos e Transplantes Realizados por Estado e Instituição no Período: Janeiro/Setembro – 2017”. **Registro Brasileiro de Transplantes**, ano XXIII, n. 3, 2017.

AZAR, A. T. **Modeling and Control of Dialysis Systems**. Vol. 1: Modeling Techniques of Hemodialysis Systems, Springer, 2013.

- BABB, A. L.; POPOVICH, R. P.; CHRISTOPHER, T. G. *et al.* "The Genesis of the Square Meter-Hour Hypothesis". **Transactions – American Society for Artificial Internal Organs**, v. 17, p. 81-91, 1971.
- BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 2<sup>a</sup> ed., England, John Wiley & Sons, p. 465-490, 2004.
- BAKERI, G.; ISMAIL, A. F.; SHARIATY-NIASSAR, M. *et al.* "Effect of Polymer Concentration on The Structure and Performance of Polyetherimide Hollow Fiber Membranes". **Journal of Membrane Science**, v. 363, n. 1-2, p. 103-111, 2010.
- BAKERI, G.; ISMAIL, A. F.; RANA, D. *et al.* "Development of High Performance Surface Modified Polyetherimide Hollow Fiber Membrane for Gas–Liquid Contacting Processes". **Chemical Engineering Journal**, v. 198, p. 327-337, 2012.
- BALASHOVA, I. M.; DANNER, R. P.; PURI, P. S. *et al.* "Solubility and Diffusivity of Solvents and Nonsolvents in Polysulfone and Polyetherimide". **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 14, p. 3058-3064, 2001.
- BARBU, A.; HAMAD, O. A.; LIND, L. *et al.* "The Role of Complement Factor C3 in Lipid Metabolism". **Molecular Immunology**, v. 67, n. 1, p. 101-107, 2015.
- BELLO, A. K.; LEVIN A.; TONELLI, M. *et al.* "Global Kidney Health Atlas: A report by the International Society of Nephrology on the current state of organization and structures for kidney care across the globe. **International Society of Nephrology**, Bruxelles, Bélgica, 2017.
- BIRAN, R.; POND, D. "Heparin Coatings for Improving Blood Compatibility of Medical Devices". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 112, p. 12-23, 2017.
- BLACK, J. **Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility**. Fourth Edition, CRC Press, 2005.
- BLOEMBERGEN, W. E.; STANNARD, D. C.; PORT, F. K.; *et al.* "Relationship of Dose of Hemodialysis and Cause-Specific Mortality". **Kidney International**, v. 50, p. 557-565, 1996.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; LEHMANN, E.; JAUDON, M. C. *et al.* "Blood Oxidative Stress and Lipoprotein Oxidizability in Haemodialysis Patients: Effect of the Use of a Vitamin E-coated Dialysis Membrane". **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, n. 12, p. 2020-2028, 2000.
- BOURÉ, T.; VANHOLDER, R. "Which Dialysis Membrane to Choose?". **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 2, pp. 293-296, 2004.

- BOSCHETTI-DE-FIERRO, A.; BECK, W., HILDWEIN, H. *et al.* "Membrane Innovation in Dialysis. In: **Expanded Hemodialysis**. Karger Publishers, p. 100-114, 2017.
- BRADFORD, M. M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAUNE, S.; RUESTEN-LANGE, M.; MROWIETZ, C.; LÜTZOW, K.; ROCH, T.; NEFFE, A. T.; LENDLEIN, A.; JUNG, F. "Dynamic in vitro hemocompatibility testing of poly(ether imide) membranes functionalized with linear, methylated oligoglycerol and oligo(ethylene glycol)". **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 54, pp. 235-248, 2013.
- BUCK, R.; DEIBERT, J.; WOCHNER, A. **Hollow Fiber Membrane for Hemodialysis with Improved Permeability and Selectivity**. *Patent Number EP 2 113 298 B1*, 2013.
- CAGNOLATI, D.; SANKARANKUTTY, A. K.; ROCHA, J. P. S. *et al.* "Hemostasia e Distúrbios da Coagulação". 2017. Disponível em: < [http://sites.usp.br/dcdrp/wp-content/uploads/sites/273/2017/05/hemostasia\\_revisado.pdf](http://sites.usp.br/dcdrp/wp-content/uploads/sites/273/2017/05/hemostasia_revisado.pdf)> Acesso em: 16 de set. de 2018, 19:55:59.
- CAHALAN, P.; LINDHOUT, T.; FOUACHE, B.; *et al.* **Method for Making Improved Heparinized Biomaterials**. *Patent Number 5,767,108*, 1998.
- CARVALHO, R. B. de. **Fibras Ocas Compostas para Nanofiltração e Osmose Inversa Preparadas pela Técnica de Precipitação por Imersão de Duas Soluções Poliméricas Extrudadas Simultaneamente**. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2005.
- CAVUSOGLU, E.; ENG, C.; CHOPRA, V. *et al.* "Usefulness of the Serum Complement Component C4 as a Predictor of Stroke in Patients with Known or Suspected Coronary Artery Disease Referred for Coronary Angiography". **The American Journal of Cardiology**, v. 100, n. 2, p. 164-168, 2007.
- CHEN, B. K.; SU, C. T.; TSENG, M. C. *et al.* "Preparation of Polyetherimide Nanocomposites with Improved Thermal, Mechanical and Dielectric Properties". **Polymer Bulletin**, v. 57, n. 5, p. 671-681, 2006.
- CHEN, H.; CHEN, Y.; SHEARDOWN, H. *et al.* "Immobilization of Heparin on a Silicon Surface through a Heterobifunctional PEG Spacer". **Biomaterials**, v. 26, pp. 7418-7424, 2005.

- CHEUNG, A. K.; LEVIN, N. W., GREENE, T. *et al.* "Effects of High-flux Hemodialysis on Clinical Outcomes: Results of the HEMO Study". **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 12, p. 3251-3263, 2003.
- CHINPA, W.; QUÉMENERB, D.; BÈCHEC, E.; JIRARATANANOND, R.; DERATANI, A. "Preparation of Poly(ether imide) based Ultrafiltration Membrane with Low Fouling Property by Surface Modification with Poly(ethylene glycol)". **Journal of Membrane Science**, v. 365, pp. 89-97, 2010.
- COELHO, T. C. **Síntese e Caracterização de Heparina de Baixa Massa Molar**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química, Florianópolis, 2004.
- COLLINS, B. H.; KULKARNI, S.; JOHNSTON, T. D. *et al.* **Renal transplantation**. 2015. Disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/430128-overview#>> Acesso em: 16 de set. de 2018, 14:18:51.
- CRANFORD, R. J.; DARMSTADT, H.; YANG, J. *et al.* "Polyetherimide/polyvinylpyrrolidone Vapor Permeation Membranes. Physical and Chemical Characterization". **Journal of Membrane Science**, v. 155, n. 2, p. 231-240, 1999.
- DAHE, G. J.; TEOTIA, R. S.; KADAM, S. S. *et al.* "The Biocompatibility and Separation Performance of Antioxidative Polysulfone/Vitamin E TPGS Composite Hollow Fiber Membranes". **Biomaterials**, v. 32, n. 2, p. 352-365, 2011.
- D'ARRIGO, G.; BAGGETTA, R.; TRIPEPI, G. *et al.* "Effects of Vitamin E-Coated versus Conventional Membranes in Chronic Hemodialysis Patients: a Systematic Review and Meta-Analysis". **Blood Purification**, v. 43, n. 1-3, p. 101-122, 2017.
- DE BORST, M. H. "The Complement System in Hemodialysis Patients: Getting to the Heart of the Matter". **Nephron**, v. 132, n. 1, p. 1-4, 2016.
- DELLES, C.; VANHOLDER, R. "Chronic Kidney Disease". **Clinical Science**, v. 131, n. 3, p. 225-226, 2017.
- DOMINGUES, R. C. **Desenvolvimento de membranas de poli(ácido láctico) para aplicação como conduíte de guia neural**. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2017.
- EBY, C. "Standardization of APTT Reagents for Heparin Therapy Monitoring: Urgent or Fading Priority?" **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 7, 1997.

- EDENS, R. E.; LINHARDTB, R. J.; WEILERT, J. M. "Heparin Is Not just an Anticoagulant Anymore: Six and One-Half Decades of Studies on the Ability of Heparin to Regulate Complement Activity". **Complement Today. Complement Profiles**, v.1, Karger, p. 96-120, 1993.
- EKNOYAN, G.; BECK, G. J.; CHEUNG, A. K. *et al.* "Effect of Dialysis Dose and Membrane Flux in Maintenance Hemodialysis". **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2010-2019, 2002.
- ELOOT, S. **Experimental and Numerical Modeling of Hemodialysis**. Tese de D.Sc., Ghent University, Civil Engineering Department, 2004.
- FANG, B.; CHENG, C.; LI, L. *et al.* "Surface Modification of Polyethersulfone Membrane by Grafting Bovine Serum Albumin". **Fibers and Polymers**, v. 11, n. 7, p. 960-966, 2010.
- FANG, B.; LING. Q.; ZHAO, W.; *et al.* "Modification of Polyethersulfone Membrane by Grafting Bovine Serum Albumin on the Surface of Polyethersulfone/Polyacrylonitrile-co-Acrylic Acid) Blended Membrane". **Journal of Membrane Science**, v. 329, pp. 46-55, 2009.
- FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. "Improved Quantitation and Discrimination of Sulphated Glycosaminoglycans by Use of Dimethylmethylene Blue". **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 883, p. 173-177, 1986.
- FENG, X.; HUANG, R. Y. M. "Preparation and Performance of Asymmetric Polyetherimide Membranes for Isopropanol Dehydration by Pervaporation". **Journal of Membrane Science**, v. 109, n. 2, p. 165-172, 1996.
- FISSEL IV, W. H.; HUMES, H. D.; ROY, S. *et al.* **Ultrafiltration Membrane, Device, Bioartificial Organ, and Methods**. *Patent Number US 7,540,963 B2*, 2009.
- FRESENIUS MEDICAL CARE. **ESRD Patients in 2012: A Global Perspective**. 2013. Disponível em: <[http://www.vision-fmc.com/files/ESRD\\_Patients\\_in\\_2013.pdf](http://www.vision-fmc.com/files/ESRD_Patients_in_2013.pdf)> Acesso em: 16 de ago. de 2015, 16:40:24
- FRESENIUS MEDICAL CARE. **ESRD Patients in 2013: A Global Perspective**. 2014. Disponível em: <[http://www.vision-fmc.com/files/ESRD\\_Patients\\_in\\_2013.pdf](http://www.vision-fmc.com/files/ESRD_Patients_in_2013.pdf)> Acesso em: 16 ago. 2015, 15:30:32.
- FRITAMA, G. "Low Dose Heparin And The PTT". The Fritsma Factor: Your Interactive Hemostasis Resource. Disponível em: <<https://fritsmafactor.com/post/low-dose-heparin-and-ptt>> Acesso em: 24 de set. de 2018, 12:26:30.



- GAMBRO – EVODIAL®. **The First Anti-Thrombogenic Dialyzer**. 2010.
- GAO, A.; LIU, F.; XUE, L. "Preparation and Evaluation of Heparin-Immobilized Poly(Lactic Acid) (PLA) Membrane for Hemodialysis". **Journal of Membrane Science**, n 452, p. 390-399, 2014.
- GARCIA, I. L. **Tratamento Químico de Superfícies de Poliuretano de Grau Médico para Imobilização de Componentes não Trombogênicos**. Dissertação de M.Sc., Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 1995.
- GARCÍA, M. G.; MARCHESE, J.; OCHOA, N. A. "Improved Gas Selectivity of Polyetherimide Membrane by the Incorporation of PIM Polyimide Phase". **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 14, 2017.
- GARIMELLA, N.; WU, Z.; GRIFFITH, B. **Biocompatible coating compositions**. *Patent Number WO2014107690A1*, 2014.
- GOTT, V. L.; WHIFFEN, J. D.; DUTTON, R. C. "Heparin Bonding on Colloidal Graphite Surfaces". **Science**, v. 142, n. 3597, p. 1297-1298, 1963.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. Série Escola Piloto em Engenharia Química, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro: E-papers, 2006.
- HAKIM, R. "Clinical Implications of Hemodialysis Membrane Biocompatibility". **Kidney International**, v. 44, pp. 484-494, 1993.
- HAYAMA, M.; YAMAMOTO, K. I.; KOHORI, F. *et al.* "How Polysulfone Dialysis Membrane Containing Polyvinylpyrrolidone Achieve Excellent Biocompatibility?" **Journal of Membrane Science**, v. 234, pp. 41-49, 2004.
- HEBBAR, R. S.; ISLOOR, A. M.; ISMAIL, A. F. *et al.* "Probing the Morphology and Anti-Organic Fouling Behaviour of a Polyetherimide Membrane Modified with Hydrophilic Organic Acids as Additives". **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 6141-6150, 2015.
- HEBBAR, R. S.; ISLOOR, A. M.; ZULHAIRUN, A. K. *et al.* "Efficient Treatment of Hazardous Reactive Dye Effluents Through Antifouling Polyetherimide Hollow Fiber Membrane Embedded with Functionalized Halloysite Nanotubes". **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 72, p. 244-252, 2017.
- HOENICH, N. A. "Update on the Biocompatibility of Hemodialysis Membranes". **Hong Kong Journal of Nephrology**, v. 6, n. 2, p. 74 – 78, 2004.

- HO, W. S. W.; SIRKAR, K. K. *Membrane Handbook*. Nova Iorque: **Van Nostrand Reinhold**, p. 161-185, 1992.
- HUANG, X. J.; GUDURU, D.; XU, Z. K. *et al.* "Blood Compatibility and Permeability of Heparin-Modified Polysulfone as Potential Membrane for Simultaneous Hemodialysis and LDL Removal". **Macromolecular Bioscience**, vol. 11, p. 131-140, 2011.
- HUANG, X. J.; GUDURU, D.; XU, Z. K. *et al.* "Immobilization of Heparin on Polysulfone Surface for Selective Adsorption of Low-Density Lipoprotein (LDL)". **Acta Biomaterialia**, vol. 6, pp. 1099-1106, 2010.
- HUANG, Z. H.; McDONALD, W. F.; WRIGHT, S. C. *et al.* **Antithrombogenic Polymer Coating**. *Patent Number US 2002/0068183 A1*, 2002.
- HURAIB, S.; TANIMU, D.; SHAHEEN, F. *et al.* "Effect of Vitamin-E-Modified Dialysers on Dialyser Clotting, Erythropoietin and Heparin Dosage: a Comparative Crossover Study". **American Journal of Nephrology**, v. 20, n. 5, p. 364-368, 2000.
- HURWITZ, G.; GUILLEN, G. R.; HOEK, E. M. V. "Probing Polyamide Membrane Surface Charge, Zeta Potential, Wettability, and Hydrophilicity with Contact Angle Measurements". **Journal of Membrane Science**, v. 349, p. 349-357, 2010.
- IRFAN, M.; IDRIS, A. "Overview of PES biocompatible/hemodialysis membranes: PES-blood Interactions and Modification Techniques". **Materials Science and Engineering C**, *Article in Press*, 2015.
- IRFAN, M.; IDRIS, A.; YUSOF, N. M. *et al.* "Surface Modification and Performance Enhancement of nano-hybrid f-MWCNT/PVP90/PES Hemodialysis Membranes". **Journal of Membrane Science**, v. 467, p. 73-84, 2014.
- ISO 10993-4. "Biological Evaluation of Medical Devices – Part 4: Selection of Tests for Interaction with Blood". **International Organization for Standardization**, Genebra, Suíça, 2017.
- ISO 8637-1. "Extracorporeal Systems for Blood Purification -- Part 1: Haemodialysers, Haemodiafilters, Haemofilters and Haemoconcentrators". **International Organization for Standardization**, Genebra, Suíça, 2010.
- JEE, K. S.; PARK, H. D., PARK, K. D. *et al.* "Heparin Conjugated Polylactide as a Blood Compatible Material". **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1877-1881, 2004.

- JIANG, J. H.; ZHU, L. P.; LI, X. L. *et al.* "Surface Modification of PE Porous Membranes Based on the Strong Adhesion of Polydopamine and Covalent Immobilization of Heparin". **Journal of Membrane Science**, v. 364, n. 1-2, p. 194-202, 2010.
- JI, H. F.; XIONG, L.; SHI, Z. Q. *et al.* "Engineering of Hemocompatible and Antifouling Polyethersulfone Membranes by Blending with Heparin-Mimicking Microgels". **Biomaterials Science**, v. 5, n. 6, p. 1112-1121, 2017.
- JINGRUN, R.; JIN, W., HONG, S. *et al.* "Surface Modification of Polyethylene Terephthalate with Albumin and Gelatin for Improvement of Anticoagulation and Endothelialization". **Applied Surface Science**, v. 255, n. 2, p. 263-266, 2008.
- JOHN, A. A.; SUBRAMANIAN, A. P.; VELLAYAPPAN, M. V. *et al.* "Review: Physico-Chemical Modification as a Versatile Strategy for the Biocompatibility Enhancement of Biomaterials". **RSC Advances**, v. 5, pp. 39323-39244, 2015.
- JOHNSON, R. O.; BURLHIS, H. S. "Polyetherimide: a New High-Performance Thermoplastic Resin". **Journal of Polymer Science: Polymer Symposium**, v. 70, pp. 129-143, 1983.
- KANAGARAJ, P.; NAGENDRAN, A.; RANA, D. *et al.* "Effects of Polyvinylpyrrolidone on the Permeation and Fouling-Resistance Properties of Polyetherimide Ultrafiltration Membranes". **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 17, p. 4832-4838, 2015.
- KANG, I. K.; SEO, E. J.; HUH, M. W. *et al.* "Interaction of Blood Components with Heparin Immobilized Polyurethanes Prepared by Plasma Glow Discharge". **Journal of Biomaterials Science**, v. 12, n. 10, pp. 1091-1108, 2001.
- KARA, F.; AKSOY, E. A.; CALAMAK, S. *et al.* "Immobilization of Heparin on Chitosan-Grafted Polyurethane Films to Enhance Anti-Adhesive and Antibacterial Properties". **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 31, n. 1, p. 72-90, 2016.
- KEIL, L. B.; JIMENEZ, E.; GUMA, M. *et al.* "Biphasic Response of Complement to Heparin: Fluid-Phase Generation of Neoantigens in Human Serum and in a Reconstituted Alternative Pathway Amplification Cycle". **American Journal of Hematology**, v. 50, n. 4, p. 254-262, 1995.
- KIM, I. C.; LEE, K. H. "Effect of Poly (Ethylene Glycol) 200 on the Formation of a Polyetherimide Asymmetric Membrane and its Performance in Aqueous Solvent Mixture Permeation". **Journal of Membrane Science**, v. 230, n. 1-2, p. 183-188, 2004.

- KNEIFEL, K.; PEINEMANN, K. V. "Preparation of Hollow Fiber Membranes from Polyetherimide for Gas Separation". **Journal of Membrane Science**, v. 65, n. 3, p. 295-307, 1992.
- LI, J.; HUANG, X. J.; JI, J. *et al.* "Covalent Heparin Modification of a Polysulfone Flat Sheet Membrane for Selective Removal of Low-Density Lipoproteins: A Simple and Versatile Method". **Macromolecular Bioscience**, vol. 11, pp. 1218-1226, 2011.
- LIU, T. Y.; LIN, W. C.; HUANG, L. Y. *et al.* "Hemocompatibility and Anaphylatoxin Formation of Protein-Immobilizing Polyacrylonitrile Hemodialysis Membrane". **Biomaterials**, v. 26, n. 12, p. 1437-1444, 2005.
- LIU, Z.; DENG, X.; WANG, M. *et al.* "BSA-Modified Polyethersulfone Membrane: Preparation, Characterization and Biocompatibility". **Journal of Biomaterials Science**, v. 20, pp. 377-397, 2009.
- LIN, W. C.; TSENG, C. H.; YANG, M. C. "In-Vitro Hemocompatibility Evaluation of a Thermoplastic Polyurethane Membrane with Surface-Immobilized Water-Soluble Chitosan and Heparin". **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 10, p. 1013-1021, 2005.
- LOGAREZZI, A. J. M. **Síntese e Caracterização de Membranas de Acetato de Celulose para Aplicação no Rim Artificial**. Dissertação de M.Sc., Instituto de Macromoléculas/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1984.
- LÜTZOW, K.; WEIGEL, Th.; LENDLEIN, A. "Poly(ether imide) Scaffolds as Multifunctional Materials for Potential Applications in Regenerative Medicine". **Artificial Organs**, v. 30, n. 10, pp. 764-769, 2006.
- MADUELL, F.; VARAS, J.; RAMOS, R. *et al.* "Hemodiafiltration Reduces All-Cause and Cardiovascular Mortality in Incident Hemodialysis Patients: a Propensity-Matched Cohort Study". **American Journal of Nephrology**, v. 46, n. 4, p. 288-297, 2017.
- MAHLICLI, F. Y.; ALTINKAYA, S. A. "Immobilization of Alpha Lipoic Acid Onto Polysulfone Membranes to Suppress Hemodialysis Induced Oxidative Stress". **Journal of Membrane Science**, v. 449, p. 27-37, 2014.
- MA, L.; SU, B.; CHENG, C. *et al.* "Toward Highly Blood Compatible Hemodialysis Membranes via Blending with Heparin-Mimicking Polyurethane: Study *in vitro* and *in vivo*". **Journal of Membrane Science**, v. 470, pp. 90-101, 2014.
- MAO, C.; QIU, Y.; SANG, H. *et al.* "Various Approaches to Modify Biomaterial Surfaces for Improving Hemocompatibility". **Advances in Colloid and Interface Science**, n. 110, pp. 5-17, 2004.

- MARCONI, W.; BENVENUTI, F.; PIOZI, A. "Covalent Bonding of Heparin to a Vinyl Copolymer for Biomedical Applications". **Biomaterials**, v. 18, pp. 885-890, 1997.
- MATSUDA, T.; ITO, S. "Surface Coating of Hydrophilic – Hydrophobic Block Co-Polymers on a Poly(acrylonitrile) Haemodialyser Reduces Platelet Adhesion and Its Transmembrane Stimulation". **Biomaterials**, v. 15, n. 6, pp. 417-422, 1994.
- MATTHIASON, E. "The Rule of Macromolecular Adsorption in Fouling of Ultrafiltration Membranes". **Journal of Membrane Science**, v. 16, pp. 23-36, 1983.
- MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. **Peritoneal Dialysis**. 2017. Disponível em: < <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/peritoneal-dialysis/multimedia/peritoneal-dialysis/img-20007797>> Acesso em: 16 de set. de 2018, 14:32:33.
- MEL, A. de; RAFIEI, Y.; COUSINS, B. G. "Modifying Biomaterials Surfaces to Optimise Interactions with Blood". In: Williams, R. (ed.), **Surface Modification of Biomaterials: Methods, Analysis and Applications**, Woodhead Publishing Limited, 2011.
- MICHANETZIS, G. P. A.; KATSALA, N.; MISSIRLIS, Y. F. "Comparison of Haemocompatibility Improvement of Four Polymeric Biomaterials by Two Heparinization Techniques". **Biomaterials**, v. 24, pp. 677-688, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR); CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. **Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**. Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil, v. 150, n. 112, 2013.
- MITTAL, K. L. **Polyimides and Other High Temperature Polymers: Synthesis, Characterization and Applications**. 1ª ed., CRC Press Book, v. 3, 2005.
- MOACHON, N.; THOMAS, M. **Membrane Unit Element, Semipermeable Membrane, Filtration Device, and Processes for Manufacturing the Same**. *Patent Number* US 8118176 B2.
- MOLLNES, T. E.; VIDEM, V., CHRISTIANSEN, D. *et al.* "Platelet compatibility of an artificial surface modified with functionally active heparin". **Thrombosis and Haemostasis**, v. 81, n. 03, p. 1132-1136, 1999.
- MONTANARI, T. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3.ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 229 p. 2016. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/livrodehisto>> Acesso em: 16 de set. 2018, 13:30:24.

- MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2<sup>a</sup> ed., Kluwer Academic Publishers, 1996.
- MULLICK, S.; CHANG, W.; CHEN, H. *et al.* **Antithrombogenic Hollow Fiber Membranes and Filters**. *Patent Number US 8,877,062 B2*, 2014.
- MUNSHI, R.; AHMAD, S. "Comparison of Urea Clearance in Low-efficiency Low-flux vs. High-efficiency High-flux Dialyzer Membrane with Reduced Blood and Dialysate Flow: An in Vitro Analysis". **Hemodialysis International**, v. 18, n. 1, p. 172-174, 2014.
- MURUGESAN, S.; XIE, J.; LINHARDT, R. J. "Immobilization of Heparin: Approaches and Applications". **Current Topics in Medicinal Chemistry**, n. 8, pp. 80-100, 2008.
- MRABET, Y. **Simplified Hemodialysis Circuit**. 2008. Disponível em <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hemodialysis-en.svg>> Acesso em: 16 de set. de 2018, 15:16:59.
- NADY, N.; FRANSSSEN, M. C. R.; ZUILHOF, H. *et al.* "Modification Methods for Poly(arylsulfone) Membranes: A Mini-Review Focusing on Surface Modification". **Desalination**, v. 275, pp. 1-9, 2011.
- NAIM, R.; ISMAIL, A. F., CHEER, N. B. *et al.* "Polyvinylidene Fluoride and Polyetherimide Hollow Fiber Membranes for CO<sub>2</sub> Stripping in Membrane Contactor". **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 7, p. 1391-1398, 2014.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Urinary (Male)**. 2001. Disponível em: <<https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=1778>> Acesso em: 16 de set. de 2018, 13:36:09.
- NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **A Clinical Update on Dialyzer Membranes: State-of-the-Art Considerations for Optimal Care in Hemodialysis**. 2013. Disponível em: <[http://www.kidney.org/professionals/tools/pdf/02-10-6050\\_FBD\\_Clinical\\_bulletin.pdf](http://www.kidney.org/professionals/tools/pdf/02-10-6050_FBD_Clinical_bulletin.pdf)> Acesso em: 05 out. 2013.
- NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **Peritoneal Dialysis: What You Need to Know**. 2014. Disponível em <<https://www.kidney.org/atoz/content/peritoneal>> Acesso em: 16 de set. de 2018, 14:52:59.
- NETO, M. C.; SANTOS, B. F. C. "Revisão/Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Biocompatibilidade de Membranas na Insuficiência Renal Aguda". **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 18, n. 4, p. 415-423, 1996.

- NIE, S.; TANG, M.; YIN, Z. *et al.* "Biologically Inspired Membrane Design with a Heparin-Like Interface: Prolonged Blood Coagulation, Inhibited Complement Activation, and Bio-artificial Liver Related Cell Proliferation". **Biomaterials Science**, v. 2, n. 1, p. 98-109, 2014.
- NUBÉ, M. J.; PETERS, S. A.; BLANKESTIJN, P. J. *et al.* "Mortality Reduction by Post-Dilution Online-Haemodiafiltration: a Cause-Specific Analysis". **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 3, p. 548-555, 2016.
- OFSTHUN, N. J.; KAROOR, S.; SUZUKI, M. "Hemodialysis Membranes". In: Li, N. N.; Fane, A. G.; Ho, W. S. W.; Matsuura, T. (eds), **Advanced Membrane Technology and Applications**, cap. 19, New Jersey, John Wiley & Sons, p. 489-517, 2008.
- ONAT, A.; HERGENÇ, G.; CAN, G. *et al.* "Serum Complement C3: a Determinant of Cardiometabolic Risk, Additive to the Metabolic Syndrome, in Middle-Aged Population". **Metabolism**, v. 59, n. 5, p. 628-634, 2010.
- OPENSTAX COLLEGE. **Blood Flow in the Nephron**. 2013. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2611\\_Blood\\_Flow\\_in\\_the\\_Nephron.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2611_Blood_Flow_in_the_Nephron.jpg)> Acesso em: 16 de set. 2018, 14:10:06.
- OSHVANDI, K.; KAVYANNEJAD, R.; BORZUO, S. R. *et al.* "High-flux and Low-flux Membranes: Efficacy in Hemodialysis". **Nursing and Midwifery Studies**, v. 3, n. 3, 2014.
- OLSSON, P.; SANCHEZ, J.; MOLLNES, T. E. *et al.* "On the Blood Compatibility of End-Point Immobilized Heparin". **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 11, n. 11, p. 1261-1273, 2000.
- OTHMAN, N. H.; NOOR, A. M.; YUSOFF, M. S. A. *et al.* "Effect of Bore Fluid Composition on Structural and Performance of Polyphenylsulfone Hollow Fiber Membrane Contactor for Deacidification of Crude Palm Oil". **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 21, n. 3, p. 633-642, 2017.
- PAL, S. **Design of Artificial Human Joints & Organs**. Nova Iorque: Springer, 2014.
- PANZARINI, L. C. G. A. **Estudo da Enxertia e Heparinização Simultâneas do Poli(cloreto de vinila) via Radiação Gama**. Tese de D.Sc., IPEN/USP, São Paulo, SP, Brasil, 2003.
- PANZARINI, L. C. G. A.; GUEDES, S. M. L. "Caracterização De Filmes De PVC Enxertados e Heparinizados via Radiação Gama por Espectroscopia FTIR". In: **8º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Águas de Lindóia, SP, 2005.

- PEINEMANN, K. V.; FINK, K.; WITT, P. "Asymmetric Polyetherimide Membrane for Helium Separation". **Journal of Membrane Science**, v. 27, n. 2, p. 215-216, 1986.
- PELUSO, G.; PETILLO, O.; AMBROSIO, L.; NICOLAIS, L. "Polyetherimide as Biomaterial: preliminary *in vitro* and *in vivo* biocompatibility testing". **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 5, pp. 738-742, 1994.
- PEREIRA, C. C.; NOBREGA, R.; BORGES, C. P. "Spinning Process Variables and Polymer Solution Effects in the Die-Swell Phenomenon During Hollow Fiber Membranes Formation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 4-7, p. 599-606, 2000.
- PIERONI, L.; MORTERA, S. L.; GRECO, V. *et al.* "Biocompatibility Assessment of Haemodialysis Membrane Materials by Proteomic Investigations". **The Royal Society of Chemistry, Molecular BioSystems**, 2015.
- PORTAL BRASIL. **Investimentos em Tecnologia têm Permitido Independência Científica na Saúde**. 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/07/investimentos-em-tecnologia-tem-permitido-independencia-cientifica-na-saude>> Acesso em: 16 ago. 2015.
- QIAN, Q.; NATH, K. A., WU, Y. *et al.* "Hemolysis and Acute Kidney Failure". **American Journal of Kidney Diseases**, v. 56, n. 4, p. 780-784, 2010.
- QTAISHAT, M.; RANA, D.; KHAYET, M. *et al.* "Preparation and Characterization of Novel Hydrophobic/Hydrophilic Polyetherimide Composite Membranes for Desalination by Direct Contact Membrane Distillation". **Journal of Membrane Science**, v. 327, n. 1-2, p. 264-273, 2009.
- REN, X.; XU, L.; XU, J. *et al.* "Immobilized Heparin and its Anti-Coagulation Effect on Polysulfone Membrane Surface". **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 24, n. 15, p. 1707-1720, 2013.
- RIOUX, J. P.; BARGMAN, J. M.; CHAN, C. T. "Systematic Differences Among Patients Initiated on Home Haemodialysis and Peritoneal Dialysis: the Fallacy of Potential Competition". **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 7, p. 2364-2367, 2010.
- RODRIGUEZ-RIBERA, L.; CORREDOR, Z.; SILVA, I. *et al.* "Vitamin E-coated Dialysis Membranes Reduce the Levels of Oxidative Genetic Damage in Hemodialysis Patients". **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 815, p. 16-21, 2017.



- ROESINK, H. D. W.; BEERLAGE, M. A. M.; POTMAN, W. *et al.* "Characterization of New Membrane Materials by Means of Fouling Experiments Adsorption of BSA on Polyetherimide - Polyvinylpyrrolidone Membranes. **Colloids and Surfaces**, v. 55, p. 231-243, 1991.
- ROMÃO JUNIOR, J. E. "Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação". **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 3, supl. 1, p. 1-3, 2004.
- RONCO, C.; CREPALDI, C.; BENDOLAN, A. *et al.* "Evolution of Synthetic Membranes for Blood Purification: the Case of the Polyflux Family". **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. suppl\_7, p. vii10-vii20, 2003.
- RONCO, C.; NERI, M., LORENZIN, A. *et al.* "Multidimensional Classification of Dialysis Membranes". In: **Expanded Hemodialysis**. Karger Publishers, p. 115-126, 2017.
- SÄILYNOJA, E.; KOSKINEN, M.; SALONEN, J. *et al.* "Immobilization of a Biological Active Coating on a Hydrophobic L-Lactide-ε-Caprolactone Copolymer". **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, p. 703-705, 1999.
- SALJOUGH, E.; AMIRILARGANI, M.; MOHAMMADI, T. "Effect of Poly (vinyl pyrrolidone) Concentration and Coagulation Bath Temperature on the Morphology, Permeability, and Thermal Stability of Asymmetric Cellulose Acetate Membranes". **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 5, p. 2537-2544, 2009.
- SANTOS, A. M. **Desenvolvimento de Membranas de Poli(éter imida) Funcionalizadas para Aplicação em Hemodiálise**. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2014.
- SANTOS, A. M. dos; HABERT, A. C.; FERRAZ, H. C. "Development of Functionalized Polyetherimide/Polyvinylpyrrolidone Membranes for Application in Hemodialysis". **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 9, p. 131, 2017.
- SANTOS, L. M. C. **Síntese e Caracterização de Membranas de Acetato de Celulose para Diálise e Ultrafiltração Sanguínea**. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1988.
- SASAKI, M. "Development of Vitamin E-modified Polysulfone Membrane Dialyzers". **Journal of Artificial Organs**, v. 9, n. 1, p. 50-60, 2006.
- SASAKI, M.; HOSOYA, N.; SARUHASHI, M. "Development of Vitamin E-modified Membrane". In: **Vitamin E-Bonded Membrane**. Karger Publishers, p. 49-70, 1999.

- SATOH, M.; YAMASAKI, Y.; NAGAKE, Y. *et al.* "Oxidative Stress is Reduced by the Long-term Use of Vitamin E-Coated Dialysis Filters". **Kidney International**, v. 59, n. 5, p. 1943-1950, 2001.
- SEDIGH, M. G.; XU, L.; TSOTSIS, T. T. *et al.* "Transport and Morphological Characteristics of Polyetherimide-Based Carbon Molecular Sieve Membranes". **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 9, p. 3367-3380, 1999.
- SEIFERT, B.; MIHANETZIS, G.; GROTH, T.; ALBRECHT, W.; RICHAU, K.; MISSIRLIS, Y.; PAUL, D.; VON SENGBUSCH, G. "Polyetherimide: a New Membrane-Forming Polymer for Biomedical Applications". **Artificial Organs**, v. 26, n. 2, pp. 189-199, 2002.
- SENTHILKUMAR, S.; RAJESH, S.; JAYALAKSHMI, A. *et al.* "Preparation and Performance Evaluation of Poly (ether-imide) Incorporated Polysulfone Hemodialysis Membranes". **Journal of Polymer Research**, 19:9867, 2012.
- SENTHILKUMAR, S.; RAJESH, S.; JAYALAKSHMI, A.; AISHWARYA, G.; MOHAN, D. R. "Biocompatibility Studies of Polyacrylonitrile membranes modified with carboxylated polyetherimide". **Materials Science and Engineering C**, v. 33, pp. 3615-3626, 2013.
- SESSO, R.; LOPES, A. A., THOMÉ, F. S. *et al.* "Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016". **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 3, p. 261-266, 2017.
- SHEN, L. Q.; XU, Z. K.; LIU, Z. M. *et al.* "Ultrafiltration Hollow Fiber Membranes of Sulfonated Polyetherimide/Polyetherimide Blends: Preparation, Morphologies and Anti-Fouling Properties". **Journal of Membrane Science**, v. 218, n. 1-2, p. 279-293, 2003.
- SHI, W.; HE, G., LIU, H. *et al.* "Fabrication of Polyetherimide Microporous Membrane Using Supercritical CO<sub>2</sub> Technology and its Application for Affinity Membrane Matrix". **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 85, p. 151-158, 2014.
- SILVA, J. R. R. F. da. **Transferência de Massa em Diálise: Estudo do Efeito da Hidrodinâmica do Escoamento**. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1991.
- SON, M.; KIM, H.; JUNG, J. *et al.* "Influence of Extreme Concentrations of Hydrophilic Pore-Former on Reinforced Polyethersulfone Ultrafiltration Membranes for Reduction of Humic Acid Fouling". **Chemosphere**, v. 179, p. 194-201, 2017.

- STAMATIALLIS, D. F.; PAPENBURG, B. J.; GIRONÉS, M. *et al.* "Medical Applications of Membranes: Drug Delivery, Artificial Organs, and Tissue Engineering". **Journal of Membrane Science**, v. 308, p. 1-34, 2008.
- STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Analytical Techniques in the Sciences, John Wiley & Sons, 2004.
- SU, B.; SUN, S.; ZHAO, C. "Polyethersulfone Hollow Fiber Membranes for Hemodialysis". **Progress in Hemodialysis - From Emergent Biotechnology to Clinical Practice**. Intech, p. 65-92, 2011.
- SUN, S.; YUE, Y.; HUANG, X. *et al.* "Protein Adsorption on Blood-Contact Membranes". **Journal of Membrane Science**, v. 222, pp. 3-18, 2003.
- SUTHANTHIRAN, M.; STROM, T. B. "Renal Transplantation". **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 6, p. 365-376, 1994.
- TANG, M.; XUE, J.; YAN, K. *et al.* "Heparin-Like Surface Modification of Polyethersulfone Membrane and its Biocompatibility". **Journal of Colloid and Interface Science**, v 386, pp. 428-440, 2012.
- TAN, W.; WANG, Q.; XIN, G.; *et al.* "Different Hemodialysis Methods for Survival of Patients with Maintenance Hemodialysis: a Meta-Analysis". **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 11, n. 5, p. 4389-4396, 2018.
- TAO, C. T.; YOUNG, T. H. "Polyetherimide Membrane Formation by the Cononsolvent System and its Biocompatibility of MG63 Cell Line". **Journal of Membrane Science**, v. 269, n. 1-2, p. 66-74, 2006.
- TARSA, Z. A.; HEDAYAT, S.; RAHBARI-SISAKHT, M. "Fabrication and Characterization of Polyetherimide Hollow Fiber Membrane Contactor for Carbon Dioxide Stripping from Monoethanolamine Solution". **Journal of Membrane Science and Research**, v. 1, n. 3, p. 118-123, 2015.
- TOMO, T. "Flux of Dialysis Membrane: Benefit and Risk". In: **The Essentials of Clinical Dialysis**. Springer, Singapura, p. 81-84, 2018.
- TRIMPERT, C.; BOESE, G.; ALBRECHT, W.; RICHAU, K.; WEIGEL, TH.; LENDLEIN, A.; GROTH, T. "Poly(ether imide) Membranes Modified with Poly(ethylene imine) as Potential Carriers for Epidermal Substitutes". **Macromolecular Bioscience**, v. 6, pp. 274-284, 2006.
- TSANG, R.; OSAKI, S. **Non-Thrombogenic Coating Composition and Methods for using Same**. *Patent Number 5,955,588*, 1999.

- TZONEVA, R.; SEIFERT, B.; ALBRECHT, W.; RICHAU, K.; GROTH, T.; LENDLEIN, A. "Hemocompatibility of Poly(ether imide) Membranes Functionalized with Carboxylic Groups". **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, pp. 3203-3210, 2008a.
- TZONEVA, R.; SEIFERT, B.; ALBRECHT, W.; RICHAU, K.; LENDLEIN, A.; GROTH, T. "Poly(ether imide) Membranes: Studies on the Effect of Surface Modification and Protein Pre-Adsorption on Endothelial Cell Adhesion, Growth and Function". **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 19, n. 7, pp. 837-852, 2008b.
- VACCHI, M. **Filter for hemodialysis Year 1980**. 2012. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Filtro\\_per\\_emedialisi.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Filtro_per_emedialisi.JPG)> Acesso em: 16 de set. de 2018, 15:18:50.
- VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; RAMÍREZ, L. *et al.* "Prophylactic or Therapeutic Administration of *Agaricus blazei* Murill is Effective in Treatment of Murine Visceral Leishmaniasis". **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 228-236, 2012.
- VAN DE WITTE, P.; DIJKSTRA, P. J.; VAN DEN BERG, J. W. A. *et al.* "Phase Separation Processes in Polymer Solutions in Relation to Membrane Formation". **Journal of Membrane Science**, v. 117, n. 1-2, p. 1-31, 1996.
- VERHOEVEN, M.; CAHALAN, L. L.; HENDRIKS, M. *et al.* **Method for Making Heparinized Biomaterials**. *Patent Number* US 5679659 A, 1997.
- VERMA, S. K.; MODI, A., SINGH, A. K. *et al.* "Improved Hemodialysis with Hemocompatible Polyethersulfone Hollow Fiber Membranes: In Vitro Performance". **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 3, p. 1286-1298, 2018.
- WANG, D.; LI, K.; TEO, W. K. "Preparation and Characterization of Polyetherimide Asymmetric Hollow Fiber Membranes for Gas Separation". **Journal of Membrane Science**, v. 138, n. 2, p. 193-201, 1998.
- WANG, H.; YU, T.; ZHAO, C. *et al.* "Improvement of Hydrophilicity and Blood Compatibility on Polyethersulfone Membrane by Adding Polyvinylpyrrolidone". **Fibers and Polymers**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2009.
- WANG, W.; ZHENG, Z.; HUANG, X. *et al.* "Hemocompatibility and Oxygenation Performance of Polysulfone Membranes Grafted with Polyethylene Glycol and Heparin by Plasma-Induced Surface Modification". **Journal of Biomedical**

**Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 7, p. 1737-1746, 2017.

WARD, R. A. "Protein-Leaking Membranes for Hemodialysis: A New Class of Membranes in Search of an Application?" **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, p. 2421–2430, 2005.

WLAZLO, N.; VAN GREEVENBROEK, M. M.; FERREIRA, I. *et al.* "Complement Factor 3 is Associated with Insulin Resistance and with Incident Type 2 Diabetes Mellitus over a 7-Year Follow-Up Period: the CODAM Study". **Diabetes Care**, p. DC\_132804, 2014.

WEBER, M.; STEINLE, H.; GOLOMBEK, S. *et al.* "Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility". **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, 2018.

WEBER, N.; WENDEL, H. P.; ZIEMER, G. "Hemocompatibility of Heparin-Coated Surfaces and the Role of Selective Plasma Protein Adsorption". **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 429-439, 2002.

WEBER, N.; WENDEL, H. P.; ZIEMER, G. "Quality Assessment of Heparin Coatings by their Binding Capacities of Coagulation and Complement Enzymes". **Journal of Biomaterials Applications**, v. 15, n. 1, p. 8-22, 2000.

WENDEL, H. P.; ZIEMER, G. "Coating-Techniques to Improve the Hemocompatibility of Artificial Devices Used for Extracorporeal Circulation". **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 16, n. 3, p. 342-350, 1999.

WECHS, F.; GEHLEN, A.; HARTEN, B. von; KRUGER, R.; SCHUSTER, O. **Dialysis Membrane with Improved Removal of Middle Molecules**. *Patent Number US 8,651,284 B2*, 2014.

WIDMAIER, E. P.; HERSHEL R., KEVIN T. S. **Vander, Sherman, & Luciano's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function**. 9 ed., Universidade de Michigan: Mc-Graw Hill Higher Education, 2004.

WOODS, H. F.; NANDAKUMAR, M. "Improved Outcome for Haemodialysis Patients Treated with High-flux Membranes". **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, n. suppl\_1, p. 36-42, 2000.

XIE, B.; Zhang, R., Zhang, H. *et al.* "Decoration of Heparin and Bovine Serum Albumin on Polysulfone Membrane Assisted via Polydopamine Strategy for Hemodialysis". **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 9, p. 880-897, 2016.

- XU, Z. L.; CHUNG, T. S.; LOH, K. C. *et al.* "Polymeric Asymmetric Membranes Made from Polyetherimide/Polybenzimidazole/Poly (Ethylene Glycol)(PEI/PBI/PEG) for Oil–Surfactant–Water Separation". **Journal of Membrane Science**, v. 158, n. 1-2, p. 41-53, 1999.
- YAMASHITA, A. C.; SAKURAI, K. "Dialysis Membranes - Physicochemical Structures and Features". In: **Updates in Hemodialysis**. InTech, 2015.
- YANG, C. C.; HSU, S. P.; WU, M. S. *et al.* "Effects of Vitamin C Infusion and Vitamin E-coated Membrane on Hemodialysis-Induced Oxidative Stress". **Kidney International**, v. 69, n. 4, p. 706-714, 2006.
- YANG, M. C.; LIN, W. C. "Protein Adsorption and Platelet Adhesion of Polysulfone Membrane Immobilized with Chitosan and Heparin Conjugated". **Polymers and Advanced Technologies**, v. 14, n. 2, pp. 103-113, 2003.
- YEUN, J. Y.; DEPNER, T. A. "Principles of Hemodialysis". In: **Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation**. Elsevier Inc., 2010.
- YUAN, Y.; LEE, T. R. "Contact Angle and Wetting Properties". In: **Surface Science Techniques**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 3-34, 2013.
- YUAN, Z.; DAN-LI, X. "Porous PVDF/TPU Blends Asymmetric Hollow Fiber Membranes Prepared with the Use of Hydrophilic Additive PVP (K30)". **Desalination**, v. 223, n. 1-3, p. 438-447, 2008.
- ZAILANI, M. Z.; ISMAIL, A. F.; SHEIKH ABDUL KADIR, S. H. *et al.* "Hemocompatibility Evaluation of Poly (1, 8-octanediol citrate) Blend Polyethersulfone Membranes". **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 5, p. 1510-1520, 2017.
- ZHANG, Q.; LU, X., LIU, J. *et al.* "Preparation and Preliminary Dialysis Performance Research of Polyvinylidene Fluoride Hollow Fiber Membranes". **Membranes**, v. 5, n. 1, p. 120-135, 2015.
- ZHANG, Q.; LU, X.; ZHANG, Q. *et al.* "Flux and Passage Enhancement in Hemodialysis by Incorporating Compound Additive into PVDF Polymer Matrix". **Membranes**, v. 6, n. 4, p. 45, 2016.
- ZHANG, Y.; ZHONG, M.; LUO, B. *et al.* "The Performance of Integrally Skinned Polyetherimide Asymmetric Nanofiltration Membranes with Organic Solvents". **Journal of Membrane Science**, v. 544, p. 119-125, 2017.

- ZHAO, C.; XUE, J.; RAN, F. *et al.* "Modification of Polyethersulfone membranes – a Review of Methods". **Progress in Materials Science**, v. 58, pp. 76-150, 2013.
- ZHU, L. P.; JIANG, J. H.; ZHU, B. K. *et al.* "Immobilization of Bovine Serum Albumin onto Porous Polyethylene Membranes using Strongly Attached Polydopamine as a Spacer". **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 111-118, 2011.
- ZHU, L.; LIU, F., YU, X. *et al.* "Poly (lactic acid) Hemodialysis Membranes with Poly (lactic acid)-block-poly (2-hydroxyethyl methacrylate) Copolymer as Additive: Preparation, Characterization, and Performance". **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 32, p. 17748-17755, 2015.
- ZIMMERMANN, M.; OTTO, V.; SCHULZE, S. **Device for Purifying Solutions Containing Proteins and Use of the Device**. *Patent Number* 6,090,292, 2000.

# ANEXO A – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE SÍNTESE DAS FIBRAS OCAS

<b>Fiação 1</b>	
Sistema polimérico	PEI/PVP/NMP (12%/10%/78%)
Composição do líquido interno	Água
	Água : NMP (1:1)
Pressão da solução polimérica	3 bar
Vazão de líquido interno	2,5 mL/min
	3,41 mL/min
Vazão da solução polimérica	2,2 g/min

Condição	DEB (cm)	Velocidade de fiação (cm/s)	Tempo de exposição (s)
1	35	3,38	10,36
2	46	3,38	13,61

<b>Fiação 2</b>	
Sistema polimérico	PEI/PVP/NMP (15%/05%/80%)
Composição do líquido interno	Água
	Água : NMP (1:1)
Pressão da solução polimérica	2 bar
	1 bar
Vazão de líquido interno	8,48 mL/min
	7,32 mL/min
Vazão da solução polimérica	7,94 g/min
	4,06 g/min



Condição	DEB (cm)	Velocidade de fiação (cm/s)	Tempo de exposição (s)
1	40	6,43	6,22
2	40	6,43	6,22

<b>Fiação 3</b>	
Sistema polimérico	PEI/PVP/NMP (15%/10%/75%)
Composição do líquido interno	Água
	Água : NMP (1:1)
Pressão da solução polimérica	4 bar
Vazão de líquido interno	4,08 mL/min
	1,93 mL/min
Vazão da solução polimérica	2,97 g/min

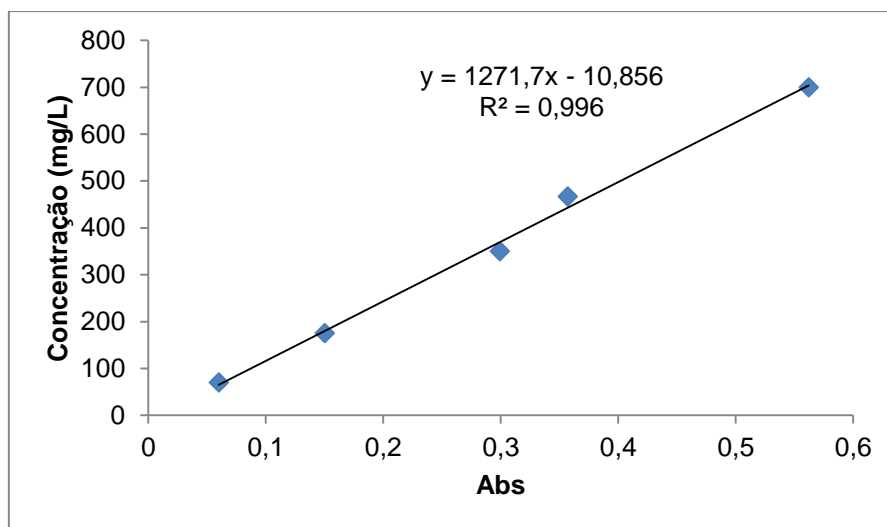
Condição	DEB (cm)	Velocidade de fiação (cm/s)	Tempo de exposição (s)
1	40	3,06	13,07
2	40	3,06	13,07

<b>Fiação 4</b>	
Sistema polimérico	PEI/PVP/NMP (12%/05%/83%)
Composição do líquido interno	Água
	Água : NMP (1:1)
Pressão da solução polimérica	1 bar
Vazão de líquido interno	4,12 mL/min
	2,61 (2,93)mL/min
Vazão da solução polimérica	7,02 g/min

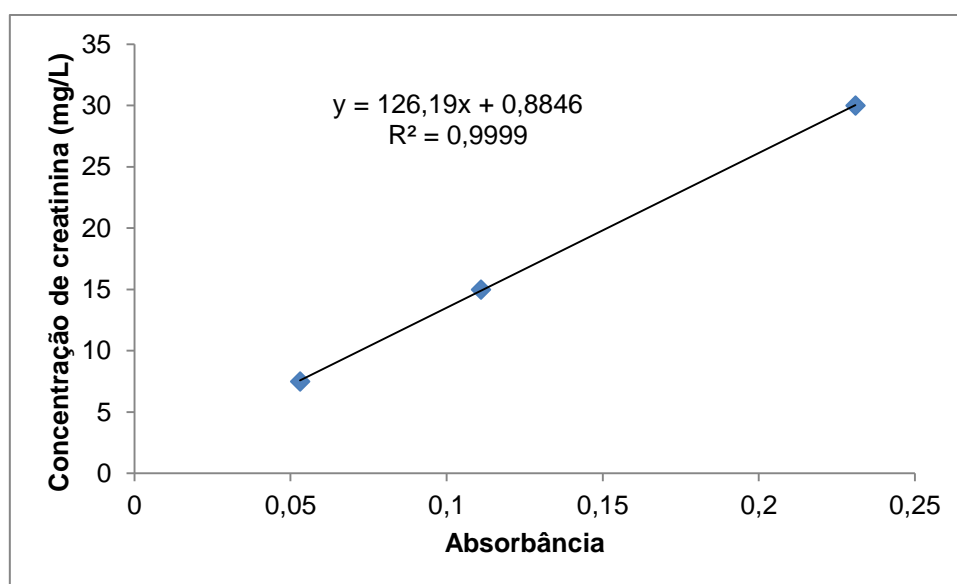
Condição	DEB (cm)	Velocidade de fiação (cm/s)	Tempo de exposição (s)
1	40	12,5	3,20
2	40	12,8	3,12

# ANEXO B - CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZADAS NAS CARACTERIZAÇÕES DAS MEMBRANAS

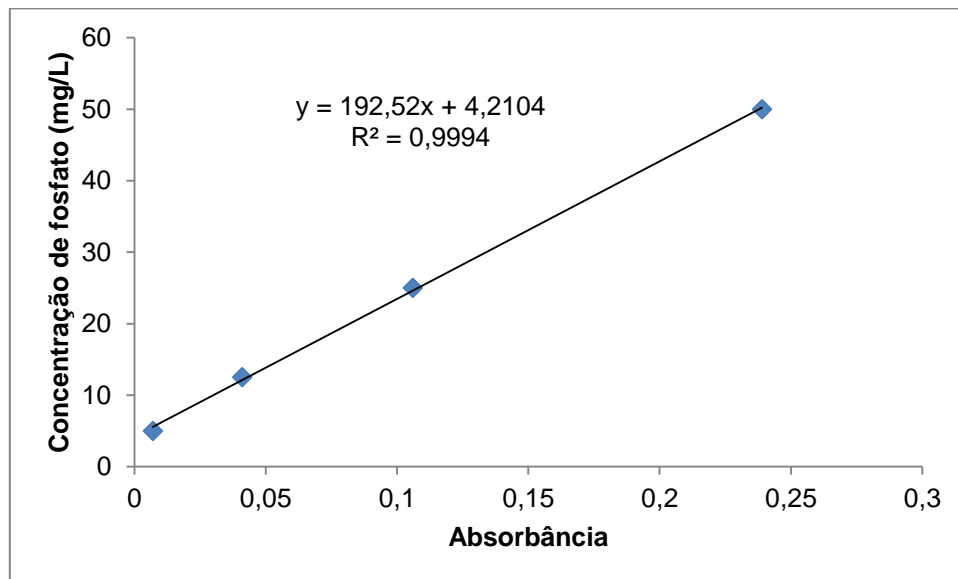
## B.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA UREIA



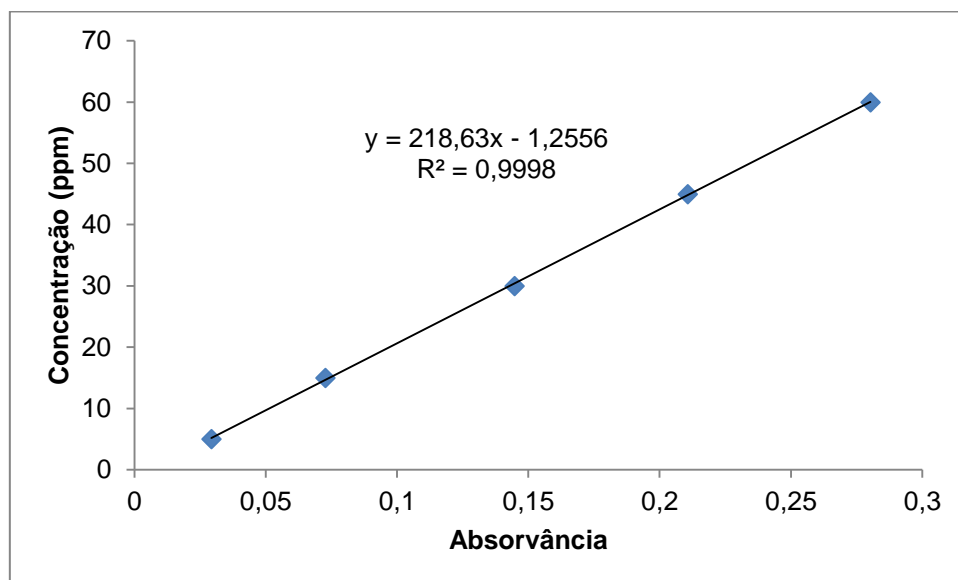
## B.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CREATININA



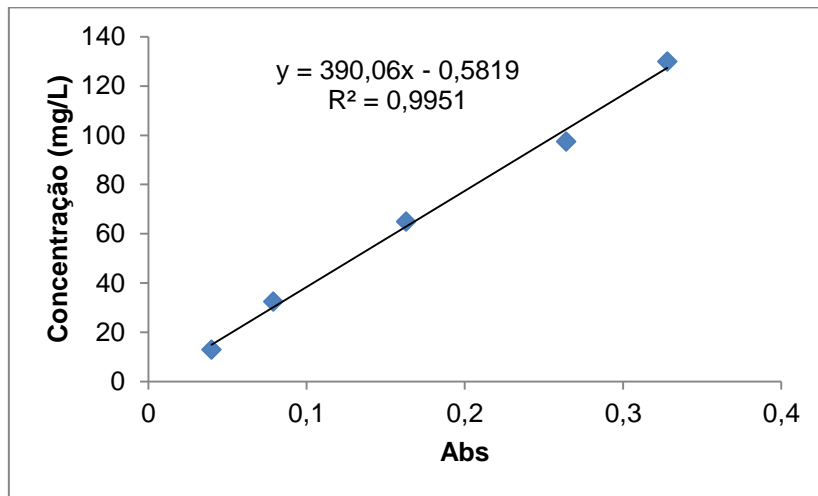
### B.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO FOSFATO



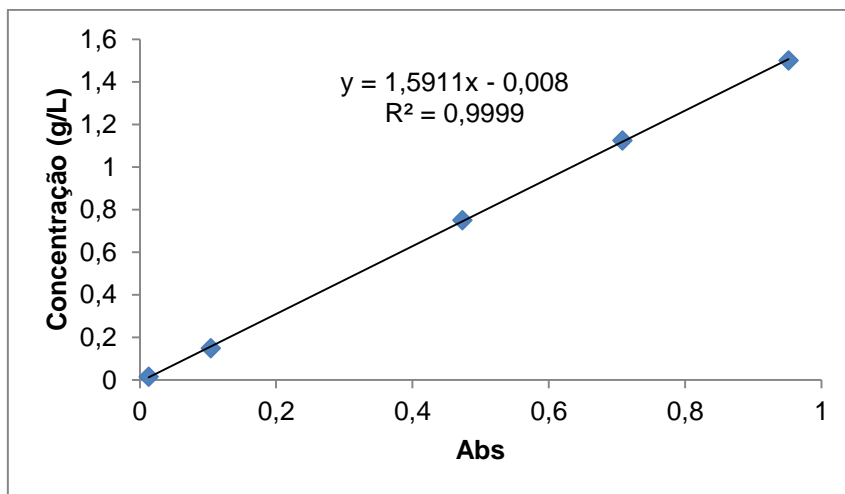
### B.4. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VITAMINA B12



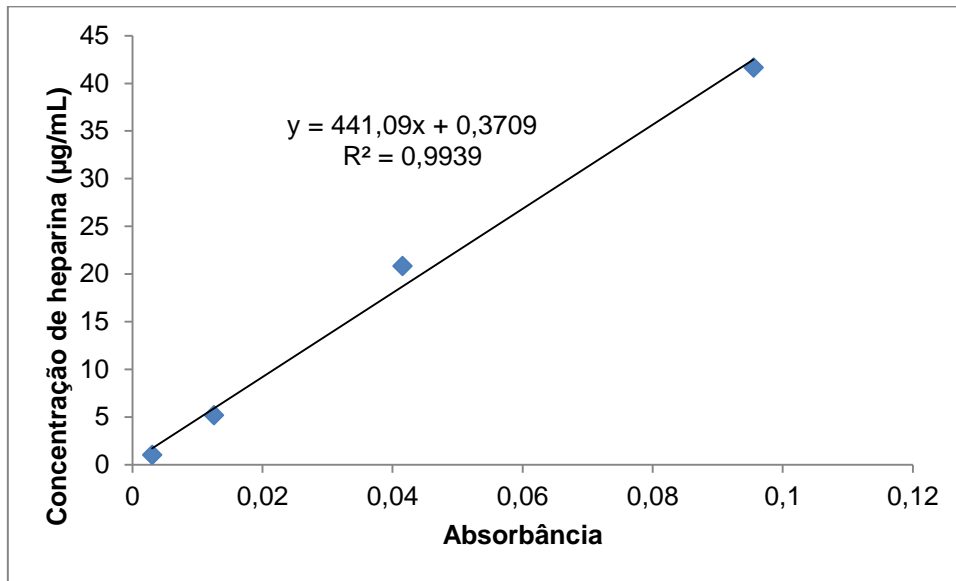
### B.5. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA LISOZIMA



### B.6. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ALBUMINA



## B.7. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA HEPARINA



# ANEXO C – DOCUMENTOS DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA PARA REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES COM SANGUE HUMANO

## C.1. COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA



### COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de Membranas de Poli(éter imida)/Polivinilpirrolidona Funcionalizadas para Aplicação em Hemodiálise

**Pesquisador:** ALANA MELO DOS SANTOS

**Versão:** 2

**CAAE:** 91829918.8.0000.5257

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

#### DADOS DO COMPROVANTE

**Número do Comprovante:** 088018/2018

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Desenvolvimento de Membranas de Poli(éter imida)/Polivinilpirrolidona Funcionalizadas para Aplicação em Hemodiálise que tem como pesquisador responsável ALANA MELO DOS SANTOS, foi recebido para análise ética no CEP UFRJ - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro / HUCFF- UFRJ em 20/06/2018 às 08:31.

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

## C.2. PARECER DE APROVAÇÃO

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de Membranas de Poli(éter imida)/Polivinilpirrolidona Funcionalizadas para Aplicação em Hemodiálise

**Pesquisador:** ALANA MELO DOS SANTOS

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 91829918.8.0000.5257

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.868.190

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA



Continuação do Parecer: 2.868.190

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 02 de Setembro de 2018

---

Assinado por:  
Carlos Alberto Guimarães  
(Coordenador)



### C.3. MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO UTILIZADO



Programa de Engenharia Química  
Instituto Alberto Luis Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título do Estudo:** Desenvolvimento de Membranas de Poli(éter Imida)/PolivinilPirrolidona Funcionalizadas para Aplicação em Hemodiálise

**Pesquisador Responsável:** Alana Melo dos Santos

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa porque foi atendido (a) ou está sendo atendido (a) nesta instituição. Para que você possa decidir se quer participar ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências pela sua participação. Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tem esse nome porque você só deve aceitar participar desta pesquisa depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento, para maiores esclarecimentos. Converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler ou escutar estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável. Após receber todas as informações, e todas as dúvidas forem esclarecidas, você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

Em trabalho anterior desenvolvido por esta pesquisadora, desenvolveu-se uma membrana de poli(éter imida) e polivinilpirrolidona, que são compostos químicos conhecidos como polímeros. Os polímeros são muito utilizados no cotidiano e estão presentes em embalagens plásticas, roupas, calçados, isopor, entre outros. A membrana desenvolvida apresentou características que possibilitam seu uso em filtros de hemodiálise, com resultados comparáveis com as membranas clínicas atualmente utilizadas no tratamento. Portanto, para verificar a viabilidade de utilização dessa membrana em hemodiálise, faz-se necessário avaliar sua compatibilidade sanguínea através dos testes que serão realizados nessa pesquisa.

Eu,....., tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo **DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLI(ÉTER IMIDA)/POLIVINILPIRROLIDONA FUNCIONALIZADAS PARA APLICAÇÃO EM HEMODIÁLISE** recebi do(a) Sr(a)..... da instituição....., responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

1. Que o estudo se destina à avaliação da compatibilidade sanguínea de material para seu potencial uso no tratamento por hemodiálise.
2. Que a importância deste estudo é o desenvolvimento de uma membrana para filtros de hemodiálise de produção nacional e com melhores propriedades de compatibilidade com o sangue.
3. Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes:

a) Obtenção de material compatível para utilização no tratamento por hemodiálise.

Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ  
Endereço: Av. Horácio Macedo, 2030 - Centro de Tecnologia - Bloco G - Sala G-115 - CEP 21941-914  
Caixa Postal: 68502, CEP 21941-972 - Rio de Janeiro - RJ  
☎ (21) 3938-8349- FAX (21) 3938.8300

- b) Avaliar a compatibilidade sanguínea do material produzido.
4. Que esse estudo começará em agosto/setembro.
5. Que o estudo será feito da seguinte maneira:
- Triagem e seleção dos voluntários;
  - Coleta e processamento da amostra;
  - Análise das amostras e processamento dos dados;
  - Liberção dos laudos para os respectivos voluntários.
6. Em aceitando participar, eu autorizo a coleta de 5 mL (equivalente a aproximadamente uma colher de chá) de sangue pela veia do antebraço e uso da amostra coletada nas análises. O risco é mínimo e está relacionado com a dor ou incômodo causado pela picada da agulha. Após a coleta, será aplicado um *band aid* com antisséptico. O sangue coletado será colocado em contato com a membrana, com o objetivo de avaliar se ocorrerá alguma reação que indique que o material não seja indicado para o objetivo proposto. O tempo de coleta do sangue não será superior a 30 min.
7. Que não é necessário fazer jejum para a coleta do sangue para esta pesquisa.
8. Que caso seja necessário, também autorizo a pesquisa dos dados clínicos e complementares nos prontuários físicos e ou eletrônicos ou nas fichas de solicitação de exames.
9. Autorizo também que as amostras coletadas e/ou não utilizadas sejam armazenadas e incluídas no Repositório de Bioamostras do LADITEC. . O seu material biológico será identificado em códigos, sem a identificação do seu nome.
10. Que a utilização do material biológico coletado (sangue) está vinculada somente a este projeto de pesquisa. Qualquer outro projeto que venhamos a executar com alguma amostra sua que já foi coletada, que seja diferente do objetivo do estudo aqui esclarecido, será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), além de ser solicitado a você um novo termo de consentimento, antes que o estudo seja iniciado.
11. Que serão tomados os cuidados necessários a fim de se preservar a saúde física e mental, bem como a identidade dos voluntários. Os riscos serão mínimos, os dados pessoais serão codificados em números e apenas os pesquisadores principais terão acesso a esses dados, os demais irão trabalhar apenas com números, preservando a identidade dos voluntários. Todo procedimento invasivo, mesmo que minimamente invasivo, como a coleta de sangue, será feito por pessoal qualificado e habilitado, com rigoroso protocolo de antissepsia, minimizando os possíveis riscos de complicações como dor, inchaços, vermelhidão e, ou infecção.
12. Que os benefícios esperados, indiretos e a longo prazo, serão a possibilidade de obtenção de uma membrana para filtros de hemodiálise de produção nacional e com melhores propriedades de compatibilidade com o sangue.
13. Que eu serei informado sobre o resultado final desta pesquisa, e sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.



14. Que a assistência prestada, caso necessário, será a seguinte: os pesquisadores responsáveis acompanharão a coleta de material, caso haja qualquer Intercorrência, terel atendimento multiprofissional garantido no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA).
15. Que, a qualquer momento, o consentimento para participação neste estudo poderá ser retirado, sem que isso cause qualquer penalidade e/ou prejuízo para os participantes.
16. Que todas as informações serão mantidas em sigilo, de forma a não identificar os participantes. Cada voluntário será identificado por um código alfanumérico, e somente a equipe de pesquisa terá acesso aos dados de identificação. E que, caso seja necessário, a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto após a autorização dos participantes.
17. Que o estudo não acarretará nenhuma despesa para o participante da pesquisa. Se por algum motivo eu tiver despesas decorrentes da minha participação neste estudo com transporte e/ou alimentação, serei reembolsado adequadamente pelos pesquisadores.
18. Que eu serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a minha participação em qualquer etapa diretamente relacionada com essa pesquisa e descrita nesse TCLE. Não caberá indenização por danos ocasionados nos procedimentos de diagnósticos clínicos e complementares, assim como também nos procedimentos cirúrgicos, e ou tratamentos de quaisquer tipos, referentes à sua doença e não relacionados diretamente com essa pesquisa.
19. Que uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinada por todos os membros do grupo de pesquisadores será entregue a cada participante.
20. Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

**Contato de urgência:**

Prof. Dr. Carlos Arthur C. Almeida

Universidade Federal de Alagoas - Escola de Enfermagem e Farmácia - LADITEC

End. Av. Lourival Melo Mota, s/n

Tabuleiro dos Martins CEP:57072-900 Maceió – AL

Ou

Domicílio: R. Projetada, S/N; Q-SS; Lote-V. Barramar III

Cidade: Barra de São Miguel - AL

Telefone: (082) 99663-1521



Endereço dos(as) responsáveis pela pesquisa:

Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Carlos Arthur Cardoso Almeida

Endereço: R. Projetada, S/N; Complemento: Q-S5; Lote-V

Bairro: /CEP/Cidade: Barramar III; 57180-000; Barra de São Miguel - AL

Telefones p/contato: (082) 99663-1521

Alana Melo dos Santos

Endereço: Av. Pretestato Ferrelra Machado, 1185

Bairro: Jatúca, CEP: 57036-400, Maceió-AL

Telefone para contato (82) 999134778

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão que controla as questões éticas das pesquisas na instituição (UFRJ) e tem como uma das principais funções proteger os participantes da pesquisa de qualquer problema.

R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.º 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão – 7º andar, Ala E - pelo telefone 3938-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 16 horas, ou por meio do e-mail: [cep@hucff.ufrj.br](mailto:cep@hucff.ufrj.br).

Maceió, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

<p>Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntário(o,a) ou do responsável legal. Rubricar as demais folhas.</p>	<p>Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)</p>
---	---

# ANEXO D – ARTIGO PUBLICADO

J Mater Sci: Mater Med (2017)28:131  
DOI 10.1007/s10856-017-5946-z



CLINICAL APPLICATIONS OF BIOMATERIALS

Original Research

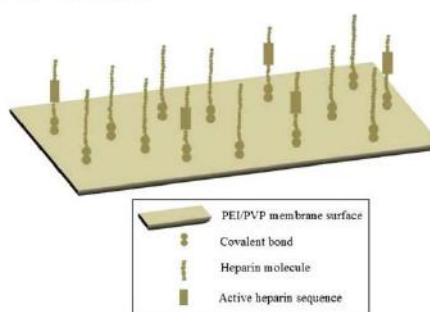
## Development of functionalized polyetherimide/polyvinylpyrrolidone membranes for application in hemodialysis

Alana Melo dos Santos<sup>1</sup> · Alberto Claudio Habert<sup>1</sup> · Helen Conceição Ferraz<sup>1</sup>

Received: 20 February 2017 / Accepted: 14 July 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** The present study aimed to synthesize membranes for hemodialysis based on polyetherimide (PEI) and polyvinylpyrrolidone (PVP), with chemical immobilization of heparin on its surface to increase blood compatibility. The synthesized PEI/PVP membranes were characterized by morphological analysis and transport properties, as well by infrared spectroscopy (FT-IR), protein adsorption, contact angle, activated partial thromboplastin time (aPTT), and platelet adhesion. Hydraulic permeability of the synthesized PEI membranes were comparable to those of current high flux clinical membranes; values of diffusive permeability and rejection for typical solutes were similar to those reported in literature. The immobilization of heparin, in turn, resulted in more hydrophilic membranes, with insignificant protein adsorption and platelet adhesion (as opposed to actual clinical membranes), indicating anti-thrombogenic characteristics as confirmed by increased aPTT.

### Graphical abstract



### 1 Introduction

Chronic kidney disease, defined as the occurrence of any abnormality of the kidney, such as decreased kidney function for a period of 3 months or more, has been recognized as a serious global public health problem [1, 2]. About 10% of the worldwide population is affected, while a small fraction is able to receive adequate treatment. In this small fraction, 70% of the patients (more than three million in 2013) survive through hemodialysis; other possible forms of treatment are peritoneal dialysis and renal transplantation [3].

Although hemodialysis is a consolidated treatment, it still presents important limitations to be overcome, including the low removal of middle molecules ( $\beta$ 2-microglobulin, molar mass 11.8 kDa, for example) and the occurrence of immune responses due to low biocompatibility of the dialyzers [4].

✉ Alana Melo dos Santos  
alana.melo0205@gmail.com

<sup>1</sup> Chemical Engineering Program-COPPE/UFRI, Federal University of Rio de Janeiro, P.O. Box 68502, CEP 21941-972 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Published online: 25 July 2017

Springer

To improve the performance of hemodialysis, the development of new dialyzer membranes is a permanent challenge. Changes in composition, structure and, hence, in membrane transport properties, can have positive effect on the removal of uremic solutes, with the desirable balance between rejection of middle molecules and retention of important blood proteins [5].

Improved blood compatibility is another goal [6], since the use of low biocompatible membranes results in adverse reactions: blood clotting due to proteins adsorption, which causes the activation of enzymes from different systems; platelets aggregation and adhesion, leading to their activation and degranulation; neutrophils and monocytes activation which in turn activates the alternative complement pathway, leading to the dysfunction of these cells. Altogether, these events result in higher incidence of infections and increased mortality in hemodialysis patients.

To improve membranes blood compatibility, one can use two main approaches: to create surfaces that prevent or suppresses undesirable reactions, such as coagulation activation; or to synthesize polymers that do not react with blood. A suitable modification of the material surface is the most common strategy used, because the properties of material surface dominate the interactions between the biological environment and artificial materials. Further, surface modification may enhance hemocompatibility, without changing physical properties of the material [7]. Heparin is the most commonly used anticoagulant to prevent thrombus formation during hemodialysis treatment. Its intravenous use, however, has been associated with several side effects, as bleeding, osteoporosis, skin reactions and abnormal liver function [8]. Many studies have been carried out on heparin attachment on the membrane surface, aiming its use in hemodialysis [9–15].

Heparinization may be carried out by different techniques, such as blending with the membrane polymer, surface grafting and surface coating. The most used method is to introduce amino groups on the surface to be modified, followed by covalent attachment of functional groups of heparin. Li et al (2011) [9] undertook heparin immobilization using an atmospheric pressure glow discharge (APGD) generator for introduction of the amino groups in polysulfone membrane, followed by chemical attachment of heparin. Huang et al (2011) [10], in turn, modified polysulfone membrane surfaces by introduction of amino groups by immersing the membrane in a solution of chlorodimethyl ether, SnCl<sub>4</sub> and hexane, followed by incubation in ethylene diamine and finally covalent binding of heparin. Another reagents used to attach amino groups are dopamine [11], polyethyleneimine [12] and 1,6-hexanediamine [13]. The heparin immobilized membrane surface lead to some improvements in surface properties such as increased blood compatibility and biocompatibility, reduced the adhesion

platelets and loss of blood cells and increased the plasma recalcification time and activated partial thromboplastin time [9–11, 14, 15].

As for the morphology of the membranes used in hemodialysis, it is known that thin microporous ultrafiltration membranes are desirable [16], in general, with a skin layer in contact with the blood, providing selectivity through a solute sieving mechanism.

This work aimed at the synthesis and characterization of polyetherimide/polyvinylpyrrolidone membranes for use in hemodialysis, with blood compatibility improved by surface modification through heparin attachment. Polyetherimide was the polymer of choice due to convenient properties such as mechanical and chemical resistance, thermal stability, good cell compatibility and its potential functionalization through chemical conversion of its imide groups to amine groups. Polyvinylpyrrolidone was used as a hydrophilization and a pore promoting agent.

## 2 Materials and methods

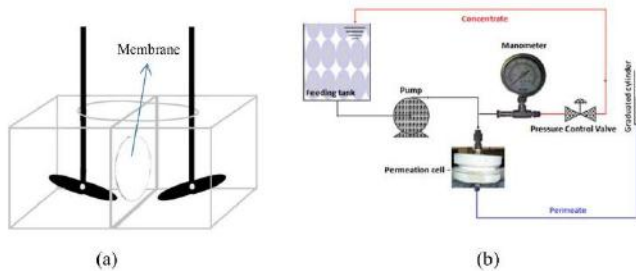
### 2.1 Materials

Polyetherimide (PEI Ultem 1000, General Electric), *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP, Vetec) and polyvinylpyrrolidone (PVP K<sub>90</sub>, Fluka Chemica Co) were used for membranes synthesis. Reagents for surface functionalization were polyethyleneimine 50 wt.% (Fluka analytical), isopropyl alcohol (Vetec), polyethylene glycol diglycidyl ether (PEGDGE, Sigma-Aldrich), (1-ethyl-3-(3-dimethyl amidopropyl) carbodiimide) (EDC, Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Vetec), glutaraldehyde 25 wt.% (Vetec) and heparin sodium salt (Toeris Bioscience, minimal biological activity of 150 I.U./mg). Membranes rejection to the following compounds was evaluated: urea (Reag Quimibrás), creatinine (Merk), monobasic sodium phosphate (Vetec), dibasic sodium phosphate (Vetec), vitamin B<sub>12</sub> (Merk), lysozyme (Sigma-Aldrich) and bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich).

### 2.2 Synthesis of polyetherimide membranes

Polyetherimide (PEI)/Polyvinylpyrrolidone (PVP) flat sheet membranes were produced by phase inversion by precipitation in a coagulating media. The casting solution was PEI (15% w/w), PVP as additive (0 and 5% w/w) and NMP as the solvent. PEI and PVP were dissolved in NMP under stirring at 70 °C for 24 h. The resulting solution was cast on glass plates and immersed in water as a non-solvent. Prepared membranes were dried by the solvent exchange method, which consisted in immersing the membranes in

**Fig. 1** Experimental set-ups for transport coefficients determination **a** Dialysis cell. **b** Ultrafiltration system



ethanol for 2 h and subsequently in hexane for two more hours. Membranes were then dried in air at room temperature.

**2.3 Morphological analysis**

Morphological analysis was performed using scanning electron microscope (FEI Quanta 200). Before analysis, membranes samples were coated with gold under vacuum in a sputtering system (Emitech sputter). To analyze the cross-sections of membrane, samples were immersed in liquid nitrogen and carefully fractured.

**2.4 Transport properties**

The permeability of low molecular weight solutes (urea, creatinine and phosphate) was determined in a dialysis cell (Fig. 1a), running in batch mode, at room temperature and evaluated through Eq. 1. In this equation, the subscript “S” refers to the side of the solute in the test solution (more concentrated) and the subscript “D” refers to the side of the dialysate (which was distilled water in the beginning of all runs).

$$\ln \frac{C_S(V_S + V_D) - m}{V_D(C_{S0} - C_{D0})} = -PA \frac{V_S + V_D}{V_S V_D} t \tag{1}$$

where C is the concentration.

V is the volume, and

m = V<sub>S</sub>C<sub>S</sub> + V<sub>D</sub>C<sub>D</sub> (mass balance of total solute present in the system)

The choice of the initial concentration of the solutes was based on their concentration in blood, according to international standards requirements for hemodialysers (ISO 8637:2010). Accordingly, concentrations of urea, creatinine and phosphate were set in 30.0 mmol/L, 0.94 mmol/L and 1.7 mmol/L (pH 7.4), respectively. Phosphate solution consisted of monobasic sodium phosphate and dibasic sodium phosphate. Concentrations of solutes were determined by assay kits provided by Katal (Brazil) to determine

urea and creatinine concentration; and by Doles Reagents (Brazil), to determine phosphate concentration.

The hydraulic permeability and solute rejection coefficient of higher molar weight compounds (vitamin B12, lysozyme and albumin) were determined through ultrafiltration tests (Fig. 1b) at room temperature and with pressure ranging from 0.25 to 1.8 bar. Lysozyme is a protein with a molar mass of 14.3 kDa, used in experiments as a similar substitute for beta-2-microglobulin, a 11.8 kDa macromolecule, associated with a number of inflammatory processes in body. The permeability was obtained through the correlation of the permeate flux with pressure (Eq. 2). The rejection coefficient was obtained using Eq. 3. Solute concentration was assayed by spectrophotometry.

$$J = L_p \Delta P \tag{2}$$

where J is the water flux

L<sub>p</sub> is the hydraulic permeability

ΔP is the pressure difference between feed solution and the permeate

$$R(\%) = \frac{C_A - C_P}{C_A} 100 \tag{3}$$

where C<sub>A</sub> is the feed concentration

C<sub>P</sub> is the permeate concentration

**2.5 Attachment of heparin onto the membrane surface**

Heparin has several active functional groups such as amine, hydroxyl and carboxyl, which can be explored for immobilization in different materials. The methodology used in this work is based on heparin binding to the amino groups present in polyethyleneimine.

The immobilization of heparin was performed in three steps, as described elsewhere [12, 17]: surface activation by the introduction of amino groups; stabilization of the activated surface; and finally heparin binding. The first step was performed by immersing the membrane (sample area 6.3 cm<sup>2</sup>) in a 2 wt.% polyethyleneimine solution in water and isopropyl alcohol 1:1 at 70 °C for 30 min with mild

magnetic stirring. Then, to stabilize the activated surface, the membrane was washed with demineralized water and immersed in a 2 wt.% aqueous solution of PEGDGE at room temperature for 24 h under mild magnetic stirring. After stabilization, the membrane was washed with demineralized water and dried at 60 °C for 16 h in an oven.

Heparin immobilization on the surface was performed by immersing the dry membrane in 40 mL of citrate buffer solution (pH 5) containing 20 mg of EDC and 7.5 mg of heparin sodium, for 6 h, under constant stirring at 4 °C. The membranes were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) 20 mM solution, at pH 7.2 for 5 min and once with a 0.1 wt.% Triton X-100 solution for 10 min. Then, the membranes were rinsed with demineralized water in ultrasound bath for 10 min. Functionalized membranes were stored in aqueous solution of 20 mM sodium acetate and 20 wt.% of ethanol at 4 °C.

The attachment of amino groups to the polyetherimide membrane occurs via reaction of the imide groups of the membrane material with one nucleophilic amino group of the polyethyleneimine, leaving other amino group available for coupling of heparin [12]. Two amide groups are formed: one generating a link in the main macromolecular chain of former PEI and the other connecting former PEI macromolecular and polyethyleneimine. The later has amino groups available for the attachment of heparin.

## 2.6 Quantification of immobilized heparin

Quantification of immobilized heparin was performed using the colorimetric assay proposed by Farndale et al (1986) [18]. A standard solution was prepared by dissolving 16 mg of methylene blue in 1 L of distilled water containing 3.04 g of glycine, 2.37 g of NaCl and 95 mL of HCl 0.1 M. This solution is stable for 3 months at room temperature.

Samples of 100 µL of heparin solutions drawn before and after the immobilization reaction were added to 2.5 mL of the standard solution in an amber tube, and the absorbance was read at 550 nm in a Jenway UV/Vis spectrophotometer. Samples of washing solutions were also analyzed by the same procedure.

The concentration of heparin was determined using a previously obtained calibrating correlation. The amount of immobilized heparin was calculated by mass balance, considering the initial and final amount of heparin in solution and the amount of heparin in the washing solutions.

## 2.7 Surfaces characterization

### 2.7.1 Surface chemistry

Fourier transform infrared spectra with attenuated total reflectance (ATR-FTIR, PerkinElmer Spectrum 100) was

carried out to detect the presence of functional groups at membranes surfaces before and after modification. Spectra were recorded between 500 and 4000  $\text{cm}^{-1}$ , using 16 scans for each sample. To infer the effect of surface modification on the hydrophilicity of membranes, contact angle of water on membrane surface before and after modification with heparin was measured (goniometer OCA 15EC, software 20 SCA, Dataphysics).

### 2.7.2 Protein adsorption

Adsorption assays were carried out in a static mode (finite bath method), at 25 °C. Samples (10 mg of the membrane) were immersed in 5 mL of a 50 g/L bovine serum albumin aqueous solution, under stirring at 130 rpm for 6 h (a time previously determined as sufficient to reach equilibrium). The amount of adsorbed protein was calculated from mass balance, considering the initial and final protein concentration in solution, as assayed by spectrophotometry. The adsorption capacity of membranes before and after functionalization was obtained, and, for comparison, the same procedure was performed for polysulfone and polyethersulfone clinical membranes.

### 2.7.3 Platelet adhesion

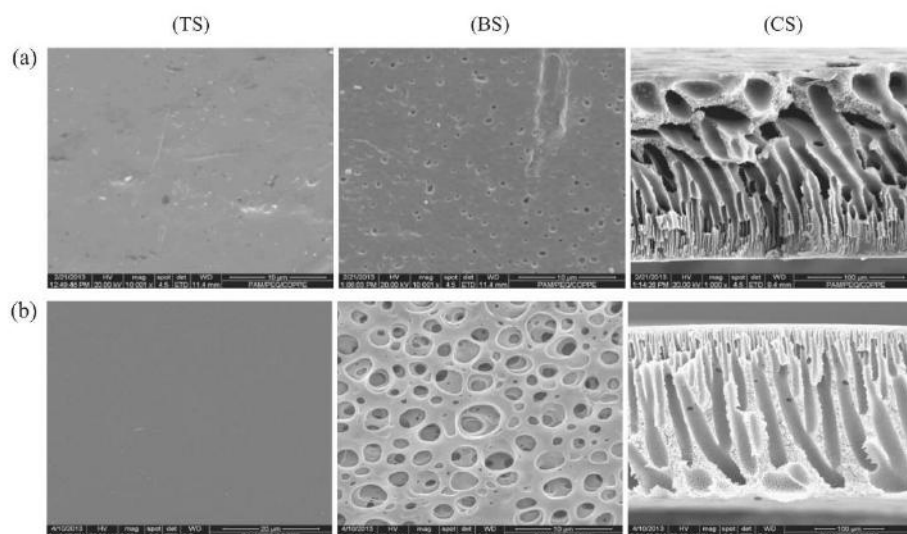
Chicken blood collected with 5 wt.% EDTA solution was centrifuged twice at 1000 rpm for 10 min to separate the platelet poor plasma (PPP) from the platelet rich plasma (PRP). Membrane samples (before and after modification and clinical polysulfone membrane) were washed with PBS buffer solution (pH 7.4) before being placed in contact with 0.5 mL PRP, covering all membrane surface, and then maintained at 37 °C for 1 h. After incubation, membrane samples were first rinsed in PBS and then maintained for 18 h in a 2.5 wt.% glutaraldehyde solution, in order to stabilize the adsorbed platelets. The samples were then progressively dehydrated with 50%, 75%, 85%, 95% e 100% (v/v) ethanol/water for 10 min in each solution. Platelet adhesion on membranes surfaces was observed by SEM after freeze drying with liquid nitrogen [11].

### 2.7.4 Activated partial thromboplastin time (aPTT)

The aPTT assay was used to evaluate the effect of the immobilized heparin on blood clotting. Membranes samples of PEI membranes before and after modification and also of a polysulfone commercial membrane were cut in small pieces of about 7.5 mg and placed in specific cuvettes, to which 40 µL deionized water was added.

After 5 min, the water was transferred to another cuvette containing 40 µL of unicalibrator plasma with all clotting factors and 40 µL of cefalin and maintained





**Fig. 2** SEM images of the surface and cross-section of membranes synthesized from casting solutions containing **a** 15/0/85 wt.% **b** 15/5/80 wt.% of PEI/PVP/NMP. TS—top surface; BS—bottom surface; CS—cross-section

at 37 °C for 120 s in a coagulometer (BFT II, Dade Behring). After incubation, 40  $\mu$ L of  $\text{CaCl}_2$  were added to the cuvette, kept under magnetic stirrer, and the clotting time was recorded.

### 3 Results

SEM observations of the synthesized membranes are shown in Fig. 2. It can be seen that the membranes have a typical asymmetric structure, with a less porous top surface and a highly porous sublayer, where one can also observe the presence of macrovoids.

The hydraulic permeability for membranes synthesized from casting solutions containing 5 wt.% PVP was 44.3 L/h.  $\text{m}^2$ .bar. Membranes synthesized without PVP were impermeable in the pressure range tested. The diffusive permeabilities of small molecules in dialysis tests, as determined from Eq. 1, are  $2.46 \times 10^{-4}$  cm/s,  $1.60 \times 10^{-4}$  cm/s and  $1.45 \times 10^{-4}$  cm/s corresponding to urea (0.06 kDa), creatinine (0.113 kDa) and phosphate (0.134 kDa), respectively. The rejection coefficients of larger solutes are 5.9, 89.0 and 99.0% corresponding to vitamin B<sub>12</sub> (1.4 kDa), lysozyme (14.3 kDa) and albumin (66 kDa), respectively.

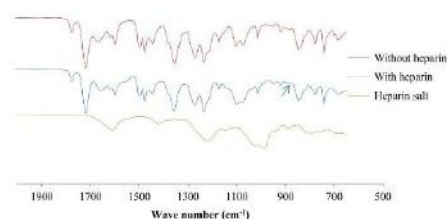
#### 3.1 Immobilization of heparin at the membrane surface

The amount of immobilized heparin was  $272 \pm 5$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  as determined by the colorimetric assay. ATR-FTIR surface characterization of PEI/PVP membranes before and after functionalization was performed and results are shown in Fig. 3, which also presents the spectrum of the heparin sodium salt used in this work.

It was observed characteristic peaks at 1720, 1780, 1360 and  $1240\text{ cm}^{-1}$  in the spectrum of the PEI/PVP membrane. After functionalization, the main difference is the weak peak at  $891\text{ cm}^{-1}$ , as pointed out at Fig. 3. The peaks observed for the membrane before functionalization are maintained.

#### 3.2 Contact angle

The hydrophilicity of membranes was evaluated by measuring the water contact angle at their surface. It was observed that the value of contact angle before functionalization was close to 90°. After activation of the membrane surface with amino groups, the contact angle dropped to 38° and when functionalization was completed, the contact angle increased to 66°.



**Fig. 3** FTIR spectra of heparin salt and PEI/PVP membranes surface, before and after functionalization

### 3.3 Protein adsorption

Figure 4 shows the percentage of albumin adsorbed on PEI/PVP membrane before and after functionalization as compared to the adsorption on polyethersulfone (PES) and polysulfone (PS) membranes of clinical dialyzers.

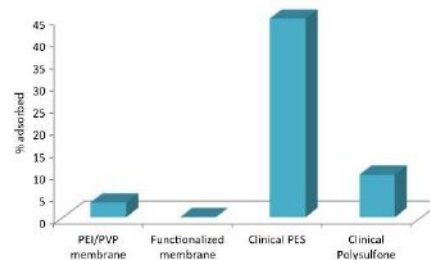
It is noteworthy the low adsorption capacity of PEI/PVP membrane, and even more remarkable is the complete absence of BSA adsorption on the heparin-functionalized membrane.

### 3.4 Platelet adhesion

Figure 5 shows the SEM images of membranes surfaces before and after functionalization and also the surface of clinical polysulfone membrane, submitted to the same platelet adhesion test. It can be seen that, before functionalization (Fig. 5a), membrane tends to adhere platelets to its surface. The same result was observed for the clinical polysulfone membrane, (Fig. 5b), showing a more noticeable aggregation of adhered platelets. However, the adhesion of platelets is greatly reduced for the modified membranes, (Fig. 5c). Other studies also reported reduction or suppression of platelet adhesion after material modification through heparin immobilization [11, 19–22].

### 3.5 Activated partial thromboplastin time

To evaluate the effect of the heparin on the anticlotting property of the membranes, activated partial thromboplastin time (aPTT) was evaluated. The time elapsed for coagulation of blood in the presence of water which was previously contacted with different membranes. In absence of membrane (deionized water without contact with any membrane, the coagulation time was  $35.25 \pm 0.25$  s; in contact with clinical polysulfone membrane, coagulation time was  $39.68 \pm 4.07$  s; in contact with PEI/PVP, before functionalization, coagulation time was  $38.78 \pm 3.15$ ; and contact with PEI/PVP, after functionalization, coagulation time was greater than 500 s.



**Fig. 4** Adsorption of albumin on hemodialysis membranes

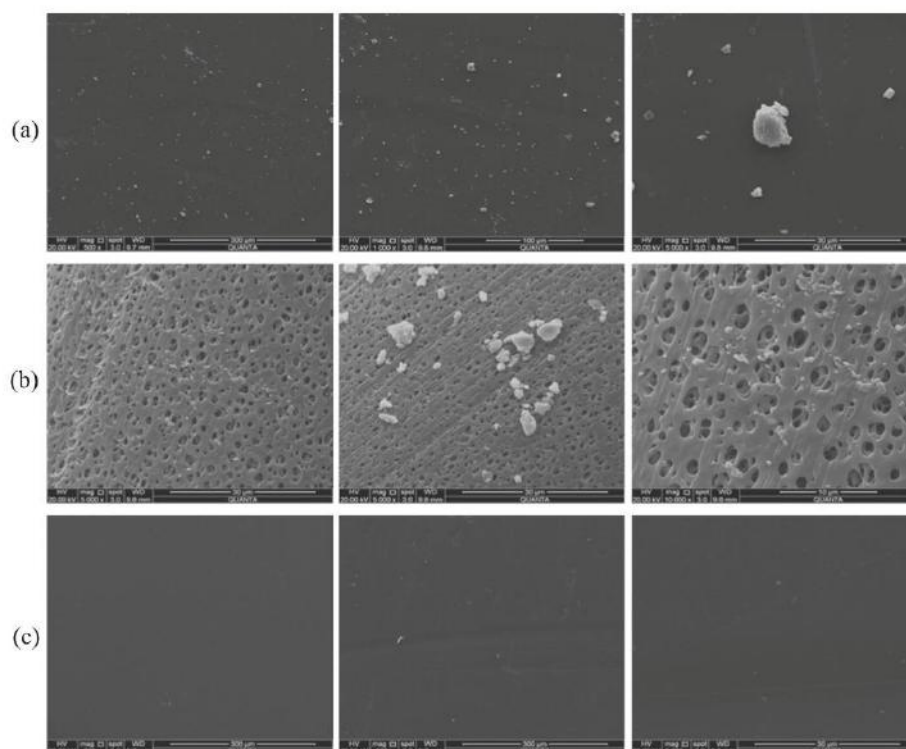
## 4 Discussion

Membranes show a less porous top surface and a highly porous sublayer. The addition of PVP in the casting solution resulted in more porous structures, as expected, since PVP increases the hydrophilicity of the polymer matrix, leading to the formation of a more interconnected porous network [5].

In hemodialysis, the hydraulic permeability ( $L_p$ ) of the membrane dialyzer is rarely reported since the exposure to blood affects this value [23]. Instead, the ultrafiltration coefficient ( $K_{uf}$ ) is the parameter used to evaluate the volumetric filtration rate (mL/h) per each mmHg of pressure difference across the membrane filtering the blood. According to the current characterization of flux in hemodialysis membranes, dialyzers can be classified as low flux ( $K_{uf} < 7.5$  L/h bar) or high flux ( $K_{uf} > 15$  L/h bar) [24]. An approximate comparison between  $K_{uf}$  and  $L_p$  is possible, as observed by Kee and Idris (2010), who evaluated the hydraulic permeability of cellulose acetate membranes, obtaining values in the range  $0.09 \pm 0.02$  L/h m<sup>2</sup> bar (classified as low flux) to  $44.86 \pm 2.14$  L/h m<sup>2</sup> bar (classified as high flux) [25]. Accordingly, the membranes synthesized in this work are classified as high flux membranes. Membranes synthesized without PVP were impermeable, which is in agreement with the presence of a dense surface layer.

The diffusive permeabilities of small decreases when the molecular weight of the solute increases e it is in agreement with values reported in the literature [24, 26]. As expected, there is an increase in the rejection when size of solute increases. This membrane retains very well albumin and the retention of lysozyme (and hence, much probably, of beta-2-microglobulin) is comparable to the one observed in most commercial clinical dialyzers. However, this latter value of rejection must decrease, as the removal of middle molar mass molecules from blood is highly desirable.

In relation to ATR-FTIR surface characterization, peaks at 1720 and 1780 cm<sup>-1</sup> in the spectrum of the PEI/PVP membrane were attributed to carbonyl groups of imide and



**Fig. 5** SEM images of platelet adhesion to membranes **a** before functionalization **b** clinical polysulfone **c** after functionalization

to stretching of carbonyl groups of imide, respectively; the absorbance at  $1360\text{ cm}^{-1}$  was caused by the stretching of C–N(C–N–C); and the absorbance at  $1240\text{ cm}^{-1}$  was attributed to asymmetric stretching of C–O–C bond [27].

After functionalization, the main difference is the weak peak at  $891\text{ cm}^{-1}$ , which could be attributed to coupling of C–O–S, a characteristic of heparin ring structure C–O–C [28]. The weak peak at  $1580\text{ cm}^{-1}$  could be attributed to N–H (primary amine) present in heparin structure. Therefore, ATR-FTIR analysis suggests the occurrence of heparin immobilization. The confirmation of successful heparin immobilization is furthermore brought out by the quantification of heparin immobilized onto the membrane surface as shown above by the colorimetric assay.

The amount of heparin immobilized in this work was higher than the one reported in other publications [22, 29, 30], but this may be related to the immobilization

methodology and to the membrane area, since in this work the porosity was not taken into account.

This increased hydrophilicity after activation with amino groups can be reasoned in terms of the exposure of aliphatic imine groups of polyethyleneimine, capable of making hydrogen bonds with water [31]. The consumption of these groups to bind heparin lead to a decrease of the hydrophilicity and hence, in an increase in the contact angle, as compared to the activated membrane. Yet, the heparinized membrane is more hydrophilic than the original PEI/PVP membrane, which is quite beneficial as it can result in reduced protein adsorption and platelet adhesion.

Clearance of proteins is an undesired effect in hemodialysis. The quantification of this phenomenon is usually done by measuring the albumin concentration in the dialysate stream. However, if the membrane tends to adsorb

proteins, the actual loss is greater than the measured in the dialysate thus it is also important to investigate the membrane affinity towards protein adsorption.

Several factors can affect the adsorption of proteins, such as membrane composition, morphology, hydrophilicity and operating conditions. For the membranes synthesized in this work, this effect can be attributed to the greater hydrophilicity in comparison to membranes before modification. Furthermore, an effect of electrostatic repulsion may be occurring: albumin solution has a pH above the albumin isoelectric point in water ( $pI = 4.7$  [32]). Then, albumin solution has a negative net charge. The surface of the functionalized membrane is also negative, due to the presence of heparin, which has negatively charged structure. This results in electrostatic repulsion, preventing albumin adsorption at the membrane surface.

Platelet adhesion to a foreign surface is the initial stage in the formation of thrombus. In this process, platelets diffuse to the surface, bind to it and these events continue until platelets saturation is reached [33]. So, platelet adhesion tests are important to evaluate the blood compatibility of a material.

The reduced platelets adhesion observed for the modified membranes as compared to membranes before functionalization and clinical polysulfone membrane can be attributed to the increased hydrophilicity of the membranes, as previously discussed, and also to the anticoagulant activity of heparin, which was confirmed by the aPTT test.

Platelet adhesion also depends on the charge distribution and structure of the surface. Platelets have a net negative charge as well heparin, due to negatively charged  $SO_3^-$  groups. Therefore, electrostatic repulsion plays a significant role in reducing the adhesion of platelets to the functionalized membrane surface.

Heparin acts as a catalyst promoting the inhibition of thrombin, the clotting enzyme (and similar proteases, such as the Xa, IXa, XIa, and XIIa factors) by antithrombin III (AT III) [10]. The inhibition of thrombin occurs because heparin has the ability to bind to plasma protein antithrombin, promoting conformational changes that allow a stable and efficient binding with thrombin. This mechanism is responsible to enhance the inhibitory activity of antithrombin and it is the molecular basis for the anticoagulant action of heparin. Furthermore, there is another mechanism to enhance inhibitory activity of antithrombin in which both antithrombin and thrombin bind to same heparin molecule [34].

For the clinical polysulfone and PEI/PVP membranes before functionalization, aPTT values were similar, in other words, there is no evidence that the contact of the blood with these membranes during hemodialysis would not affect the coagulation process. In turn, aPTT was significantly increased for the functionalized membranes, indicating the

anticoagulant property of these membranes, which is attributed to the presence of the heparin.

## 5 Conclusions

High flux PEI/PVP membranes with modified surface were successfully synthesized and characterized aiming at alternative materials for hemodialysis membranes. Diffusive permeabilities of small solutes and rejections to middle and large molecules were similar to currently used clinical membranes. Heparin immobilization improved membrane properties, resulting in increased hydrophilicity and reduction of both protein adsorption and platelet adhesion. Furthermore, the presence of heparin on membrane surface delayed activated partial thromboplastin time, indicating the existence of antithrombogenic properties, which is highly desirable for hemodialysis membranes.

**Acknowledgements** The authors would like to thank to CNPq for financial support of A.M.Santos.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt K-U, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A, Powe NR, Rossert J, Wheeler DC, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives – a position statement from kidney disease improving global outcomes. *Kidney Int.* 2007;72(3):247–59.
2. Tonelli M, Riella M. Chronic kidney disease and the aging population. *J Bras Nefrol.* 2014;36(1):1–5.
3. Fresenius Medical Care Market Survey. ESRD Patients in 2013: A Global Perspective. Fresenius Medical Care. 2013. [http://www.vision-fmc.com/files/ESRD\\_Patients\\_in\\_2013.pdf](http://www.vision-fmc.com/files/ESRD_Patients_in_2013.pdf) of subordinate document. Accessed 16 Jun 2016.
4. Hörl WH. Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:62–71.
5. Clark WR, Hamburguer RJ, Lysaght RJ. Effect of membrane composition and structure on solute removal and biocompatibility in hemodialysis. *Kidney Int.* 1999;56:2005–15.
6. Gautham A, Muhammed JM, Murugan M, Mansoor AN. Hemodialysis membranes: past, present and future trends. *Int Res J Pharm.* 2013;4(5):16–9.
7. Mao C, Qiu Y, Sang H, Mei H, Zhu A, Shen J, Lin S. Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving hemocompatibility. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004;110:5–17.
8. Ing TS, Rahman MA, Kjellstrand CM. Dialysis – history, development and promise. Singapore: World Scientific; 2012.
9. Li J, Huang X-J, Ji J, Lan P, Vienken J, Groth T, Xu Z-K. Covalent heparin modification of a polysulfone flat sheet

- membrane for selective removal of low-density lipoproteins: a simple and versatile method. *Macromol Biosci*. 2011;11:1218–26.
10. Huang X-J, Guduru D, Xu Z-K, Vienken J, Groth T. Blood compatibility and permeability of heparin-modified polysulfone as potential membrane for simultaneous hemodialysis and LDL removal. *Macromol Biosci*. 2011;11:131–40.
  11. Gao A, Liu F, Xue L. Preparation and evaluation of heparin-immobilized poly(lactic acid) (PLA) membrane for hemodialysis. *J Membr Sci*. 2014;452:390–9.
  12. Albrecht W, Schauer J, Weigel TH, Lendlein A. Preparation of novel composite membranes: reactive coating on microporous poly(ether imide) support membranes. *J Membr Sci*. 2006;269:49–59.
  13. Hou C, Yuan Q, Huo D, Zheng S, Zhan D. Investigation on clotting and hemolysis characteristics of heparin-immobilized polyether sulfones biomembrane. *J Biomed Mater Res, Part A*. 2008;85(3):847–52.
  14. Seifert B, Mihanetzis G, Groth T, Albrecht W, Richau K, Missirlis Y, Paul D, Von Sengbusch G. Polyetherimide: a new membrane-forming polymer for biomedical applications. *Artif Organs*. 2002;26(2):189–99.
  15. Murugesan S, Xie J, Linhardt RJ. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Curr Top Med Chem*. 2008;8:80–100.
  16. Mansur S, Othman MHD, Ismail AF, Kadir SHSA, Kamal F, Goh PS, Hasbullah H, Ng BC, Abdullah MS. Investigation on the effect of spinning conditions on the properties of hollow fiber membrane for hemodialysis application. *J Appl Polym Sci*. 2016;133:1–10.
  17. Che AF, Nie FQ, Huang XD, Xu ZK, Yao K. Acrylonitrile-based copolymer membranes containing reactive groups: surface modification by the immobilization of biomacromolecules. *Polymer (Guildf)*. 2005;46:11060–5.
  18. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue". *Biochim Biophys Acta*. 1986;883:173–7.
  19. Jee SK, Park HD, Park KD, Kim YH, Shin JH. Heparin-conjugated polylactide as a blood compatible material. *Biomacromolecules*. 2004;5:1877–81.
  20. Lin W-C, Liu T-Y, Yang M-C. Hemocompatibility of polyacrylonitrile dialysis membrane immobilized with chitosan and heparin conjugate. *Biomaterials*. 2004;25:1947–57.
  21. Yang MC, Lin WC. Protein adsorption and platelet adhesion of polysulfone membrane immobilized with chitosan and heparin conjugate. *Polym Adv Technol*. 2003;14:103–13.
  22. Michanetzis GPA, Katsala N, Missirlis YF. Comparison of haemocompatibility improvement of four polymeric biomaterials by two heparinization techniques. *Biomaterials*. 2003;24:677–88.
  23. Ofsthun NJ, Karoor S, Suzuki M. Hemodialysis membranes. In: Li NN, Fane AG, Ho WSW, Matsuura T, editors. *Advanced membrane technology and applications*. New Jersey: Wiley; 2008. p. 489–517.
  24. Ambalavanan S, Rabetoy G, Cheung AK. High-efficiency and high-flux hemodialysis. In: Bennett WM, Henrich WL, Schrier RW, editors. *Atlas of diseases of the kidney*. Colorado: Wiley-Blackwell; 1999.
  25. Kee CM, Idris A. Permeability performance of different molecular weight cellulose acetate hemodialysis membrane. *Sep Purif Technol*. 2010;75:102–13.
  26. Seita Y, Mochizuki A, Nakagawa M, Takahashi K, Yamashita S. Polyether-segmented nylon hemodialysis membranes. I. Preparation and permeability characteristic of polyether-segmented nylon 610 hemodialysis membranes. *J Appl Polym Sci*. 1997;65(9):1703–11.
  27. Isloor AM, Hebbar R, Ismail AF, Shilton SJ, Al-Obaid AM, Fun HK. Probing the morphology and antiorganic fouling behaviour of the polyetherimide membrane modified with hydrophilic organic acids as additives. *New J Chem*. 2015;39:6141–50.
  28. Cui W, Cui Y, Zhu P, Zhao J, Su Y, Yang Y, Li J. An anticoagulant activity system using nanoengineered autofluorescent heparin nanotubes. *Chem Asian J*. 2012;7:127–32.
  29. Marconi W, Benvenuti F, Piozi A. Covalent bonding of heparin to a vinyl copolymer for biomedical applications. *Biomaterials*. 1997;18:885–90.
  30. Huang X-J, Guduru D, XU Z-K, Vienken J, Groth T. Immobilization of heparin on polysulfone surface for selective adsorption of low-density lipoprotein (LDL). *Acta Biomater*. 2010;6:1099–106.
  31. Ananth A, Arthanareeswaran G, Wang H. The Influence of Tetraethylorthosilicate and Polyethyleneimine on the Performance of Polyethersulfone Membranes. *Desalination*. 2012;287:61–70.
  32. Ge S, Kojio K, Takahara A, Kajiyama T. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1988;9(2):131–50.
  33. Allen, DJ. *Transport phenomena and blood platelet*. Ph.D. Thesis, McMaster University, Hamilton, ON, 1976.
  34. Gray E, Hogwood J, Mulloy B. The anticoagulant and antithrombotic mechanisms of heparin. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;207:43–61.