

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Adriana de Melo Gallindo Borges

**ESTUDO DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR SOBRE  
SUPERFÍCIES DE FILMES POLIMÉRICOS MODIFICADOS  
POR PROCESSO DE PLASMA FRIO COM DESCARGA DE  
BARREIRA DIELÉTRICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Química.  
Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis

2012



Catálogo na fonte elaborada pela Biblioteca da  
Universidade Federal de Santa Catarina

B732e Borges, Adriana de Melo Gallindo  
Estudo de adesão e proliferação celular sobre superfícies  
de filmes poliméricos modificados por processo de plasma frio  
com descarga de barreira dielétrica [tese] / Adriana de Melo  
Gallindo Borges ; orientador, Valdir Soldi. - Florianópolis,  
SC, 2012.

183 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-  
Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Plasma de baixa temperatura. 3. Células -  
Proliferação. 4. Fibroblasto. I. Soldi, Valdir. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Química. III. Título.

CDU 54




Adriana de Melo Gallindo Borges


**ESTUDO DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR SOBRE  
SUPERFÍCIES DE FILMES POLIMÉRICOS MODIFICADOS POR  
PROCESSO DE PLASMA FRIO COM DESCARGA DE BARREIRA  
DIELÉTRICA**

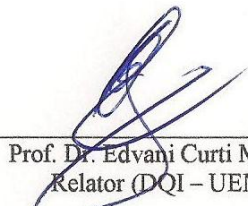
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de  
**Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da**  
Universidade Federal de Santa Catarina.


Florianópolis, 13 de abril de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Almir Spinelli  
Coordenador do Programa

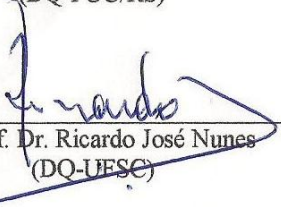
**Banca Examinadora:**


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Valdir Soldi  
Orientador (DQ-UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edvani Curti Muniz  
Relator (DQI – UEM)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Rosane A. Ligabue  
(DQ-PUC/RS)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Guilherme M. O. Barra  
(EMC-UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo José Nunes  
(DQ-UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Nito Angelo Debacher  
(DQ-UFSC)



*Os ventos que às vezes tiram algo que amamos, são os mesmos  
que trazem algo que aprendemos a amar...*

*Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim,  
aprender a amar o que nos foi dado. Pois tudo aquilo que é realmente  
nosso, nunca se vai para sempre...ö Bob Marley*

*Dedico este trabalho ao meu querido pai.  
Lembro como se fosse hoje você cantando esta música para mim.  
Ela soará em meus ouvidos para sempre.*

*O Coisinha Tão Bonitinha Do Pai,  
O Coisinha Tão Bonitinha Do Pai.*





## AGRADECIMENTOS

Ao professor Valdir Soldi pela oportunidade, orientação, dedicação e amizade e por toda a confiança em mim depositada desde o início do mestrado. Principalmente por ter me proporcionado independência na realização deste trabalho. Obrigada por tudo!

Aos professores membros da banca examinadora pela gentileza em aceitarem o convite e pela dedicação em ler este trabalho.

Ao professor Nito pela colaboração e em especial ao seu aluno Luís Otávio pela ajuda na modificação superficial por plasma.

Ao professor André Pasa e seu aluno Vinícius do Departamento de Física da UFSC pela ajuda na execução e discussão das análises de AFM.

Ao professor Celso do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC por ter disponibilizado o aparelho de ângulo de contato e em especial ao Giuseppe pela ajuda nesta análise.

Ao professor Cláudio Radtke do Instituto de Física da UFRGS pela execução das análises de XPS.

Agradeço à professora Maria Cláudia e suas alunas Marley e Pâmela do Departamento de Análises Clínicas da UFSC pela ajuda na realização e discussão das análises de adesão celular e citotoxicidade. Igual agradecimento ao professor Jamil do Departamento de Farmacologia da UFSC pela principal colaboração no que diz respeito à aplicação deste trabalho. Tenho aprendido muito com vocês!

À Marly pela amizade e pelos conselhos nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Materiais Poliméricos (POLIMAT), especialmente a minha amiga Ledi e a Silvia que me ajudaram na execução deste trabalho. Agradeço imensamente pela convivência durante esses anos e por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável e estimulante. O melhor laboratório!

Às minhas queridas amigas químicas Gi Almerindo e Lidi, obrigada por todo carinho e amizade. "Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente!" (Machado de Assis)

A todos os professores do departamento de química da UFSC que contribuíram para que eu chegasse até aqui, e em especial, ao professor Eduardo Antônio Pinheiro (*in memoriam*) pelo grande ensinamento na área de Físico-Química e pelo grande exemplo de seriedade, competência e ética.

Agradeço à Grace e ao Jadir, pela sempre pronta ajuda prestada durante este período.

Ao CNPq pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Gizelly e Arthur por estarem presentes em todos os momentos. ãA amizade é um amor que nunca morreõ (Mário Quintana)

À minha cunhada Andrezza Borges por todo amor, conselho e amizade. Obrigada por tudo!

Ao meu irmão Agenor, minha cunhada Adriana, meu afilhado Felipe e ao meu sobrinho Vinícius pela compreensão quando não consegui estar presente. Minha família, meu porto seguro!

À minha segunda família, minha Sogra Beatriz pelo carinho, amizade e ajuda nos momentos que eu mais precisei. Obrigada com todo meu amor! Aos meus cunhados Amanda e Matheus pela amizade.

À minha mãe, que apesar de todas as dificuldades, me ajudou de todas as formas possíveis e imagináveis para que eu alcançasse meus objetivos. Pelas lições de honestidade e humildade. Te amo muito...

Em especial, ao meu amado esposo Daniel, por todo seu companheirismo e compreensão nos momentos de ausência durante a redação desta tese e pelas dicas valiosas para este trabalho. Obrigada por você ser essa pessoa indescritível e tornar a minha vida mais feliz. Obrigada õpapaiõ por proporcionar este momento mágico que estou vivendo. Te amamos eternamente!

Agradeço, enfim, a Deus, por estar sempre presente, ter me inspirado e iluminado meu caminho.

*ãA alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.  
Não na vitória propriamente dita*

*Mahatma Ghandi*



## RESUMO

Este trabalho descreve a síntese de filmes poliméricos, sua modificação e a avaliação quanto à adesão de espécies celulares. Filmes de poliestireno (PS) e poli (metacrilato de metila) (PMMA) e mistura com 1:1 de composição preparados por *casting* foram avaliados quanto ao crescimento e proliferação de fibroblastos L-929. Estudos envolvendo modificação da superfície destes polímeros foram desenvolvidos, com resultados promissores decorrentes da utilização de plasma frio através de descarga de barreira dielétrica (DBD) para induzir a modificação da superfície, após planejamento fatorial das condições experimentais. Alterações nas propriedades da superfície com relação às amostras não tratadas foram acompanhadas por medidas de ângulo de contato, energia de superfície, histerese, microscopia eletrônica de varredura (SEM) e SEM com espectrometria de energia dispersiva, microscopia de força atômica (AFM) e espectrometria fotoeletrônica de raios-X. Após o tratamento, excelente aderência e proliferação de células foram observadas em todos os filmes com maior proliferação celular no filme PS/PMMA 1:1. Filmes finos de zeína obtidos por *spin coating* foram também tratados por plasma frio com DBD. Após o tratamento, uma pequena variação de molhabilidade foi detectada, além de aumento de rugosidade. A adsorção de albumina de soro bovino na superfície dos filmes foi também avaliada. Todos os filmes apresentaram excelente adesão das células L-929 após os dois tratamentos. Resultados preliminares para filmes finos nanoestruturados formados a partir de dois copolímeros em bloco de poliestireno e poli(ácido acrílico) são também descritos. Ambos os filmes, após análise por AFM, apresentaram superfícies mais rugosas e uma significativa melhora na adesão e proliferação das células L-929, o que os torna potenciais biomateriais para aplicação biomédica.

**Palavras-chave:** Filmes poliméricos, plasma frio, proliferação celular, fibroblastos.



## ABSTRACT

This work describes the synthesis of polymeric films, their surface modification and an evaluation of their ability to promote adhesion of cell species. Films formed with the casting technique from poly(styrene) (PS), poly (methyl methacrylate) (PMMA) and a 1:1 mixture of both were evaluated towards the growth and proliferation of L-929 fibroblasts. Studies involving the surface modification of the polymeric films were carried out, with promising results obtained from the use of cold plasma generated by a dielectric barrier discharge (DBD), following a factorial design for optimization of the operating parameters. Changes in the surface properties of the plasma-treated films were evaluated by means of contact angle, surface energy and hysteresis measurements, scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive SEM, atomic force microscopy (AFM) and X-ray photoelectronic spectrometry. Substantial proliferation of cells was observed on the surface of all plasma-treated films, with a superior performance of the PS/PMMA 1:1 film. Thin films produced from zein using the spin coating technique were also submitted to DBD-cold plasma treatment. A minor variation in the wettability of the plasma-treated films was observed, in addition to increased rugosity. The effect of adsorption of bovine serum albumin on the polymeric film surface was also evaluated. Both surface-based treatments resulted in enhanced adhesion of L-929 cells on the polymeric films. Preliminary results for nanostructured thin films formed from two block copolymers of poly(styrene) and poly(acrylic acid) are also presented. AFM analysis of the surface of both plasma-treated films evidenced increased rugosity, which was accompanied by a substantial improvement in the adhesion and proliferation of L-929 cells, turning these polymeric films into promising biomaterials.

**Keywords:** Polymeric films, cold plasma, cell proliferation, fibroblasts.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> ó Estrutura do monômero de poliestireno.....	39
<b>Figura 2.2</b> ó Estrutura do monômero de poli(metacrilato de metila)....	40
<b>Figura 2.3</b> ó Modelo estrutural da zeína roda em hélice para seqüência de 18 repetições de aminoácidos (GLN = Glutamina, ASN = asparagina, ALA = alanina, FEN = fenilalanina, TIR = tirosina, LEU = leucina, SER = serina, VAL = valina, PRO = prolina). Modelo adaptado (ARGOS <i>et al.</i> , 1982).....	44
<b>Figura 2.4</b> ó Estrutura química dos principais aminoácidos presentes na zeína: ácido glutâmico (a), leucina (b), prolina (c) e alanina (d)..	45
<b>Figura 2.5</b> ó Representação esquemática das morfologias que podem ser obtidas pelas cadeias dos copolímeros em bloco AB, onde $f_A$ representa a fração molar de cada componente. Modelo adaptado (DARLING,2007).....	47
<b>Figura 2.6</b> ó Estrutura dos monômeros de PS- <i>b</i> -PAA.....	48
<b>Figura 2.7</b> ó Representação da superfície do implante e sua interação com as moléculas do fluido tecidual: biomaterial (a), moléculas de água (b), camada glicoprotéica (c), célula (d). Modelo adaptado (KASEMO, 2002).....	50
<b>Figura 2.8</b> ó Modelo ilustrativo da engenharia de tecido. Cultura de células (1), expansão de células (2), proliferação de células (3), células a serem implantadas no biomaterial (4), biomaterial com as células (5), implante <i>in vivo</i> (6). Modelo adaptado (BARBANTI <i>et al.</i> , 2005).....	59
<b>Figura 4.1</b> ó Configuração experimental do sistema DBD utilizado neste trabalho (A) e vista superior do reator DBD com o filme do polímero no interior (B).....	69
<b>Figura 4.2</b> ó Formas de onda de tensão e corrente do reator DBD.....	70
<b>Figura 4.3</b> ó Configuração experimental do sistema DBD múltiplas pontas-plano utilizado neste trabalho.....	73
<b>Figura 5.1</b> ó Micrografias obtidas por SEM das células L929 após 24 h de contato com os filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) e controle (lamínula de vidro) (D) ó aumento de 50x.....	88
<b>Figura 5.2</b> ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS/PMMA 1:1 após serem submetidos a três métodos de esterilização: tampão PBS/UV (A), óxido de etileno (B) e somente por radiação UV (C), após 24 h de cultura de células L-929 ó aumento de 40x.....	89

<b>Figura 5.3</b> ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. * P < 0,001 comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumento de 40x.....	90
<b>Figura 5.4</b> ó Avaliação por citometria de fluxo com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. * P < 0,001 comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni.....	91
<b>Figura 5.5</b> ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS/PMMA 1:1 (A) e controle (B) após 24 h de cultura de células B16F10. * P < 0,001 comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumento de 40x.....	92
<b>Figura 5.6</b> ó Valores de ângulos de contato em água para os filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA após o planejamento experimental.....	93
<b>Figura 5.7</b> ó Superfícies de resposta obtidas a partir de um modelo linear para PS (A), PS/PMMA 1:1 (B) e PMMA (C) usando ângulo de contato em água ( $\theta$ ) em função da vazão ( $Q$ ) de O <sub>2</sub> e tempo de tratamento ( $t$ ).....	96
<b>Figura 5.8</b> ó Valores de ângulo de contato para a superfície dos filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B) e PMMA (C) antes e após a modificação.....	98
<b>Figura 5.9</b> ó Imagens de gotas de água na superfície dos filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B) e PMMA (C) antes e após a modificação.....	99
<b>Figura 5.10</b> ó Micrografias das superfícies para os filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B) e PMMA (C) antes e após a modificação - aumento de 500x.....	106
<b>Figura 5.11</b> ó Imagens topográficas obtidas por AFM (2,0 x 2,0) $\mu\text{m}^2$ da superfície dos filmes de PS (A) e PMMA (B) antes e após a modificação. A escala de altura foi normalizada para uma melhor observação da superfície e R mostra a rugosidade da superfície.....	109
<b>Figura 5.12</b> ó Imagens topográficas obtidas por AFM (2,0 x 2,0) $\mu\text{m}^2$ da superfície do filme de PS/PMMA 1:1 (antes e após a	

modificação) formado pelos domínios da região superior (A) e pelos domínios da região inferior (B). A escala de altura foi normalizada para uma melhor observação da superfície e R mostra a rugosidade da superfície.....	110
<b>Figura 5.13</b> ó Espectros de XPS do sinal do C <sub>1s</sub> dos filmes de PS não modificados (A) e modificados (B) por DBD.....	112
<b>Figura 5.14</b> ó Espectros de XPS do sinal do O <sub>1s</sub> dos filmes de PS não modificados (A) e modificados (B) por DBD.....	114
<b>Figura 5.15</b> ó Espectros de XPS do sinal do C <sub>1s</sub> dos filmes de PMMA não modificados (A) e modificados (B) por DBD.....	115
<b>Figura 5.16</b> ó Espectros de XPS do sinal do O <sub>1s</sub> dos filmes de PMMA não modificados (A) e modificados (B) por DBD.....	117
<b>Figura 5.17</b> ó Espectros de XPS do sinal do C <sub>1s</sub> dos filmes de PS/PMMA 1:1 não modificados (A) e modificados (B) por DBD.....	118
<b>Figura 5.18</b> ó Espectros de XPS do sinal do O <sub>1s</sub> dos filmes de PS/PMMA 1:1 não modificados (A) e modificados (B) por DBD.....	120
<b>Figura 5.19</b> ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) (antes e após a modificação) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. * P < 0,001 comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumento de 40x.....	123
<b>Figura 5.20</b> ó Avaliação por citometria de fluxo com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) (antes e após a modificação) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. * P < 0,001 comparado ao grupo controle e # P < 0,001 comparado aos filmes não modificados, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni.....	124
<b>Figura 5.21</b> ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície do filme de PS/PMMA 1:1 modificado formado pelos domínios de PS (A) e pelos domínios de PMMA (B) após 24 h de cultura de células L-929. * P < 0,001 comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumento de 40x.....	125
<b>Figura 5.22</b> ó Imagens obtidas por SEM das células L929 após 24 h de contato com os filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA	

(C) (antes e após a modificação) e controle (D) ó aumento de 1000x.....	127
<b>Figura 5.23</b> ó Mecanismo proposto para a eficiência do processo de adesão e proliferação celular na superfície do filme de PS/PMMA 1:1 modificado.....	128
<b>Figura 6.16</b> Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de zeína antes (A), após os tratamentos 1 (B), 2 (C) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. * P < 0,001 comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumentos de 40x à esquerda e de 80x à direita.....	136
<b>Figura 6.2</b> ó Imagens de gotas de água na superfície dos filmes de zeína antes (A) e após submetidos ao tratamento 1 (B) e 2 (C).....	138
<b>Figura 6.3</b> ó Imagens topográficas obtidas por AFM (15,0 x 15,0) $\mu\text{m}^2$ da superfície dos filmes de zeína antes (A) e após submetidos ao tratamento 1 (B) e 2 (C). A escala de altura foi normalizada para uma melhor observação da superfície e R mostra a rugosidade da superfície.....	140
<b>Figura 6.4</b> ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de zeína antes (A), após a adsorção de BSA (B) e após tratamento por plasma e adsorção de BSA (C) após 24 h de cultura de células L-929 - aumentos de 40x à esquerda e de 80x à direita.....	143
<b>Figura 7.1</b> ó Imagens topográficas obtidas por AFM (4,0 x 4,0) $\mu\text{m}^2$ da superfície dos filmes de copolímeros C1 (A) e C2 (B) antes e após a modificação. A escala de altura foi normalizada para uma melhor observação da superfície e R mostra a rugosidade da superfície.....	151
<b>Figura 7.2</b> ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de copolímeros C1 (A) e C2 (B) antes e após a modificação - aumentos de 80x.....	153

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> ó Algumas aplicações biomédicas de polímeros sintéticos (RATNER,1989).....	38
<b>Tabela 2.2</b> ó Exemplos de proteínas utilizadas em aplicações biomédicas e suas aplicações (SILVIA <i>et al.</i> , 2012; MALAFAIA, <i>et al.</i> , 2007).....	42
<b>Tabela 4.1</b> ó Matriz experimental para o planejamento experimental <sup>2</sup> usado no estudo do efeito da vazão de gás e de tempo de tratamento por plasma frio sobre o ângulo de contato dos filmes tratados.....	68
<b>Tabela 4.2</b> ó Valores das energias superficiais dos líquidos usados no cálculo das componentes dispersiva e polar da energia superficial.....	77
<b>Tabela 5.1</b> ó Ângulos de contato de equilíbrio ( $\theta_e$ ), energia de superfície total ( $\gamma_s$ ) e componentes de energia de superfície dos filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA antes e após a modificação.....	101
<b>Tabela 5.2</b> ó Valores de ângulos de avanço e recuo ( $\theta_a$ e $\theta_r$ respectivamente) e histerese ( $\Delta\theta$ ) de filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA antes e após a modificação.....	103
<b>Tabela 5.3</b> ó Ângulo de contato de equilíbrio ( $\theta_e$ ) em água do envelhecimento dos filmes tratados após 240 h.....	104
<b>Tabela 5.4</b> ó Estudo de EDS nas regiões superiores e inferiores dos domínios presentes no filme de PS/PMMA 1:1.....	107
<b>Tabela 5.5</b> ó Valores percentuais de $C_{1s}$ e $O_{1s}$ obtidos no espectro de XPS para os filmes de PS, PS/PMMA 1:1 E PMMA antes e após a modificação.....	121
<b>Tabela 6.1</b> ó Pontos atribuídos aos experimentos referentes ao planejamento experimental dos filmes de zeína, onde os pontos 1, 2 e 3 referem-se a pouca, média e excelente adesão celular, respectivamente.....	134



## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

**AC** ó Corrente alternada

**AFM** ó Microscopia de força atômica (do inglês *atomic force microscopy*)

**ALA** ó Alanina

**ASN** ó Asparagina

**BSA** ó Albumina de soro bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

**C1** ó PS<sub>115</sub>-*b*-PAA<sub>15</sub>

**C<sub>1s</sub>** ó Região do orbital 1s do carbono

**C2** ó PS<sub>183</sub>-*b*-PAA<sub>19</sub>

**DBD** ó Descarga de barreira dielétrica

**DMEM** ó Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's modified Eagle Medium*)

**DSC** ó Calorimetria exploratória diferencial (do inglês *differential exploratory calorimetry*)

**ECM** ó Matriz extracelular (do inglês *extracellular matrix*)

**ED** ó Espectrometria de energia dispersiva (do inglês *energy dispersive spectrometry*)

**EDTA** ó Etilenodiamino tetracético

**EDX** ó Energia dispersiva de raios-X (do inglês *energy dispersive x-ray*)

***f*** ó Fração em volume

**FEN** ó Fenilalanina

**GLN** ó Glutamina

**HSA** ó Albumina de soro humano (do inglês *human serum albumin*)

**LEU** ó Leucina

**M<sub>n</sub>** ó Massa molar numérica média

**M<sub>w</sub>** ó Massa molar ponderal média

***N*** ó Grau de polimerização

***n*** ó Número de células vivas

**O<sub>1s</sub>** ó Região do orbital 1s do oxigênio

**PAA** ó Poli(ácido acrílico)

**PBS** ó Solução tampão fosfato-salina

**PCL** ó Poli(caprolactona)

**PDI** ó Grau de polidispersidade

**PE** ó Polietileno

**PET** ó Poli(tereftalato de etileno)

**PGA** ó Poli(ácido glicólico)

**pI** ó Ponto isoelétrico

**PLA** ó Poli(ácido láctico)

**(PLA-co-PGA)** ó Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)  
**PMMA** ó Poli(metacrilato de metila)  
**PRO** ó Prolina  
**PS** ó Poliestireno  
**PS-*b*-PAA** ó Poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico)  
**PS-*b*-PMMA** ó Poli(estireno-*b*-metacrilato de metila)  
**PTFE** ó Poli(tetraflúor etileno)  
**PU** ó Poliuretano  
**PVC** ó Poli(cloreto de vinila)  
**Q** ó Vazão de gás  
**R** ó Rugosidade  
**SEM** ó Microscopia eletrônica de varredura (do inglês *scanning electron microscopy*)  
**SER** ó Serina  
**SNC** ó Sistema nervoso central  
**t** ó Tempo de tratamento  
**Tg** ó Temperatura de transição vítrea  
**THF** ó Tetrahidrofurano  
**TIR** ó Tirosina  
**UV** ó Ultravioleta  
**v** ó Tensão elétrica primária  
**VAL** ó Valina  
**XPS** ó Espectroscopia fotoeletrônica de raios- X (do inglês *x-ray photoelectron spectroscopy*)  
 $\gamma_L$  ó Energia de superfície do líquido  
 $\gamma_L^d$  ó Componente dispersiva da energia de superfície do líquido  
 $\gamma_L^p$  ó Componente polar da energia de superfície do líquido  
 $\gamma_s$  ó Energia de superfície do sólido  
 $\gamma_s^d$  ó Componente dispersiva da energia de superfície do sólido  
 $\gamma_s^p$  ó Componente polar da energia de superfície do sólido  
 $\Delta\theta$  ó Histerese  
 $\theta$  ó Ângulo de contato  
 $\theta_a$  ó Ângulo de avanço  
 $\theta_e$  ó Ângulo de contato de equilíbrio  
 $\theta_r$  ó Ângulo de recuo  
 $\chi$  ó Parâmetro de interação de Flory-Huggins



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	33
2.1. Biomateriais .....	35
2.1.1. Polímeros sintéticos .....	37
2.1.1.1. Poliestireno e Poli(metacrilato de metila) .....	39
2.1.2. Polímeros naturais .....	41
2.1.2.1. Proteína do milho ó Zeína .....	42
2.1.3. Filmes nanoestruturados .....	45
2.1.3.1. Poliestireno- <i>b</i> -poli(ácido acrílico) .....	47
2.2. Adesão biomaterial-célula .....	48
2.3. Modificação da superfície dos materiais .....	50
2.3.1. Modificação biológica ó Adsorção de proteína .....	50
2.3.1.1. Albumina de soro bovino .....	51
2.3.2. Modificação por plasma .....	52
2.3.2.2. Plasma frio do tipo corona com reator de descarga de barreira dielétrica .....	54
2.4. Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	56
2.4.1. Células L-929 .....	57
2.5. Engenharia de tecidos .....	58
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS</b> .....	61
3.1. Objetivos gerais .....	63
3.2. Objetivos específicos .....	63
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	65
4.1. SISTEMA 1- FILMES PREPARADOS POR <i>CASTING A PARTIR DE PS E PMMA</i> .....	67
4.1.1. Materiais poliméricos .....	67
4.1.2. Solvente para preparo dos filmes .....	67
4.1.3. Preparação dos filmes .....	67
4.1.4. Modificação da superfície por plasma frio com reator do tipo descarga de barreira dielétrica (DBD) .....	67
4.1.4.1. Planejamento experimental .....	67
4.1.4.2. Reator de plasma frio DBD cilíndrico .....	68
4.1.4.3. Procedimento de modificação da amostra .....	69
4.1.4.4. Medidas elétricas do reator DBD .....	70

4.1.4.5. Envelhecimento dos filmes por <i>casting</i> .....	70
4.2. SISTEMA 2 ó FILMES FINOS PREPARADOS POR <i>SPIN COATING</i> A PARTIR DE ZEÍNA .....	71
4.2.1. Materiais poliméricos .....	71
4.2.2. Preparação e limpeza do substrato .....	71
4.2.3. Solvente para preparo dos filmes .....	71
4.2.4. Preparação dos filmes .....	71
4.2.5. Modificação da superfície por plasma frio com reator de descarga de barreira dielétrica (DBD) .....	72
4.2.5.1. Planejamento experimental .....	72
4.2.5.2. Reator de plasma frio DBD plano .....	72
4.2.5.3. Procedimento de modificação da amostra .....	73
4.2.6. Adsorção de albumina de soro bovino .....	74
4.3. SISTEMA 3 ó FILMES FINOS NANOESTRUTURADOS PREPARADOS POR <i>SPIN COATING</i> A PARTIR DE PS- <i>b</i> -PAA .....	75
4.3.1. Materiais poliméricos .....	75
4.3.2. Preparação dos filmes .....	75
4.3.3. Modificação da superfície por plasma frio com reator de descarga de barreira dielétrica (DBD) .....	75
4.3.3.1. Reator de plasma frio DBD plano .....	75
4.3.3.2. Procedimento de modificação da amostra .....	75
4.4. Caracterização da superfície dos filmes .....	76
4.4.1. Análise térmica .....	76
4.4.1.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	76
4.4.2. Estudo de molhabilidade .....	76
4.4.2.1. Determinação do ângulo de contato .....	76
4.4.2.2. Envelhecimento da superfície dos filmes tratados .....	77
4.4.2.3. Cálculo da energia de superfície .....	77
4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) .....	78
4.4.4. Espectrometria de energia dispersiva (EDS) .....	78
4.4.5. Microscopia de força atômica (AFM) .....	78
4.4.6. Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) .....	78
4.4.7. Cultura celular .....	79
4.4.7.1. Método de preparação .....	79
4.4.7.2. Método de esterilização .....	79
4.4.8. Avaliação da adesão e proliferação celular .....	80
4.4.9. Teste de citotoxicidade .....	80
4.4.10. Avaliação por microscopia eletrônica de varredura ...	81
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO ó FILMES DE PS E PMMA</b>	<b>83</b>

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES .....	85
5.1. Adesão celular nos filmes não modificados .....	87
5.1.1. Caracterização dos filmes .....	87
5.1.2. Adesão de células L-929 .....	88
5.1.2.1. Métodos de esterilização .....	88
5.1.2.2. Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	89
5.1.3. Citotoxicidade <i>in vitro</i> ó células B16F10 .....	92
5.2. Filmes não modificados e modificados por DBD .....	93
5.2.1. Planejamento experimental .....	93
5.2.2. Estudo de molhabilidade .....	97
5.2.2.1. Medidas de ângulo de contato .....	97
5.2.2.2. Medidas da energia de superfície .....	99
5.2.2.3. Medidas de histerese .....	102
5.2.2.4. Envelhecimento da superfície dos filmes tratados .	103
5.2.3. Caracterização morfológica da superfície .....	104
5.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) .....	104
5.2.3.2. Espectrometria de energia dispersiva (EDS) .....	105
5.2.4. Caracterização topográfica .....	107
5.2.4.1. Microscopia de força atômica (AFM) .....	107
5.2.5. Análise química .....	110
5.2.5.1. Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) ...	110
5.2.6. Adesão de células L-929 .....	122
5.2.6.1. Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	122
5.2.6.2. Estudo de morfologia celular .....	125
5.2.7. Justificativa para a adesão celular ter sido mais eficiente no filme de PS/PMMA 1:1 .....	128
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO - FILMES DE ZEÍNA</b> .....	129
CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES .....	131
6.1. Filmes não modificados e modificados por DBD .....	133
6.1.1. Planejamento experimental .....	133
6.1.2. Adesão de células L-929 .....	134
6.1.2.1. Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	134
6.1.3. Caracterização da superfície .....	137
6.1.3.1. Estudo de molhabilidade ó medidas de ângulo de contato .....	137
6.1.3.2. Estudo de Topografia ó Microscopia de força atômica (AFM) .....	139
6.1.4. Adsorção de albumina de soro bovino (BSA) .....	140
6.1.4.1. Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	140
<b>CAPÍTULO 7</b>	

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO - FILMES DE PS-<i>b</i>-PAA</b> .....	145
<b>CONSIDERAÇÕES PRELIMIARES</b> .....	147
7.1. Formação de nanoestruturas .....	149
7.2. Filmes não modificados e modificados por DBD .....	150
7.2.1. Caracterização de superfície .....	150
7.2.1.1. Estudo de topografia ó Microscopia de força atômica (AFM) .....	150
7.2.2. Adesão de células L-929 .....	151
7.2.2.1. Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	151
<b>CAPÍTULO 8</b>	
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	155
8.1. Conclusões .....	157
8.2. Perspectivas futuras .....	158
<b>CAPÍTULO 9</b>	
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	161
<b>CAPÍTULO 10</b>	
<b>APÊNDICE</b> .....	179

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**



A escassez mundial de doadores para transplante de tecidos ou órgãos se torna um problema de grandes proporções tanto para a saúde pública quanto de ordem sócio-econômica. Estes transplantes são necessários para corrigir a perda total ou parcial da função de um órgão ou tecido, independente da sua causa. Assim, diante da complexidade e desafios aparece a engenharia tecidual como a convergência de diversas áreas do conhecimento humano focadas na aplicação clínica. Esse novo e excitante campo das ciências aparece como um caminho para entender, mimetizar e aumentar a capacidade regenerativa dos tecidos e órgãos humanos, promovendo a cura de tecidos ou a substituição de órgãos (SILVA, 2008).

Atualmente, pesquisadores vêm utilizando, de modo sistemático, macromoléculas sintéticas e/ ou naturais para a fabricação de biomateriais, elementos que visam substituir um tecido ou órgão biológico com a finalidade última de favorecer a vida. O sucesso de um polímero a ser utilizado como biomaterial depende, em parte, da adesão e proliferação das células de interesse na sua superfície.

Os recentes avanços da nanotecnologia têm também proporcionado desenvolvimentos significativos na área de biomateriais. De uma forma genérica, a nanotecnologia refere-se a um campo da ciência e da tecnologia aplicada, no qual o controle da matéria é efetuado a nível molecular. De fato, as recentes investigações na área de materiais nanoestruturados para aplicações na área biomédica têm se baseado na premissa de que estes nanomateriais podem ser sintetizados e funcionalizados em dimensões semelhantes às dos constituintes dos próprios tecidos a regenerar.

Filmes poliméricos possuem um vasto campo de aplicação, devido a algumas propriedades que são inerentes a esse tipo de material, tais como boa resistência mecânica e baixo custo de produção. Entretanto, possuem limitações como baixa tensão superficial e baixa rugosidade, que impedem o uso dos mesmos para algumas finalidades, principalmente quando esse uso requer que o material possua uma boa molhabilidade. Dentre as várias técnicas existentes para aumentar a tensão superficial, as técnicas que utilizam o plasma como fonte energética são as mais promissoras pela versatilidade e por não apresentar agentes nocivos ao meio (COSTA, *et al.*, 2008). Em particular, o plasma gerado em descargas com barreira dielétrica (DBD) que operam a pressões próximas à da atmosfera, vêm sendo utilizadas para o propósito de tratamento superficial. A vantagem desse tipo de modificação é que as propriedades da superfície e a biocompatibilidade podem ser aumentadas seletivamente, enquanto os atributos do material

permanecem inalterados. Além da modificação de superfície por plasma, a modificação por processo biológico, através da adsorção de fatores de crescimento celular, tais como as proteínas, parece bastante promissora, uma vez que ajuda a reduzir a resposta inflamatória e, conseqüentemente, aumenta a adesão e proliferação celular (D'SA *et al.*, 2010).

Neste contexto, é que se insere este trabalho de tese que teve como finalidade estudar três tipos de sistemas poliméricos, todos com o propósito de investigar a aplicabilidade como biomaterial. O primeiro está relacionado à produção de filmes via *casting* a partir de polímeros sintéticos formados por poliestireno (PS) e poli(metacrilato de metila) (PMMA). Os outros dois sistemas, um de base proteica e outro um copolímero em bloco, foram preparados e utilizados na forma de filmes finos. No sistema proteico, foi utilizada a zeína (proteína do milho) por se tratar de um polímero biodegradável, tornando mais ampla e interessante a sua aplicabilidade. No caso do terceiro sistema, o polímero utilizado foi um copolímero do tipo dibloco formado por PS e poli(ácido acrílico) (PAA) - (PS-*b*-PAA). O aspecto interessante deste sistema está na capacidade do mesmo em formar nanoestruturas.

Os três sistemas tiveram suas superfícies modificadas por um sistema de plasma frio com um reator do tipo descarga de barreira dielétrica (DBD), a fim de torná-las mais propícias à adesão e proliferação celular. Além disso, no segundo sistema foi realizada uma modificação biológica através da adsorção de um fator de crescimento celular, a albumina sérica bovina (BSA). Estudos de caracterização de superfície foram realizados para todos os sistemas estudados, envolvendo diversas técnicas.



**CAPÍTULO 2**  
**REVISÃO DA LITERATURA**



## 2.1. Biomateriais

Uma possível definição de biomaterial é de uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, de origem natural ou sintética, idealizada para ser incorporada por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter a sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido (WILLIAMS, 1987).

A utilização de biomateriais para o reparo de tecidos vivos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento de novos materiais e a uma melhor compreensão dos mecanismos de sua interação com os organismos vivos (ALAERTS *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2004; SEIDI *et al.*, 2011; CHENG & CAO, 2010; ARTZI *et al.*, 2011; SMOLKO *et al.*, 2001). Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser classificados como metais, cerâmicas, compósitos e polímeros (RAABE *et al.*, 2007; OAK & INOUE, 2007; LIU *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2004; MOLLICA *et al.*, 2006).

Os materiais metálicos têm sido usados na confecção de implantes devido às suas boas propriedades mecânicas, facilidade de fabricação e baixo custo. Certos elementos metálicos são tolerados pelo organismo em quantidades limitadas, sendo alguns até essenciais para funções celulares ou metabólicas. Em quantidades elevadas, porém, são altamente agressivos em virtude da corrosão metálica, uma vez que a corrosão é passível de ocorrer em ambiente fisiológico. Quando ocorre corrosão, pode-se comprometer as propriedades mecânicas do implante metálico, como também pode haver enfraquecimento das interações implante-metal, comprometendo a fixação do mesmo. Além disso, os produtos de corrosão migram para os tecidos na região do implante, trazendo efeitos indesejáveis (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Os materiais cerâmicos são compostos inorgânicos tipicamente duros, com vasta aplicação na área médica (ORÉFICE *et al.*, 2006). Dentre estes materiais destacam-se as cerâmicas microporosas à base de fosfato de cálcio, em razão da semelhança química, mineralógica e cristalográfica à do esqueleto humano, o que favorece a biocompatibilidade e regeneração de tecidos duros (DACULSI, 1998; DAS *et al.*, 2001). Entretanto, a baixa resistência mecânica limita suas aplicações em regiões sujeitas a solicitações mecânicas elevadas (ZHITOMIRSKY, 2000).

Materiais compósitos são materiais formados por dois ou mais componentes com distintas composições, estruturas e propriedades e que estão separados por uma única interface. Uma grande vantagem na

produção de compósitos é de combinar diferentes materiais para produzir um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes unitários. Dessa forma, compósitos com finalidades biomédicas são facilmente encontrados em dispositivos e sistemas modernos. Em termos de propriedades mecânicas, os compósitos apresentam propriedades mecânicas muito superiores às dos outros materiais, incluindo metais e cerâmicas. Entretanto, como desvantagem geral dos compósitos pode-se citar a dificuldade de processamento (ORÉFICE *et al.*, 2006).

No intuito de substituir os materiais metálicos, cerâmicos e compósitos, ou torná-los mais resistentes, vários polímeros têm sido estudados e indicados para aplicações na área médica.

Os polímeros são representados por um extenso grupo de materiais que apresentam caráter macromolecular. Podem ser produzidos através da polimerização de monômeros - polímeros sintéticos ou de origem biológica - polímeros naturais. Podem ainda ser classificados como polímeros puros, apresentando apenas um tipo de monômero; como copolímeros, quando a cadeia apresenta dois ou mais tipos de monômeros diferentes ligados quimicamente; ou como blendas poliméricas que são misturas físicas de dois ou mais polímeros puros sem que haja uma ligação química entre eles (CANEVAROLO JR, 2002; LUCAS *et al.*, 2001; ELIAS, 1984).

Os polímeros apresentam grande potencial de uso em biomateriais devido às várias características que apresentam e que os tornam, muitas vezes, essenciais para desempenhar funções específicas, pois são, geralmente, fáceis de produzir e manusear e apresentam características mecânicas semelhantes às dos materiais biológicos. A escolha de um polímero para ser usado como biomaterial passa necessariamente pela análise de um conjunto de requisitos (JALILI *et al.*, 2009):

- Ser biocompatível;
- Suportar crescimento de novo tecido;
- Favorecer a fixação e proliferação celular;
- Controlar a resposta inflamatória e imunológica;
- Ser quimicamente estável;
- Ser relativamente barato, reprodutível e de fácil fabricação.

Entre estas características, a biocompatibilidade é considerada a mais importante, pois é vista como a habilidade de um material em

desempenhar uma resposta apropriada no hospedeiro em uma aplicação específica, minimizando reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos (ELIAS, 1984). A biocompatibilidade compreende as interações dos tecidos humanos e fluidos, incluindo sangue, com um implante ou material. Um biomaterial deve ser biocompatível numa aplicação específica; assim, as especificações da biocompatibilidade devem incluir as condições de utilização (JALILI *et al.*, 2009; SILVER & DOILLON, 1989).

Os biomateriais poliméricos podem ser de origem sintética, natural ou de uma combinação de ambos.

### **2.1.1 Polímeros sintéticos**

Esforços para o desenvolvimento de polímeros sintéticos, particularmente a borracha sintética, foram intensificados após a Segunda Guerra Mundial, quando muitos materiais naturais não atenderam à alta demanda. Posteriormente surgiram vários tipos de polímeros, que foram responsáveis pelas constantes modificações nos hábitos da população do mundo atual (ORÉFICE *et al.*, 2006; CANEVAROLO JR, 2002).

Os polímeros sintéticos fazem parte do cotidiano, e representam uma das classes de materiais mais versáteis que existem, apresentando inúmeras aplicações, entre as quais, na área biomédica. Os polímeros sintéticos são os materiais mais extensivamente usados como biomateriais. Possuem como principais propriedades, alta flexibilidade, alta resistência ao impacto, baixas temperaturas de processamento e principalmente excelente propriedades mecânicas (SAITO *et al.*, 2005). Estes polímeros foram utilizados primeiramente como suturas à base de poliamidas sintéticas (Nylon). Um pouco mais tarde (1945), foram documentadas as primeiras aplicações de poli(metacrilato de metila) (PMMA), poli(tereftalato de etileno) (PET) e poli(cloreto de vinila) (PVC). Já em 1950, polímeros como polietileno (PE), poliuretano (PU) e poli(tetraflúor etileno) (PTFE) começaram também a ser usados em aplicações biomédicas (ORÉFICE *et al.*, 2006).

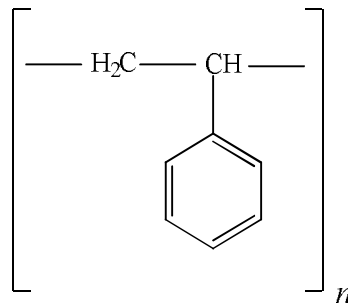
Atualmente, muitos polímeros sintéticos são usados como biomateriais (Tabela 2.1) sendo que a maioria está concentrada nas áreas de cardiologia, ortopedia, odontologia, oftalmologia e implantes de tecidos moles (RATNER, 1989).

**Tabela 2.1** ó Algumas aplicações biomédicas de polímeros sintéticos (RATNER, 1989).

Polímeros	Aplicações
Poliuretanas	Isolante para fio de marca passo, vasos sanguíneos e coração artificial, cateteres, substituinte de ligamentos.
Polissiloxanos	Juntas de dedos, membranas de oxigenação artificial, próteses de mama, válvulas de coração, cateteres.
Poliamidas	Suturas, microencapsulação de curto prazo, células artificiais.
Polietileno	Próteses de quadril, porta sangue para rins artificiais, ortopedia.
Poli(tereftalato de etileno)	Enxertos vasculares, reforços de implantes, suportes para regeneração de tecidos.
Poli(metacrilato de metila)	Próteses ortopédicas, lentes de contato rígidas, lentes intraoculares, cimento dentário e ósseo.

### 2.1.1.1. Poliestireno e Poli(metacrilato de metila)

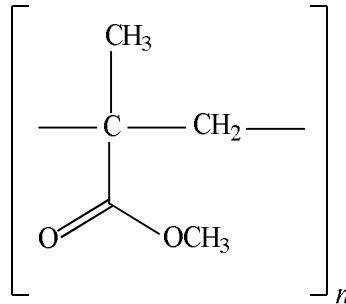
O poliestireno ó (PS) é um homopolímero derivado da polimerização do monômero aromático estireno (Figura 2.1), que é um hidrocarboneto líquido e é fabricado a partir do petróleo. O PS é uma resina do grupo dos termoplásticos, cuja característica reside na sua fácil flexibilidade ou moldabilidade. Sob a ação do calor, a resina toma a forma líquida ou pastosa, moldando-se com facilidade. Com o resfriamento após a moldagem, o produto readquire o estado sólido (CORAZZA, 1995; BRYDSON, 1999).



**Figura 2.1** ó Estrutura do monômero de poliestireno.

O poli(metacrilato de metila) (PMMA) é um homopolímero derivado do monômero metacrilato de metila (Figura 2.2). Este polímero é utilizado como biomaterial principalmente na ortopedia (próteses ósseas) e na oftalmologia (lentes intra-oculares) (TRINDADE *et al.*, 2001; LOCATELLI *et al.*, 2004).

A mistura desses polímeros (blendas) é amplamente estudada, uma vez que devido à separação de fases pela imiscibilidade dos dois constituintes torna-se possível obter propriedades diferentes das que seriam obtidas se os polímeros fossem utilizados separadamente. Além disso, também devido a imiscibilidade, a superfície de blendas apresenta estruturas segregadas predominantemente pela formação de macro domínios, o que pode ser de suma importância quando se deseja obter uma superfície heterogênea (DEKEYSER *et al.*, 2004).



**Figura 2.2** é Estrutura do monômero de poli(metacrilato de metila).

A literatura sobre estudo de blendas de PS e PMMA para aplicações biomédicas é bastante restrita. Recentemente (MELO *et al.*, 2009), filmes de PS, PMMA e blenda de PS:PMMA 1:1 foram preparados pelo método *casting*, comparados com filmes de copolímero em bloco de poliestireno-*b*-(metacrilato de metila) (PS-*b*-PMMA) e avaliados quanto à adesão celular usando fibroblastos de camundongos L929. O estudo comparativo entre a blenda (mistura física) e o copolímero em bloco parece importante tendo em vista que os mesmos polímeros da mistura estão ligados quimicamente (ligações covalentes) no copolímero, ou seja, os dois sistemas diferem estruturalmente. Apesar de todos os filmes apresentarem propriedades químicas adequadas e proliferação celular, o processo de adesão celular foi levemente favorecido na mistura, devido a formação de domínios e por sua maior característica hidrofílica quando comparado com outros filmes.

Tendo em vista aspectos biomecânicos e composição dos diferentes tecidos, é altamente desejável que determinados dispositivos biomédicos sofram processo de degradação. Ter um dispositivo que possa ser usado como um implante e que não necessite de um segundo evento cirúrgico para remoção é um dos grandes motivos de se utilizar um biopolímero absorvível. Entre os polímeros biocompatíveis para uso na área médica, um grupo promissor é o dos poli(-hidróxi ácidos). Os principais polímeros desse grupo são o poli(ácido láctico) (PLA), a poli(caprolactona) (PCL) e o poli(ácido glicólico) (PGA). A partir do momento que estes polímeros foram testados como biomateriais e mostraram resultados satisfatórios, tornaram-se rapidamente uma opção para este tipo de aplicação (ATHANASIOU *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2003). PLA e o PGA têm importância crescente na formação de tecido e



transplante de células em uma tentativa de determinar os efeitos de uma variedade de materiais biodegradáveis em proliferação de cartilagem (FREED *et al.*, 1993; BARBANTI *et al.*, 2008).

### **2.1.2. Polímeros naturais**

Polímeros naturais são estruturas formadas durante o ciclo de crescimento dos organismos vivos e são materiais biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos, com alta versatilidade química e um alto potencial para serem usados em diferentes aplicações. Entre estas destaca-se a sua utilização em adesivos, embalagens, géis, suportes e filmes (YU *et al.*, 2006; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006; CHANDRA & RUSTGI, 1998).

Os polímeros naturais são apropriados para o uso como materiais biomédicos devido a sua semelhança estrutural com os componentes dos tecidos. O fato de conterem unidades repetitivas semelhantes ou mesmo idênticos aos encontrados nas matrizes orgânicas dos organismos, reduz a possibilidade de ocorrência de problemas associados à toxicidade dos materiais de partida ou de seus produtos de degradação, ou favorecimento de reações inflamatórias crônicas (KAPLAN, 1998).

Entre os polímeros de ocorrência natural mais estudados na área biomédica estão os polissacarídeos e as proteínas.

Neste trabalho, no que concernem polímeros naturais, o foco é a utilização de polímeros de base proteica que são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas e constituem metade ou mais de seu peso seco em muitos organismos. As proteínas são constituídas por um conjunto de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas covalentes em sequências características que diferem um do outro por suas cadeias laterais, as quais variam em estrutura, tamanho e solubilidade em água (LEHNINGER *et al.*, 1993; ALBERTS *et al.*, 2002).

As proteínas não existem somente como cadeias estendidas, estas assumem diferentes estruturas ao longo da cadeia polimérica e comumente se diferenciam em quatro tipos: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária é a sequência de aminoácidos que forma a cadeia unida por ligações peptídicas. A estrutura secundária é a organização espacial de aminoácidos que se encontram próximos entre si na cadeia peptídica. Algumas regiões podem apresentar uma estrutura  $\alpha$  hélice, onde a conformação da cadeia peptídica é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o grupo amino de um aminoácido e um grupo carboxila situado quatro resíduos à frente, na mesma cadeia polipeptídica (LEHNINGER *et al.*, 1993).

Na estrutura em folha pregueada  $\beta$ , os aminoácidos assumem a configuração de uma folha de papel pregueada, e a estrutura é estabilizada por ligações de hidrogênio entre os grupos amino e carboxila de diferentes cadeias polipeptídicas. A estrutura terciária

é a forma pela qual as regiões helicoidais se dispõem entre si. Já a estrutura quaternária consiste na disposição de subunidades proteicas em proteínas complexas formadas por duas ou mais dessas subunidades (LEHNINGER *et al.*, 1993).

Devido ao fato de um desses aminoácidos ter uma cadeia lateral que lhe confere individualidade química, e às diversas sequências de aminoácidos que podem ser formadas, as proteínas são extremamente versáteis em suas funções (LEHNINGER *et al.*, 1993). Algumas proteínas utilizadas como biomateriais e suas aplicações são mostrados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** Exemplos de proteínas utilizadas em aplicações biomédicas e suas aplicações (SILVIA *et al.*, 2012; MALAFAIA, *et al.*, 2007).

Proteínas	Aplicações
Colágeno	Osso, pele e cartilagem.
Elastina	Tecido das artérias, ligamentos, pele e pulmão.
Fibrina	Osso, pele, cartilagem e vascularização.
Seda	Osso, cartilagem, curativo e fígado.
Gelatina	Osso, cartilagem e pele artificial.

### 2.1.2.1. Proteína do milho ó Zeína

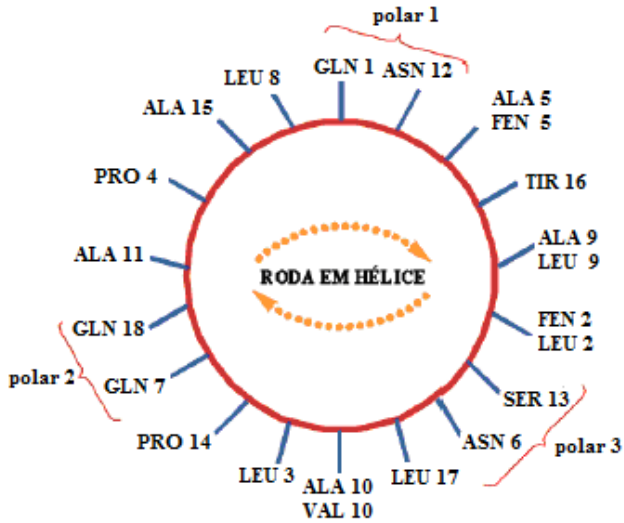
O milho é uma planta cultivada de grande versatilidade, sendo utilizado como uma das principais fontes de alimentos. As proteínas do

milho podem ser divididas, de acordo com sua solubilidade, em quatro frações: globulinas (solúveis em solução salina), albuminas (solúveis em água), prolaminas (insolúveis em água e solúveis em álcool 70%) e glutelinas (insolúveis em água e álcool). Dentre as prolaminas, a principal é a zeína que representa cerca de 80%, tornando-se a principal proteína contida no endosperma do grão (NELSON, 1969; SHUKLA & CHERYAN, 2001).

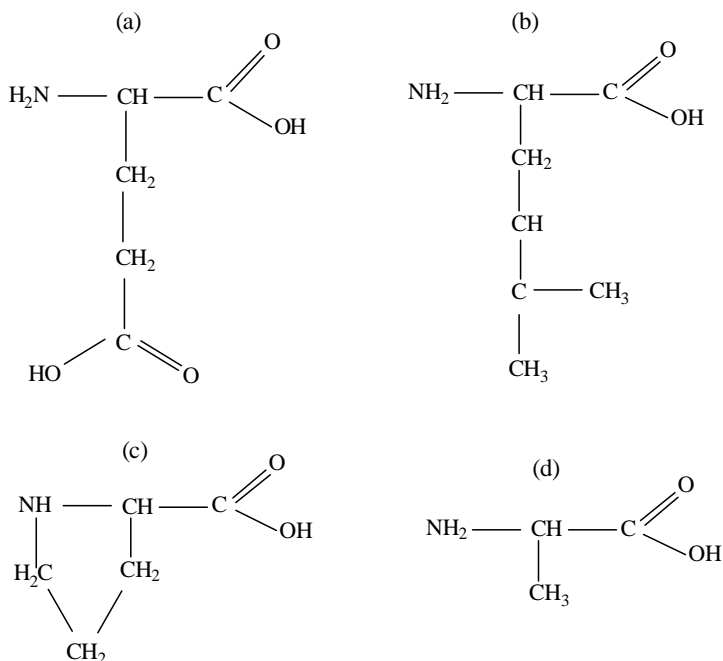
Com base na estrutura primária e solubilidade, as zeínas são classificadas em quatro tipos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , sendo a  $\alpha$ -zeína a mais abundante, perfazendo 60-70% do total (PRASANNA *et al.*, 2001, SHUKLA & CHERYAN, 2001, MOMANY *et al.*, 2006). Argos e colaboradores (ARGOS *et al.*, 1982) propuseram um modelo estrutural para a zeína na forma de roda em hélice para uma seqüência de 18 resíduos de aminoácidos (Figura 2.3).

Em relação à composição aminoacídica da zeína, análises mostram predominância de grupos residuais apolares, como ácido glutâmico, leucinas, prolinas e alaninas (SHUKLA & CHERYAN, 2001) (Figura 2.4). A presença desses grupos confere à zeína um caráter hidrofóbico (FOULK & BUNN, 2001), que, por exemplo, permite a preparação de filmes comestíveis para cobertura de alimentos (CHO *et al.*, 2010) e medicamentos (LIU *et al.*, 2005), protegendo-os da umidade e do oxigênio.

Algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a utilização de filmes de zeína como biomaterial; no entanto, a sua baixa molhabilidade superficial os tornam não receptivos à adesão celular, sendo necessário modificar a sua superfície (DONG *et al.*, 2004; BISWAS *et al.*, 2009). Estratégias para modificar a superfície de biomateriais serão discutidas adiante.



**Figura 2.3** ó Modelo estrutural da zeína roda em hélice para seqüência de 18 repetições de aminoácidos (GLN = Glutamina, ASN = Asparagina, ALA = Alanina, FEN = Fenilalanina, TIR = Tirosina, LEU = Leucina, SER = Serina, VAL = Valina, PRO = Prolina). Modelo adaptado (ARGOS *et al.*, 1982).



**Figura 2.4** Estrutura química dos principais aminoácidos presentes na zeína: ácido glutâmico (a), leucina (b), prolina (c) e alanina (d).

### 2.1.3. Filmes nanoestruturados

A nanotecnologia é um dos grandes temas da atualidade, e constitui um dos principais focos das atividades de pesquisa. Biomateriais nanoestruturados tais como nanopartículas, nanofibras e nanocompósitos têm sido de grande interesse na medicina regenerativa, tendo em vista que esses materiais, muitas vezes, imitam as características físicas da matriz extracelular (ECM) em escala nanométrica (MA, 2008).

Além das nanopartículas, nanofibras e nanocompósitos, os filmes nanoestruturados formados por copolímeros em bloco podem também se revelar precursores interessantes para aplicações biomédicas.

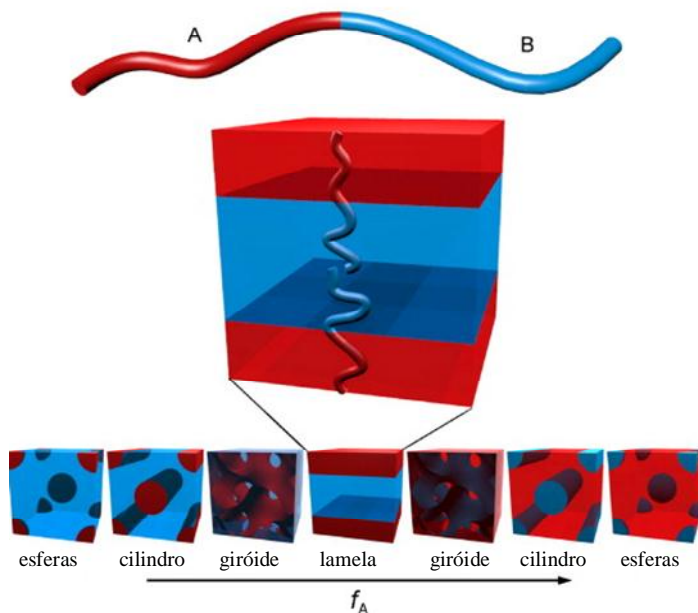
Os copolímeros em bloco são macromoléculas compostas por dois ou mais blocos poliméricos de natureza química diferente, unidos

de forma covalente e que possuem frequentemente a capacidade de se auto-organizar formando nanoestruturas com morfologias características (HAMLEY LAN, 2007; KATAOKA *et al.*, 2001). A grande vantagem dessa classe de polímeros é a possibilidade de se obter, em um único material, propriedades que combinem as características dos homopolímeros individuais. O comportamento de auto-organização das cadeias de copolímeros em bloco sob a forma de nanodomínios é conduzido pela repulsão mútua dos blocos de composição química diferente (HAMLEY, 2003).

Através de um diagrama de fases é possível prever qual a morfologia que o copolímero adotará, quando dissolvido em um solvente adequado para os diferentes blocos, e depositado na forma de filme ultrafino sobre a superfície de um substrato. Para a classe mais simples de copolímeros em bloco, dibloco do tipo AB, onde monômeros de uma cadeia linear do tipo A estão ligados por monômeros de uma cadeia linear do tipo B, quatro morfologias podem ser obtidas: esferas, cilindros, giróide e lamela (Figura 2.5) (ABETZ, 2005; DARLING, 2007).

As diferentes morfologias de um copolímero dibloco do tipo AB são dependentes de fatores importantes como o parâmetro de interação de Flory-Huggins  $\chi$ , que mede a incompatibilidade entre os dois tipos de blocos, do grau de polimerização  $N$  e da fração em volume  $f$  dos blocos. O produto  $\chi N$  determina o grau de segregação dos blocos, se esse valor for inferior a 10, resulta em uma fase desordenada e no caso de ser superior, os dois blocos se separam devido a incompatibilidade entre eles (KIM *et al.*, 2010; DARLING, 2007).

Filmes finos de copolímeros em bloco podem ser facilmente preparados por *spin-coating* a partir de soluções poliméricas, mas o estado de equilíbrio no filme resultante é raramente encontrado logo em seguida da preparação. Os pós-tratamentos (tratamentos térmicos ou exposições a vapores de solventes) são então necessários a fim de se obter a morfologia desejada. Estas técnicas têm como objetivo o aumento da mobilidade das cadeias e de uma modificação de energia superficial (LYAKHOVA *et al.*, 2006; CAVICCHI *et al.*, 2005).

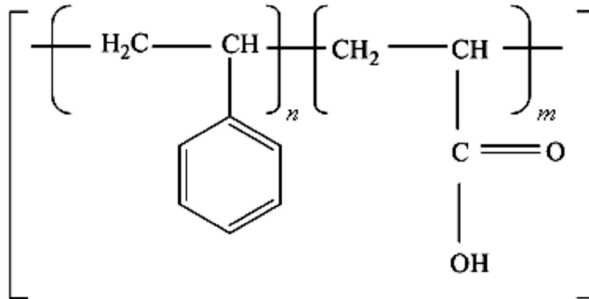


**Figura 2.5** é Representação esquemática das morfologias que podem ser obtidas pelas cadeias dos copolímeros em bloco AB, onde  $f_A$  representa a fração molar de cada componente. Modelo adaptado (DARLING, 2007).

### 2.1.3.1. Poliestireno- *b*- poli(ácido acrílico)

O polímero poliestireno (PS) é um polímero altamente hidrofóbico e suas aplicabilidades foram descritas na seção 2.1.1.1. Por outro lado, o polímero poli(ácido acrílico) (PAA) é um polímero hidrofílico devido à presença do grupo ácido carboxílico na sua estrutura. Assim, as propriedades de molhabilidade do copolímero dibloco poliestireno *-b-*poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA) podem variar de acordo com a massa molar de cada bloco. A estrutura dos monômeros que formam o PS-*b*-PAA está mostrada na Figura 2.6.

O uso do copolímero de PS-*b*-PAA para aplicações biomédicas é bastante restrito; no entanto, assim como para o PS puro, estudos mostram o PAA como um material promissor para adesão celular (LU *et al.*, 2008).



**Figura 2.6** Estrutura dos monômeros de PS-*b*-PAA.

## 2.2. Adesão biomaterial-célula

Normalmente, para que ocorra uma boa interação polímero-célula é necessário que se estabeleça a adesão celular ao substrato. Embora o substrato não necessite obrigatoriamente apresentar características semelhantes às da matriz extracelular para que

a adesão celular ocorra, a similaridade físico-química é desejável quando o objetivo é a promoção da diferenciação celular ou para que um determinado polímero tenha uma interação mais efetiva no sítio de implantação (HUBBELL, 1995; ALBERTS *et al.*, 2002). Dessa forma, atualmente busca-se a produção de polímeros que apresentem características físico-químicas mais próximas possíveis às dos tecidos nos quais serão implantados. Assim, a adesão é de extrema importância para a ciência dos biomateriais. Somente depois de aderidas as células iniciam seu processo de espalhamento, divisão e produção de matriz extracelular nova (DEWEZ *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2001). Espalhamento é um processo complexo que envolve modificações na morfologia celular em consequência de alterações no citoesqueleto, criando assim uma melhor interação com o substrato.

Quando um biomaterial entra em contato com o meio biológico, as primeiras moléculas a alcançarem a sua superfície são as de água (Figura 2.7). Em seguida, uma série de diferentes substâncias encontradas nos fluidos teciduais, tais como íons, glicoconjugados e proteínas, assim como células do tipo condroblastos, fibroblastos e osteoblastos reagem com a superfície (ELLINGSEN, 1998).

Tem-se, portanto, inicialmente, a formação de uma camada glicoprotéica sobre a superfície do biomaterial, no primeiro minuto após

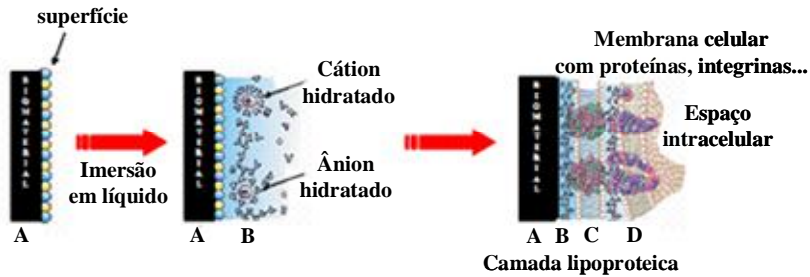


o contato com o sangue. Essa camada é fruto das reações iniciais entre os constituintes teciduais e a superfície do implante, o que governará as reações subseqüentes, determinando o tipo de resposta celular (ELLINGSEN, 1998).

Como regra geral, as células não aderem diretamente às superfícies dos materiais e sim a essa camada que está adsorvida na superfície do implante. Com isso, uma série de interações entre as células promoverá a liberação de citocinas e fatores de crescimento que modularão, por sua vez, a atividade celular. Idealmente, uma superfície deveria sempre suscitar o perfeito controle de adsorção proteica e adesão celular, assim como propiciar condições ideais para o crescimento, diferenciação e síntese proteica (AMARANTE & LIMA, 2001).

O desempenho do implante depende de como as células e as proteínas interagem com o biomaterial. A interação inicial entre as macromoléculas e o substrato influencia na resposta celular, na interface célula-biomaterial e, por consequência, determina a durabilidade e reduz as possíveis falhas dos implantes (FAGHIHI *et al.*, 2006; SCHWARTZ & BOYAN, 1994).

Deste modo, as propriedades da superfície do biomaterial irão proporcionar uma maior ou menor interação com a água e, por conseguinte, influenciar as proteínas e outras moléculas que chegam em seqüência. A interação entre a superfície molhável e as biomoléculas solúveis influenciam diretamente na cinética do processo e na termodinâmica da interface. Por exemplo, ela determina se as proteínas desnaturam ou não, como elas se orientam e se depositam. Dependendo das características da superfície do biomaterial, uma maior ou menor interação com a água vai ocorrer. Se essa interação for positiva, proteínas ativas irão se ligar à superfície molhável do biomaterial e enviarão sinais para determinados tipos celulares para a formação de um tecido (KASEMO, 2002).



**Figura 2.7** Representação da superfície do implante e sua interação com as moléculas do fluido tecidual: biomaterial (a), moléculas de água (b), camada glicoprotéica (c), célula (d). Modelo adaptado (KASEMO, 2002).

### 2.3. Modificação de superfície dos biomateriais

A maioria dos polímeros apresenta superfícies quimicamente inertes e com baixa energia livre superficial, o que os torna não receptivos à aderência de outras substâncias. Devido à grande dificuldade em se obter materiais que permitam principalmente a rápida adesão, proliferação e diferenciação celular, são numerosos os estudos que procuram adequar as propriedades das superfícies de compostos por meio de tratamentos especiais. Consequentemente, a modificação de superfícies está se tornando uma estratégia amplamente utilizada para a obtenção de dispositivos multifuncionais com propriedades biomecânicas adequadas e biocompatibilidade necessárias aos substitutivos biomédicos. Há de se ressaltar que a busca por novos materiais e estratégias para torná-los biocompatíveis, obviamente, demanda despesas vultosas e um longo tempo para seu desenvolvimento (SIOSHANSI, 1989).

#### 2.3.1. Modificação biológica é Adsorção de proteína

Tal método visa à incorporação de biomoléculas, geralmente macromoléculas, na superfície do biomaterial, a fim de promover o reconhecimento da superfície pelas células, proporcionando maior adesão, com posterior proliferação. As macromoléculas mais utilizadas são da classe das proteínas (ORÉFICE *et al.*, 2006).

A adsorção de proteínas de um fluido biológico em uma superfície sólida é um dos primeiros eventos que ocorre quando um

biomaterial é colocado em contato com um sistema biológico. Como citado anteriormente, após a camada de água tocar a superfície do biomaterial, proteínas já são observadas nas superfícies do mesmo. Portanto, o desempenho desses materiais dependerá da camada de proteína adsorvida (PÉREZ-LUNA *et al.*, 1994).

Alguns estudos relatam a imobilização de proteínas à superfície de biomateriais a fim de torná-los mais propício a adesão celular. Tal interação pode ser de natureza eletrostática ou covalente, sendo a primeira mais estudada por ser um processo rápido, simples e que tem fornecido bons resultados (DØSA *et al.*, 2010).

### 2.3.1.1. Albumina de soro bovino

Albumina de soro bovino (BSA) foi empregada como proteína modelo em sistemas biomiméticos. É a proteína mais abundante no sangue bovino, sendo sintetizada no fígado e é responsável pelo controle da pressão osmótica e pelo transporte de ácidos graxos livres no sangue. Possui uma estrutura similar à da albumina do soro humano (HSA), apresentando uma porcentagem de sequências idênticas de aminoácidos de 76% (ITRI & AMARAL, 1993).

A estrutura primária da BSA é constituída de uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e três domínios e cerca de 70% da estrutura secundária é formada por  $\alpha$ -hélice. Esta estrutura parece apresentar as cadeias dobradas sobre si para formar camadas que podem ser desenroladas pela redução do pH (TATTINI JR *et al.*, 2006).

Alguns estudos relatam que a adsorção da BSA na superfície de um biomaterial polimérico melhora significativamente a adesão celular, uma vez que essa proteína está presente nos fatores de crescimento das células (DØSA *et al.*, 2010, HINDIÉ *et al.*, 2011).

Tendo em vista as possíveis alterações de conformação impostas à proteína quando adsorvida sobre superfícies hidrofóbicas ou muito hidrofílicas e visando à diminuição deste impacto sobre o processo de adsorção, o ideal é que as superfícies apresentem molhabilidade moderada, a fim de preservar a conformação da proteína, mantendo a sua bioatividade e permitindo a adesão celular (HORBETT *et al.*, 1985; MA *et al.*, 2007).

A molhabilidade do material é determinada por medidas de ângulo de contato entre uma gota líquida e a superfície horizontal que se deseja caracterizar. Quando esse ângulo de contato estiver acima de 90°, considera-se que o material é hidrofóbico e o oposto é considerado para

ângulos menores que  $90^\circ$  (KWOK *et al.*, 1998, ADAMSON, 1990). O ângulo de contato adequado para adesão de células na superfície é, em geral, em torno de  $55^\circ$ -  $60^\circ$  (ARIMA & IWATA, 2007).

### 2.3.2. Modificação por Plasma

Tem-se demonstrado que modificações químicas na superfície dos materiais têm um importante papel na adesão, proliferação e diferenciação celular (DALBY *et al.*, 2002). As propriedades da superfície podem ser alteradas de modo a se tornarem mais adequadas para aplicações biomédicas. As técnicas mais comumente utilizadas incluem desgaste químico, tratamento por plasma e radiação gama. Entre estas técnicas, o tratamento por plasma é particularmente versátil porque a modificação é restrita à superfície, sem comprometer as propriedades do material como um todo. O tratamento por plasma pode ser usado para modificar a superfície do polímero de maneira não específica por mudanças na molhabilidade ou, mais especificamente, introduzindo-se uma variedade de grupos funcionais dependendo do tipo de gás utilizado (KEEN *et al.*, 2006).

O plasma é considerado o quarto estado da matéria e para efeito de estudo é classificado em plasmas de alta temperatura e plasmas de baixa temperatura. O plasma de alta temperatura é produzido em processos de fusão nuclear acima de 50 mil graus. Os plasmas de baixa temperatura incluem plasmas térmicos e não térmicos ou plasma frio. Os plasmas térmicos estão em equilíbrio termodinâmico, onde a temperatura dos elétrons é igual à temperatura das partículas pesadas, estando estas temperaturas associadas à energia cinética das partículas em temperaturas entre 2000 a 50000 graus. O plasma frio, foco deste trabalho, é caracterizado pelo não equilíbrio termodinâmico em que a temperatura das partículas pesadas está próximo da temperatura ambiente, estes plasmas são chamados de frios ou fora do equilíbrio. O plasma frio pode ser definido como um gás consistindo de elétrons, átomos e moléculas altamente excitadas, íons, radicais, fótons e partículas neutras, no qual os elétrons têm muito mais energia do que as partículas gasosas neutras (FRIDMAN, 2008).

Os plasmas não térmicos, com temperatura inferior a  $100^\circ\text{C}$ , são mais adequados no tratamento de polímeros e materiais com baixo ponto de fusão (FRIDMAN, 2008).

Existe uma relação entre a hidrofiliabilidade de materiais poliméricos e a adesão celular. Dentro de certos parâmetros, substratos mais hidrofílicos tendem a suportar uma melhor interação celular

(DEWEZ *et al.*, 1998). Diversos autores têm apresentado e discutido resultados do efeito do plasma sobre substratos poliméricos. Contudo, quase a totalidade desses tratamentos é focada no aumento da molhabilidade. Zhu e colaboradores (ZHU *et al.*, 2005) modificaram membranas de quitosana com plasma para melhorar a hidrofiliabilidade da superfície e promover a proliferação de células fibroblásticas. Os resultados mostraram que o tratamento aumentou a proliferação das células fibroblásticas derivadas da pele humana. Espósito e colaboradores (ESPOSITO *et al.*, 2007), estudaram as interações entre células Vero e suportes de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLA-co-PGA) previamente tratados por plasma de oxigênio, com o objetivo de aumentar a hidrofiliabilidade da superfície desses materiais. O tratamento por plasma de oxigênio promoveu um aumento na hidrofiliabilidade das amostras estudadas, observando-se, nas membranas tratadas, uma queda nos ângulos de contato e uma melhor adesão celular.

Dependendo da aplicação desejada, tratamentos por plasma podem tornar a superfície mais hidrofóbica. Padilha e colaboradores (PADILHA *et al.*, 2010) estudaram a modificação de filmes finos de PMMA por plasma de gás fluorado. Os resultados mostraram um aumento na hidrofobicidade dos filmes. Esse aumento pode ser explicado pela presença de átomos de flúor na superfície, diminuindo a energia livre de superfície e, conseqüentemente, aumentando os valores de ângulo de contato.

O processo de modificação da superfície por plasma é econômico e efetivo para os materiais e vem ganhando aplicações na área biomédica, tornando-se cada vez mais comum. A grande vantagem da técnica de plasma é a capacidade de modificação da superfície, tornando-a mais biocompatível ou mimetizando melhor o tecido sem alterar suas propriedades e, com isso, oferecendo um bom controle de qualidade, sendo confiável e reproduzível, o que seria difícil por técnicas convencionais (CHU *et al.*, 2002; FRIDMAN, 2008; MANDL & RAUSCHENBACH, 2000). Além disso, o tratamento por plasma torna a superfície estéril através da destruição de microorganismos, eliminando bactérias e vírus, podendo ser utilizado para dispositivos biomédicos, instrumentos cirúrgicos, engenharia de tecidos e aplicações clínicas (CHU *et al.*, 2002).

### 2.3.2.1. Plasma frio do tipo corona com reator de descarga de barreira dielétrica

O plasma frio pode ser gerado e mantido por descargas elétricas. A descarga elétrica de um gás ocorre quando os elétrons energéticos ionizam o gás através de impactos inelásticos, desta forma temos a ruptura elétrica do gás, denominada *breakdown* (ROSSNAGEL *et al.*, 1989).

As descargas elétricas são meios diretos de produzir plasma frio pela aplicação de alta tensão em um espaço gasoso, induzindo a dissociação do gás. Essa dissociação gera elétrons que podem ser acelerados por um campo elétrico formando o plasma frio. As descargas elétricas podem ser concebidas de diversos modos, dependendo do tipo de tensão aplicada e especificação do reator. No reator de plasma frio, os elétrons energéticos colidem com as moléculas do gás, resultando em excitação, ionização, multiplicação dos elétrons e formação de átomos e compostos metaestáveis (FRIDMAN, 2008).

A utilização de descargas elétricas em gases moleculares com vistas às diversas aplicações tem causado um grande interesse nos últimos anos. A sofisticação dos diversos ramos da tecnologia, notadamente na microeletrônica e no tratamento de superfícies, tem motivado um grande número de trabalhos, tanto aplicados quanto fundamentais. Além disso, estas descargas têm demonstrado um grande potencial em aplicações industriais de larga escala, pois realizadas à pressão atmosférica apresentam baixos custos de operação e manutenção, devido à ausência de sistemas de vácuo (WOLKENHAUER *et al.*, 2007).

A descarga corona com reator do tipo descarga de barreira dielétrica (DBD) é uma descarga que ocorre no espaço entre dois eletrodos metálicos quando este é preenchido com gás, em pressão atmosférica, e pelo menos uma barreira dielétrica é inserida entre os eletrodos. A presença do dielétrico entre os eletrodos impede a formação de arcos e permite operar em altas tensões alternadas ou pulsadas. Essa descarga constitui um método seguro e econômico de gerar plasma frio à pressão atmosférica, pois combina o grande volume de plasma da descarga luminescente com a alta pressão de operação da descarga corona. A principal característica da DBD é a transferência de energia na forma de micro-descargas entre seus eletrodos, distribuídas ao longo do volume inteiro do sistema. Este aspecto é extremamente atraente na utilização dessa configuração no tratamento de superfícies. No caso da aplicação de descarga corona para tratamento de superfícies, se um

material (por exemplo, um polímero) for colocado sobre a placa, as espécies ativas podem agir sobre eles e causar modificações na sua superfície e, assim, melhorar as propriedades de adesão (FRIDMAN, 2008; FRIDMAN *et al.*, 2005; FRANCK *et al.*, 2003; KOGELSCHATZ, 2004).

Após o tratamento da superfície pela corona, o polímero tem a tendência de retornar ao seu ângulo de contato original antes do tratamento. Esse comportamento ocorre à temperatura ambiente e cada polímero tem sua própria velocidade de retorno. A temperatura acelera grandemente esse processo, podendo em uma semana a 100 °C quase retornar ao valor inicial, destruindo o efeito do tratamento corona. Em temperatura ambiente, esse processo pode consumir mais de seis meses (STROBEL *et al.*, 1992).

Liu e Meenan (LIU & MEENAN, 2008) estudaram a influência do tratamento por plasma de DBD na adsorção de albumina de soro bovino na superfície de filmes finos de PMMA. Os autores observaram que o processo de DBD influencia significativamente a molhabilidade da superfície do filme e esse fato pode ser atribuído à mudança na composição química da superfície e na topografia. Lee e colaboradores (LEE *et al.*, 2009) utilizaram tratamento de plasma por DBD sob pressão atmosférica para modificar a superfície de filmes de poli(caprolactona) com o objetivo de melhorar a adesão e proliferação das células epiteliais da próstata humana. Os resultados obtidos mostraram uma melhora significativa na proliferação celular quando comparado aos filmes não modificados, e esta diferença pode estar relacionada com a oxidação da superfície, através do aparecimento de grupos mais hidrofílicos. Além disso, os autores concluem que o aumento da hidrofiliabilidade na superfície dos filmes está diretamente relacionado com o aumento da potência aplicada, proporcionando uma melhora nas propriedades de adesão. DøSA e colaboradores (DøSA *et al.*, 2010) modificaram a superfície de PS e PMMA fazendo uso do processamento de plasma à pressão atmosférica através do método DBD. Os autores observaram mudanças tanto na superfície química quanto na topografia, e caracterizaram essas mudanças através de medidas de ângulo de contato em água, espectroscopia fotoeletrônica de raios-X e microscopia de força atômica. Através desse estudo foi possível concluir que o processamento de plasma por DBD é capaz de modificar a superfície de PS e PMMA e proporcionar uma mudança na superfície capaz de causar uma resposta maior frente à albumina e células epiteliais humanas, sendo classificadas como superfícies aptas para uso como biomaterial na engenharia de tecidos.

Independente da técnica utilizada para modificar a superfície de um material, as características, como topografia, composição química e energia de superfície são essenciais à adesão de células nos biomateriais (YANG *et al.*, 2002). Além disso, a adesão e a proliferação, que correspondem à primeira fase de interação célula/material, influenciarão a capacidade das células se diferenciarem (ANSELME, 2000; DI SILVIO *et al.*, 2002). Segundo Vogler (VOGLER & BUSSIAN, 1987), a taxa de adesão celular inicial é crítica para este processo e é o maior determinante da citocompatibilidade *in vitro*, sugerindo ser uma possível determinante da biocompatibilidade *in vivo*.

A crescente utilização de biomateriais em medicina conduziu a necessidade de desenvolvimento de testes reprodutíveis e efetivos de biomateriais. As condições éticas que envolvem as pesquisas médicas têm reforçado o estudo das relações entre os experimentos *in vivo* e *in vitro*. As rígidas regras desenvolvidas e o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais em laboratório foram decisivos para o desenvolvimento de estudos de métodos viáveis de análise *in vitro* (ROGERO *et al.*, 2003).

#### **2.4. Citotoxicidade *in vitro***

A toxicidade consiste na capacidade de uma substância produzir um efeito nocivo quando interage com o organismo vivo. No caso da citotoxicidade, significa causar efeito tóxico a nível celular. Entre os efeitos tóxicos, pode ser citada a morte celular, alterações na permeabilidade da membrana e a inibição enzimática (MELO *et al.*, 2000).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (Internacional Standard Organization) (ISO 10993-5, 1992), o teste *in vitro* é usado como uma pré-seleção para detectar se o material em questão provoca morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares. Um resultado negativo de citotoxicidade indica que o material está isento de componentes tóxicos ou que os tem em quantidades insuficientes para causar efeitos negativos às células. Para ser aprovado num teste de citotoxicidade *in vitro*, o material não deve causar a morte das células nem afetar suas funções celulares. Com o uso de técnicas de cultura celular, os testes podem detectar se ocorre a lise das células, a inibição do crescimento celular que possa ser causado pelo material e/ou extrato oriundo do material (MALMONGE *et al.*, 1999).

É importante salientar que apesar dos testes *in vitro* serem dinâmicos, os mesmos não devem substituir os testes em humanos. No



entanto, estes testes fornecem informações valiosas a respeito da morfologia e proliferação celular. Além disso, apresentam vantagens quando comparados com testes realizados em humanos, tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, baixo custo, rápida realização e maior reprodutibilidade, além de não envolver questões éticas (MALMONGE *et al.*, 1999).

A avaliação de citotoxicidade pode ser feita através de ensaios qualitativos ou quantitativos. Os ensaios qualitativos consistem na avaliação da morfologia através de descrição ou atribuição de escores. Os quantitativos caracterizam-se pela quantificação do número e atividade celular após a exposição ao agente teste (ISO 10993-5, 1992).

A viabilidade celular pode ser avaliada através de vários métodos; porém, é aconselhável que a pesquisa utilize um processo que envolva menor tempo e menor variação na análise das amostras.

De acordo com Griggs e colaboradores (GRIGGS *et al.*, 2003), os ensaios de citotoxicidade também podem ser utilizados na fase de desenvolvimento de um material, quando se deseja estabelecer a melhor proporção entre os componentes de um biomaterial ou quando se modifica um material já existente.

#### **2.4.1. Células L-929**

A linhagem de fibroblastos L929 é citada como referência para testes de citotoxicidade em biopolímeros (SERRANO *et al.*, 2004). As células L-929 constituem uma linhagem celular de fibroblastos obtida de tecido subcutâneo de camundongos. Os fibroblastos são as principais células que constituem o tecido conjuntivo e são os mais relevantes produtores de colágenos neste tecido. Estes possuem uma morfologia fusiforme com algumas expansões citoplasmáticas que se estendem para fora da célula. Por se originarem de células mesenquimatosas indiferenciadas, possuem capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares. Devido à sua relativa resistência e facilidade de manipulação, estas células tendem a um fácil crescimento em meios de cultura. Consequentemente, têm sido consideradas como modelos para diversos testes de avaliação de substâncias para uso farmacológico e em biomateriais (KETTERING & TORABINEJAB, 1984).

Promover a adesão dos fibroblastos ao biomaterial pode ajudar na integração do tecido conectivo mole ao implante, adicionando vascularização à superfície do implante e diminuindo a chance de encapsulamento fibroso e infecção bacteriana. Para isso, tornam-se necessários estudos de comportamento celular em biomateriais que

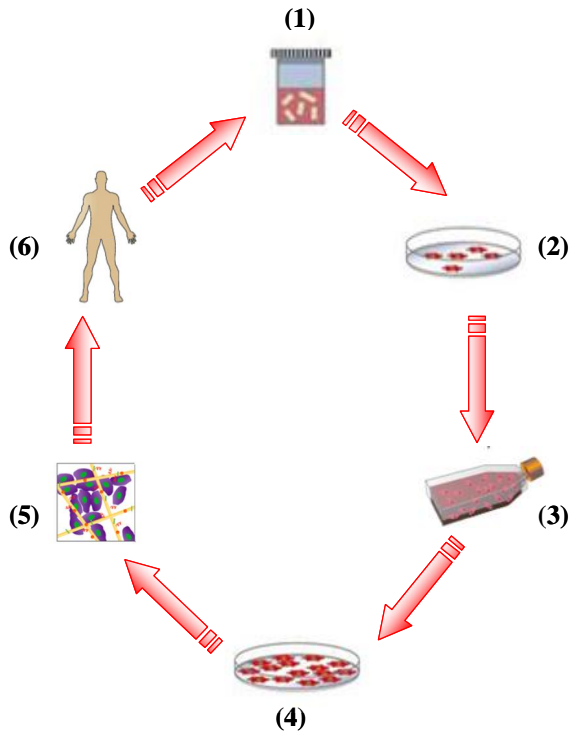
podem colaborar para o desenvolvimento de implantes produzidos através de técnicas de engenharia de tecidos mais efetivos (VERRIER *et al.*, 1996).

## 2.5. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos despontou nas últimas décadas como um revolucionário campo de pesquisa. Trata-se de um novo campo multidisciplinar que combina várias especialidades da ciência, nomeadamente, a engenharia, medicina, física e química. É uma ciência que se destina a produzir dispositivos funcionais viáveis para a restauração, regeneração ou melhoramento da função dos tecidos ou órgãos humanos danificados e/ou perdidos (BARBANTI *et al.*, 2005).

Existem dois procedimentos que visam suprir a falta dos tecidos e órgãos danificados ou comprometidos: os transplantes e os implantes. O transplante de tecido obtido a partir de doadores humanos ou a partir de outras espécies são tratamentos opcionais; mas cada processo tem problemas inerentes de possível transmissão de patogênese provenientes de doadores e riscos elevados de infecção. Além disso, após a realização do transplante, torna-se necessária a utilização de drogas imunossupressoras com o intuito de evitar a rejeição dos órgãos. Por outro lado, dispositivos desenvolvidos para servirem como implantes têm surgido como uma potencial terapia alternativa para o tratamento de doentes utilizando técnicas minimamente invasivas (HENCH, 1998).

A grande vantagem na engenharia de tecidos é a superação dos limites de tratamentos convencionais baseados em transplantes de órgãos. Em princípio, podem-se produzir substitutos artificiais imunologicamente tolerantes de órgãos e tecidos danificados que podem crescer no paciente. Isso conduzirá a uma solução permanente, sem a necessidade de terapias suplementares em longo prazo. Além disso, outra vantagem da engenharia tecidual sobre o transplante de órgãos está no fato de populações de células isoladas expandirem-se *in vitro* com a utilização de técnicas de cultura celular, necessitando somente de um pequeno número de células doadoras para preparar o implante (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A Figura 2.8 mostra um modelo ilustrativo para a engenharia de tecidos. As células são removidas de um doador (pode ou não ser o próprio paciente), dissociadas e expandidas em laboratório, fixadas, aderidas e multiplicadas no suporte (biomaterial) e implantadas no paciente.



**Figura 2.8** é Modelo ilustrativo da engenharia de tecido. Cultura de células (1), expansão de células (2), proliferação de células (3), células a serem implantadas no biomaterial (4), biomaterial com as células (5), implante *in vivo* (6). Modelo adaptado (BARBANTI *et al.*, 2005).

O uso de células isoladas de pacientes também permite a remoção daquelas indesejáveis, que podem ser alvo de resposta imune, influenciando no processo de rejeição, além das cirurgias entre doadores e receptores e seus riscos inerentes poderem ser evitados e os custos dos procedimentos significativamente reduzidos (FREED *et al.*, 1993).



**CAPÍTULO 3**  
**OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**



### 3.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo inicial preparar e caracterizar filmes por *casting* e modificar a superfície dos mesmos através de tratamento por plasma frio do tipo corona com descarga de barreira dielétrica, a fim de tornar a superfície dos mesmos mais hidrofílica, utilizando para tal os polímeros PS e PMMA com o propósito final de aderir e proliferar células de fibroblastos L-929.

No estudo utilizando a zeína como polímero natural e o copolímero PS-*b*-PAA objetivou-se preparar e caracterizar filmes finos por *spin coating*, modificar a superfície dos mesmos através do mesmo sistema de plasma utilizado no sistema inicial a fim de deixá-los mais propícios à adesão das células L-929. Além disso, objetivou-se adsorver a albumina de soro bovino na superfície do filme de zeína e compará-lo frente às mesmas células.

### 3.2. Objetivos Específicos

Como objetivos específicos da preparação dos filmes por *casting* utilizando polímeros sintéticos citam-se:

- Preparar filmes de PS, PMMA e na composição 1:1 (m/m);
- Modificar a superfície dos filmes em estudo através de plasma frio em reator do tipo descarga em barreira dielétrica a fim de torná-los mais hidrofílicos;
- Estudar a influência do tempo de tratamento e vazão de gás no sistema de plasma e determinar as medidas elétricas, tais como, corrente, potência e tensão aplicadas durante a modificação da superfície;
- Avaliar a molhabilidade e estimar a energia de superfície dos filmes através de medidas de ângulo de contato pelo método da gota pendente;
- Avaliar o comportamento morfológico e topográfico dos filmes utilizando microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica;
- Analisar os grupos químicos presentes na superfície dos filmes através de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X;
- Avaliar diferentes técnicas de esterilização e determinar a mais eficaz para o sistema;

- Avaliar a citotoxicidade dos filmes frente à linhagem de célula de fibroblastos L-929 através de laranja de acridina (método qualitativo) e citometria em fluxo (método quantitativo) e investigar a adesão e proliferação celular *in vitro* dos filmes utilizando células L-929;

- Avaliar o comportamento morfológico das células fibroblásticas utilizando microscopia eletrônica de varredura.

Para o estudo de filmes finos por *spin coating* utilizando polímero natural, os objetivos específicos incluem:

- Preparar filmes finos a partir de um polímero de origem natural, a zeína;

- Modificar a superfície dos filmes em estudo através do mesmo sistema de plasma frio citado anteriormente;

- Estudar a influência da adsorção da proteína BSA na superfície do filme antes e após o tratamento por plasma;

- Analisar a influência do tempo de tratamento e tensão elétrica primária aplicada no sistema de plasma;

- Avaliar a citotoxicidade dos filmes frente à linhagem de célula de fibroblastos L-929 utilizando laranja de acridina;

- Avaliar a molhabilidade e estimar a energia de superfície dos filmes através de medidas de ângulo de contato pelo método da gota pendente;

- Avaliar a topografia dos filmes utilizando microscopia de força atômica.

Os objetivos específicos para a preparação do filme por *spin coating* a partir de filme nanoestruturado têm-se:

- Preparar filmes finos a partir do copolímero em bloco PS-*b*-PAA;

- Modificar a superfície dos filmes em estudo através do mesmo sistema de plasma frio citado anteriormente;

- Avaliar a topografia dos filmes utilizando microscopia de força atômica;

- Avaliar a citotoxicidade dos filmes frente à linhagem de célula de fibroblastos L-929 utilizando laranja de acridina.



**CAPÍTULO 4**  
**MATERIAIS E MÉTODOS**



## **4.1. SISTEMA 1 ó FILMES PREPARADOS POR CASTING A PARTIR DE PS E PMMA**

### ***4.1.1 Materiais poliméricos***

Os polímeros de poliestireno ó PS e poli(metacrilato de metila) ó PMMA, cujas massas molares ponderais médias ( $M_w$ ) são 300.500 g mol<sup>-1</sup> e 139.595 g mol<sup>-1</sup>, respectivamente, foram adquiridos diretamente da Sigma - Aldrich (Saint. Louis, EUA). Os polímeros foram utilizados sem nenhuma purificação adicional.

### ***4.1.2. Solvente para preparo dos filmes***

Um estudo preliminar foi realizado com quatro tipos de solução para preparação de filmes pelo método de evaporação do solvente (*casting*). Acetona, tetrahidrofurano (THF), acetato de etila e clorofórmio foram avaliados. O clorofórmio foi o solvente que solubilizou mais rapidamente os polímeros e possibilitou a obtenção de filmes mais homogêneos.

### ***4.1.3. Preparação dos filmes***

Para a preparação dos filmes de PS, PMMA e PS/PMMA 1:1 (m/m) os polímeros foram dissolvidas em clorofórmio, um solvente comum para os dois polímeros, de modo a preparar filmes na concentração 2% (m/v). Para a completa solubilização, as soluções poliméricas foram acondicionadas em frascos fechados e mantidos sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. Após a solubilização, as soluções foram vertidas em placas de PTFE e mantidas em uma capela de exaustão por aproximadamente 24 h até completa evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente, os filmes foram acondicionados em dessecadores para análises posteriores.

### ***4.1.4. Modificação da superfície por plasma frio com reator do tipo descarga de barreira dielétrica (DBD)***

#### ***4.1.4.1. Planejamento experimental***

Para um melhor desenvolvimento do experimento foi realizado um planejamento experimental 2<sup>2</sup> com um ponto central. Este tipo de

planejamento foi utilizado para estimar as condições ótimas de utilização do reator DBD em relação à diminuição do ângulo de contato ( $\theta$ ) da superfície dos filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA. Para tanto, variou-se a vazão de gás ( $Q$ ) de  $O_2$  e o tempo de tratamento ( $t$ ). As duas variáveis foram confinadas em dois níveis na faixa de 0,1 (nível mais baixo) a  $2,0 \text{ L min}^{-1}$  (nível mais alto) para  $Q$  e a partir de 1,0 (nível mais baixo) até 60 min (nível mais alto) para  $t$ . Um ponto central ( $1,05 \text{ L min}^{-1} O_2$ , 30,5 min), com três repetições também foi incluído para avaliação estatística (em um nível de confiança de 95%), resultando em cinco experimentos para o planejamento experimental realizado. As condições utilizadas no planejamento são apresentadas na Tabela 4.1. A tensão elétrica primária utilizada durante todo planejamento foi mantida constante (180 V).

O *software* STATISTICA 6.0 foi utilizado para a avaliação dos parâmetros estatísticos e das condições ótimas para a diminuição de  $\theta$ .

**Tabela 4.1** Matriz experimental para o planejamento experimental  $2^2$  usado no estudo do efeito da vazão de gás e de tempo de tratamento por plasma frio sobre o ângulo de contato dos filmes tratados.

Experimentos	Vazão de $O_2$ ( $\text{L min}^{-1}$ )	Tempo de tratamento (min)
1	0,100	1,00
2	2,00	1,00
3	0,100	60,0
4	2,00	60,0
5	1,05	30,5

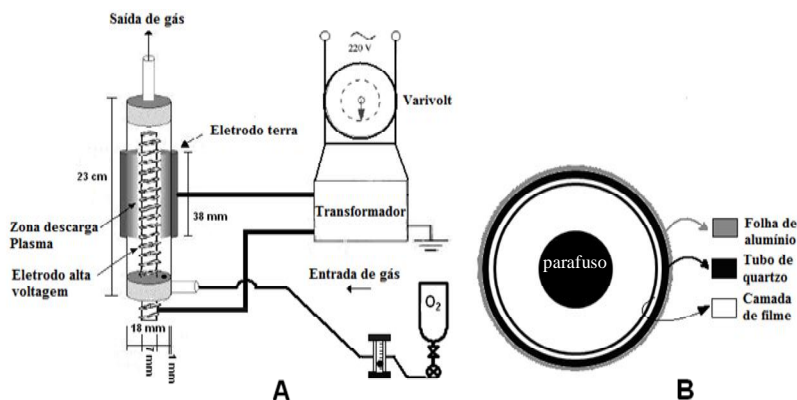
#### 4.1.4.2. Reator de plasma frio DBD cilíndrico

O modelo experimental utilizado neste trabalho é mostrado na Figura 4.1 e foi montado no Laboratório de Físico-Química Orgânica no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina

(UFSC). Um transformador AC (220 V de entrada/17 kV de saída) de alta tensão (60 Hz; Neonena, São Paulo) foi usado para gerar os canais de plasma entre os eletrodos. O reator DBD com eletrodo do tipo parafuso foi construído utilizando um tubo cilíndrico de quartzo com tampas de PTFE. Este tipo de reator foi equipado com uma barreira de isolamento (quartzo) entre os eletrodos para evitar as faíscas. O eletrodo de alta tensão de aço inoxidável foi posicionado concentricamente no reator. Uma folha de alumínio foi utilizada como eletrodo terra e foi posicionada na região externa do tubo de quartzo. O ôgapô de descarga, zona de formação de plasma frio (Figura 4.1 A) foi fixada em 9 mm e O<sub>2</sub> (White Martins, São Paulo) foi utilizado como gás de alimentação em todos os experimentos.

#### 4.1.4.3. Procedimento de modificação da amostra

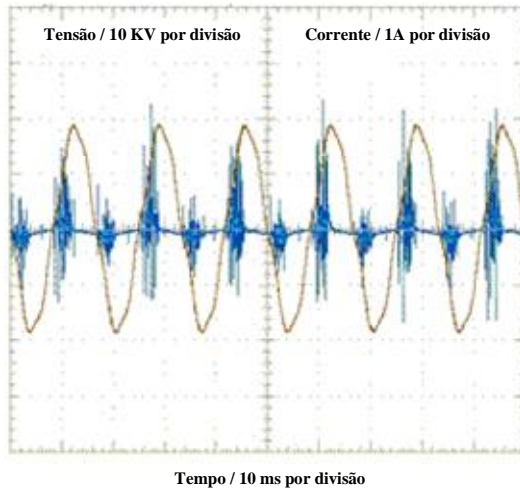
A fim de modificar a superfícies dos polímeros, os filmes foram embrulhados para cobrir a superfície interna do tubo de quartzo na zona de descarga de plasma (Figura 4.1 B). Além disso, o gás O<sub>2</sub> foi purgado por alguns minutos (2,0 L min<sup>-1</sup>) no reator DBD através da entrada de gás posicionado na tampa inferior do reator para eliminar possíveis contaminantes presentes no reator. Então, o reator DBD foi ligado durante o tempo de tratamento (60 min) e a descarga de plasma deu início às reações químicas em fase gasosa que promoveram a modificação da superfície dos filmes poliméricos.



**Figura 4.1** Configuração experimental do sistema DBD utilizado neste trabalho (A) e vista superior do reator DBD com o filme do polímero no interior (B).

#### 4.1.4.4. Medidas elétricas do reator DBD

As medições de corrente e tensão foram executadas usando uma sonda de alta tensão (Tektronix P6015A) e uma sonda de corrente (Agilent N2781A) e os sinais foram monitorados através de um osciloscópio (Tektronix TDS5034B). A potência elétrica aplicada no reator DBD em todos os experimentos foi  $P = 17,41$  W (valores em RMS). A Figura 4.2 mostra as formas de onda de tensão e corrente alternada (AC) típicas do reator DBD utilizado.



**Figura 4.2** Formas de onda de tensão e corrente do reator DBD.

#### 4.1.4.5. Envelhecimento dos filmes por casting

Uma maneira de verificar a estabilidade das modificações provocadas na superfície dos filmes tratados por plasma consiste na avaliação do envelhecimento da superfície. Para isso, os filmes poliméricos tratados foram armazenados por 10 dias (240 h) em dessecador à temperatura ambiente para verificar a estabilidade do tratamento realizado.

## **4.2. SISTEMA 2 6 FILMES FINOS PREPARADOS POR *SPIN COATING* A PARTIR DE ZEÍNA**

### **4.2.1. Materiais poliméricos**

Proteína do milho (zeína) com massa molar ponderal média ( $M_w$ ) de 14.000-24.000 g mol<sup>-1</sup> e a albumina do soro bovino 98%, utilizada como fator de crescimento celular, foram adquiridas da Sigma Aldrich e utilizadas sem tratamento prévio.

### **4.2.2. Preparação e limpeza do substrato**

Placas de silício (Si/SiO<sub>2</sub>) cortadas nas dimensões 3 x 3 cm<sup>2</sup>, foram usadas como substrato para a deposição dos filmes de zeína. Antes da obtenção dos filmes, as placas foram descontaminadas. Primeiramente, os substratos foram limpos cuidadosamente com algodão molhado em etanol e em seguida os substratos foram imersos em etanol e submetidos a ultrassom durante 60 min. Imediatamente antes da deposição para preparação dos filmes, uma alíquota de acetona foi colocada na superfície de cada uma das placas, que foram submetidas a 2000 rpm durante 30 s em um *spin coater* (modelo Laurell WS-400BZ-6NPP-Lite). Esta etapa teve como objetivo a retirada de possíveis resíduos orgânicos.

### **4.2.3. Solvente para preparo dos filmes**

Estudos na literatura relatam que a solubilidade da zeína é favorecida em solvente binário etanol/água, porém mostram várias composições em que a solubilização é possível, indo de 75/25 até 90/10 (DONG *et al.*, 2004; SHUKLA & CHERYAN, 2001). Para decidir qual combinação seria aqui adotada, um estudo preliminar foi realizado utilizando as seguintes concentrações de etanol/água: 75/25, 80/20, 85/15, 87/13 e 90/10. Após este estudo, a concentração etanol/água que melhor solubilizou a zeína foi a de 85/15; portanto, esta concentração foi adotada na preparação dos filmes.

### **4.2.4. Preparação dos filmes**

Para a preparação do filmes finos, a zeína, na concentração de 2% (m/v), foi solubilizada em solvente binário (etanol/água, 85/15) por aproximadamente 6 h à temperatura ambiente. Após a solubilização a

solução foi filtrada em membrana de PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os filmes finos foram obtidos utilizando o *spin coater* citado anteriormente através da deposição da solução polimérica em substrato de silício. Para cada filme, 150  $\mu\text{L}$  da solução polimérica de zeína foram depositados na superfície do substrato, sendo que o *spin coater* foi operado a 2000 rpm durante 30 s.

#### **4.2.5. Modificação da superfície por plasma frio com reator de descarga de barreira dielétrica (DBD)**

##### *4.2.5.1. Planejamento experimental*

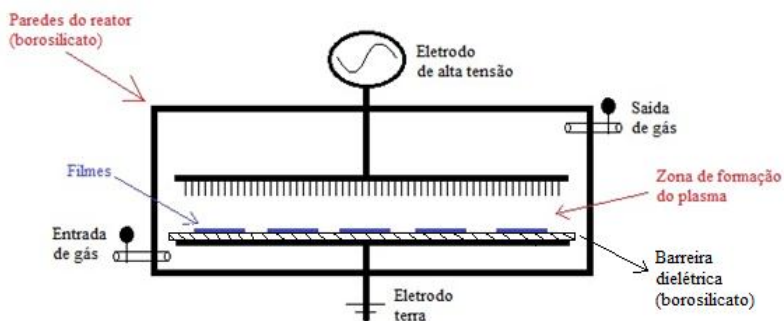
Foi realizado um planejamento experimental composto central  $3^2$  com 2 fatores e 3 níveis cada um, realizado em duplicata com 6 replicatas no ponto central, totalizando 22 experimentos. Este tipo de planejamento foi utilizado para estimar as condições ótimas de utilização do reator DBD em relação à adesão de células L-929 na superfície dos filmes de zeína. Para tanto, variou-se a tensão elétrica primária ( $v$ ) aplicada ao reator e o tempo de tratamento ( $t$ ) por plasma frio. Os dois fatores foram confinados em três níveis na faixa de 99 (nível mais baixo) a 240 V (nível mais alto) para  $v$  e a partir de 0 (nível mais baixo) até 12 min (nível mais alto) para  $t$ . Um ponto central (170 V e 5,5 min) com três repetições também foi incluído para avaliação estatística (em um nível de confiança de 95%), resultando em nove experimentos para o planejamento experimental realizado.

##### *4.2.5.2. Reator de plasma frio DBD plano*

O sistema experimental utilizado neste trabalho é mostrado na Figura 4.3 e também foi montado no Laboratório de Físico-Química Orgânica no Departamento de Química da UFSC. Um transformador de neon AC (220 V entrada / 17 kV saída) de alta tensão (60 Hz; Neonena) foi usado para gerar os canais de plasma entre os eletrodos. O reator DBD com eletrodos do tipo múltiplas pontas superfície plana foi construído utilizando aço como material dos eletrodos. A área dos eletrodos é de 30 x 15 cm e cada ponta numa mesma fila é equidistante em 1 cm das pontas vizinhas. Cada fila é posicionada a 1 cm em relação às filas vizinhas e desloca-se 0,5 cm entre estas. A área total comporta 420 pontas nesse arranjo. Uma barreira dielétrica (33 x 18 x 0,6 cm) foi



posicionada sobre o eletrodo terra de modo a prevenir faíscas. A câmara do reator foi construída em borossilicato e nas paredes foram acopladas a entrada e saída de gases do sistema. O ôgapõ de descarga, que é a zona de formação do plasma frio (Figura 4.3), foi fixado em 30 mm e ar atmosférico foi utilizado como gás de alimentação em todos os experimentos.



**Figura 4.3** é Configuração experimental do sistema DBD múltiplas pontas-plano utilizado neste trabalho.

#### 4.2.5.3. Procedimento de modificação da amostra

A fim de modificar a superfície do filme de zeína, os filmes foram posicionados sobre a barreira dielétrica, na zona de descarga de plasma (Figura 4.3). O ar atmosférico foi utilizado como gás de formação do plasma sem fluxo de entrada contínuo, em modo estático, isto é, durante todo o tempo de tratamento a entrada e saída de gás eram mantidas abertas sem admissão forçada de gás para dentro da câmara.

Em seguida, o reator DBD foi ligado durante o tempo de tratamento e a descarga de plasma deu início às reações químicas em fase gasosa que promoveram a modificação da superfície dos filmes poliméricos.

#### ***4.2.6. Adsorção de albumina de soro bovino***

Para a adsorção da albumina de soro bovino (BSA) sobre os filmes finos de zeína preparou-se uma solução de BSA (0,05%) em solução tampão fosfato-salina (PBS). Em seguida, 300  $\mu$ L desta solução foram adicionados sobre o substrato de silício contendo os filmes de zeína. Após 2 h de adsorção, a superfície dos filmes foi lavada cuidadosamente com água destilada, a fim de retirar a proteína que se mantivesse apenas adsorvida fracamente na superfície do filme e por último, os filmes foram secos à temperatura ambiente.

### **4.3. SISTEMA 3 6 FILMES FINOS NANOESTRUTURADOS PREPARADOS POR *SPIN COATING* A PARTIR DE PS-*b*-PAA**

#### **4.3.1. Materiais poliméricos**

Copolímeros em bloco à base de poliestireno e poli(ácido acrílico) (PS<sub>115</sub>-*b*-PAA<sub>15</sub> e PS<sub>183</sub>-*b*-PAA<sub>19</sub>), onde os subscritos referem-se ao grau médio de polimerização de cada bloco, cujas massas molares numéricas médias ( $M_n$ ) são 13100 e 20400 g mol<sup>-1</sup>, grau de polidispersidade (PDI) = 1,10 e 1,11 e fração em volume ( $f$ ) calculada para o PAA = 0,11 e 0,09, respectivamente, foram comprados diretamente da Polymer Source Inc. (Canadá) e utilizados sem purificação adicional.

#### **4.3.2. Preparação dos filmes**

Os filmes foram preparados utilizando *spin coater*. O copolímero foi dissolvido em dioxano, selecionado por se tratar de um bom solvente aos dois blocos (PS e PAA). A concentração da solução filmogênica foi de 1% (m/v).

#### **4.3.3. Modificação da superfície por plasma frio com reator de descarga de barreira dielétrica (DBD)**

##### **4.3.3.1. Reator de plasma frio DBD plano**

O reator de plasma frio utilizado foi o mesmo do sistema 4.2 descrito no item 4.2.5.2; porém, para este sistema não foi utilizado planejamento experimental. Sendo assim, através de estudos preliminares foram definidos os parâmetros de plasma utilizados para este sistema, com tensão elétrica primária de 250 V e tempo de tratamento de 10 min.

##### **4.3.3.2. Procedimento de modificação da amostra**

O procedimento de modificação dos filmes de copolímeros foi idêntico ao descrito na seção 4.2.5.3.

## 4.4. Caracterização da superfície dos filmes

### 4.4.1. Análise Térmica

#### 4.4.1.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Este estudo foi realizado para averiguar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos filmes, bem como avaliar a compatibilidade dos polímeros na mistura 1:1 em estudo. As análises foram realizadas utilizando-se um equipamento modelo DSC-50 da Shimadzu. Aproximadamente 4 mg de amostra foram aquecidos de 50 °C a 280 °C em atmosfera inerte de nitrogênio sob vazão de 50 mL min<sup>-1</sup> e taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. A  $T_g$  foi calculada no ponto de inflexão na linha base causada pela variação do calor específico da amostra.

### 4.4.2. Estudo de molhabilidade

#### 4.4.2.1. Determinação do ângulo de contato

O efeito da modificação por plasma do tipo DBD na modificação dos filmes poliméricos foi avaliado em termos de medidas de ângulo de contato em água. Os ângulos de contato de equilíbrio ( $\theta_e$ ) foram medidos por deposição de gotas de água destilada e deionizada sobre os filmes em estudo. Para tanto, foi utilizado um goniômetro DATA PHYSICS com *software* Image Tool especialmente concebido para este tipo de análise, localizado no Laboratório de Meios Porosos e Propriedades Termofísicas (LMPT) no Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente e as imagens foram capturadas com uma câmera fotográfica de alta resolução. Foram realizadas cinco medidas independentes, em diferentes lados de cada filme, sendo que a média dos valores foi considerada. Os ângulos de avanço e recuo ( $\theta_a$  e  $\theta_r$ , respectivamente) foram medidos no mesmo goniômetro supracitado acima e pela diferença entre  $\theta_a$  e  $\theta_r$ , foi possível calcular o valor da histerese ( $\Delta\theta$ ).

#### 4.4.2.2. Envelhecimento da superfície dos filmes tratados

Para verificar a estabilidade das modificações provocadas na superfície dos filmes tratados por DBD, filmes tratados foram envelhecidos durante 10 dias em dessecador à temperatura ambiente.

#### 4.4.2.3. Cálculo da energia de superfície

A energia de superfície dos filmes foi calculada após a medida do ângulo de contato ( $\theta$ ) usando o modelo geométrico de Owens & Wendt (OWENS & WENDT, 1969) mostrado na equação 1:

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left[ \left( \gamma_s^d \gamma_L^d \right)^{1/2} + \left( \gamma_s^p \gamma_L^p \right)^{1/2} \right] \quad (1)$$

Na equação,  $\gamma_s^d$  e  $\gamma_s^p$  são os termos dispersivo e polar, respectivamente, da energia de superfície do sólido,  $\gamma_s$ ;  $\gamma_L^d$  e  $\gamma_L^p$  são os termos dispersivo e polar, respectivamente, da energia de superfície do líquido,  $\gamma_L$  e  $\theta$  foi medido experimentalmente. Para determinar a  $\gamma_s$  fez-se necessário o uso de no mínimo dois líquidos com suas respectivas coordenadas, polar e dispersiva, conhecidas. Neste trabalho, foram usados dois líquidos que estão listados na Tabela 4.2 e os parâmetros de superfície foram retirados da literatura (SHIMIZU & DEMARQUETTE, 2000). A teoria de Wu (WU, 1971), através do modelo harmônico foi igualmente investigada, mas os resultados mostraram a mesma tendência em termos de energia de superfície como os obtidos com o modelo de Owens & Wendt.

**Tabela 4.2** Valores das energias superficiais dos líquidos usados no cálculo das componentes dispersiva e polar da energia superficial.

Líquidos	$\gamma_L$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$\gamma_L^p$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$\gamma_L^d$ (mJ m <sup>-2</sup> )
Água	72,8	51,0	21,8
Diiodometano	50,8	1,30	49,5

#### **4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)**

Este estudo foi realizado para verificar o comportamento morfológico dos filmes. As micrografias dos filmes em estudo foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico XL 50 (Philips, Holanda), equipado com um filamento de tungstênio como fonte de elétrons pertencente ao Laboratório de Materiais (LABMAT) do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSC. As amostras foram recobertas com uma camada fina de ouro em um metalizador (ISI - D2 Diode Sputtering System).

#### **4.4.4. Espectrometria de energia dispersiva (EDS)**

A fim de determinar a composição química dos domínios presentes no filme de PS/PMMA 1:1 foi realizado um estudo de SEM equipada com microsonda de energia dispersiva de raios-X (EDX). Estas análises foram realizadas visando à identificação de oxigênio presente na estrutura de PMMA.

#### **4.4.5. Microscopia de força atômica (AFM)**

Com o propósito de estudar a superfície topográfica dos filmes, imagens de AFM pelo modo contato foram obtidas utilizando um microscópio PicoSPM (Molecular Imaging Corporation, USA) localizado no Laboratório de Filmes Finos e Superfícies (LFFS) do Departamento de Física da UFSC. As imagens foram obtidas no modo contato, à temperatura ambiente, usando sonda (NP-S, Veeco, USA) composta por cantiléver e ponta de nitreto de silício. A ponta é de formato piramidal de raio de curvatura de 10 nm. O processamento das imagens e a determinação da rugosidade (R) foram realizadas utilizando o programa computacional de microscopia de sonda por varredura WSxM 4.0 Develop 12.1 (HORCAS *et al.*, 2007).

#### **4.4.6. Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)**

A análise por espectroscopia fotoeletrônica de raios-X foi realizada utilizando radiação K do Al, com energia de 1486,6 eV. O ânodo foi operado a 225 W (15 kV, 15 mA). A região correspondente ao orbital 1s do carbono (C<sub>1s</sub>) foi amplificada para poder obter uma maior resolução (energia de passagem de 10 eV). O ângulo de detecção, que

corresponde ao ângulo existente entre o detector de fotoelétrons e a reta normal à superfície da amostra foi fixado em 53° para todas as medidas. O sinal C<sub>1s</sub> a 285 eV foi usado como uma energia de referência. Todos os espectros foram obtidos através de funções Gaussianas (70%) e Lorentzianas (30%). As análises foram realizadas em *Omicron-Sphera*, localizado no Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### **4.4.7. Cultura celular**

O estudo referente à cultura celular foi realizado no Departamento de Análises Clínicas no laboratório de pesquisa localizado no Hospital Universitário (HU) da UFSC. Estudos também foram realizados no Departamento de Farmacologia dessa mesma Universidade.

##### *4.4.7.1. Método de preparação*

As células L-929 foram fornecidas pela American Type Culture Collection e foram mantidas em frascos plásticos sob congelamento a -196 °C, em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).

Para a utilização das células, foi realizado inicialmente o descongelamento das mesmas. Este descongelamento foi feito rapidamente em banho-maria a 37 °C sob agitação. Para o cultivo das células, o conteúdo do tubo criogênico foi transferido para um tubo de ensaio contendo o meio de cultura DMEM [soro fetal bovino 10% (v/v), estreptomicina (100 µg mL<sup>-1</sup>), penicilina (100 UI mL<sup>-1</sup>) e glutamina (2 mmol L<sup>-1</sup>)] e centrifugado por 5 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado levado para garrafas de cultura. Neste momento foi acrescentada a solução DMEM. A suspensão celular foi mantida em incubadora em ambiente úmido a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2-3 dias as células foram destacadas dos frascos com tripsina 0,25% (m/v) e etilenodiamino tetracético (EDTA) 1 mmol L<sup>-1</sup> e colocadas em um novo frasco.

##### *4.4.7.2. Métodos de esterilização*

Os filmes utilizados no estudo de cultura celular foram submetidos a três diferentes técnicas de esterilização: etanol e tampão PBS/radiação ultravioleta (UV), radiação UV e óxido de etileno. Para a utilização do etanol como agente de esterilização, os filmes foram

imersos em álcool etílico a 70% (v/v). Em seguida, cada lado do filme foi exposto à radiação UV por 15 min e, na seqüência, foram lavados exaustivamente com tampão PBS estéril (pH 7,4). A esterilização por radiação UV foi realizada através da exposição por 15 min de cada um dos lados dos filmes. O método de esterilização por óxido de etileno foi realizado sob as seguintes condições: vácuo de -0,11 a -0,17 kgf cm<sup>-2</sup>; tempo de exposição das membranas ao gás de 3 h; umidade entre 40 e 60%; temperatura de 40-60 °C.

#### **4.4.8. Avaliação da adesão e proliferação celular**

As suspensões celulares foram dispostas em placas com poços de 11 ou 40 mm de diâmetro, dependendo do método utilizado, e incubadas em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após este período, a placa foi levada ao microscópio óptico para avaliação da viabilidade das células ou possível contaminação das mesmas.

Comprovada a integridade da cultura celular, as placas foram levadas à capela de fluxo laminar, onde cada poço foi lavado com tampão PBS. A solução foi aspirada utilizando-se uma pipeta, sendo o processo de lavagem realizado em triplicata para cada poço. Após este procedimento, os filmes estéreis foram cortados em discos circulares (10 ou 39 mm de diâmetro) e deu-se prosseguimento à aplicação das amostras nos poços. Anéis de vidro foram usados para comprimir os filmes com 10 mm de diâmetro, evitando a flutuação dos mesmos. No caso dos filmes com diâmetro maior, foi utilizada fita dupla-face para fixação nas placas. As células foram destacadas dos frascos, contadas em um hemacitômetro e colocadas sobre as amostras em uma quantidade de  $5 \times 10^4$  células/poço. Em seguida, as placas foram levadas para incubação em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Após este período, as placas foram removidas da estufa e levadas ao microscópio óptico, ao qual foi acoplada uma câmera fotográfica, para análise dos resultados e obtenção das imagens.

#### **4.4.9. Testes de citotoxicidade**

A citotoxicidade foi determinada através de métodos qualitativos e quantitativos. A avaliação qualitativa foi realizada por microscopia de imunofluorescência para verificar mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento e lise celular. Para melhor visualização das células, empregou-se o corante laranja de acridina, por ser permeável à



membrana plasmática (GENG *et al.*, 1998). Após a incubação das células ( $5 \times 10^4$ /poço), os filmes e o controle foram lavados com tampão PBS e em seguida corados com laranja de acridina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após a coloração as imagens foram obtidas em um microscópio de imunofluorescência BX41 (Olympus), acoplado a uma câmera fotográfica (Olympus C-5060) para análise dos resultados. A avaliação quantitativa foi realizada com o mesmo corante; porém, utilizou-se o método de citometria em fluxo, pois este método é capaz de quantificar, em número de eventos, a amostra analisada. Cada partícula suspensa que passa na câmara de fluxo dispersa a luz de uma forma, e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula podem ser excitados emitindo luz que é captada pelos detectores fluorescentes. O corante laranja de acridina é uma substância que quando excitada emite radiação de fluorescência, que é detectada pelos detectores fluorescentes do citômetro de fluxo (CRISWELL *et al.*, 2003). A incubação das células para esse método foi realizada em placas de 40 mm de diâmetro para evitar que se formassem aglomerados de células, pois na avaliação por citometria de fluxo as células devem estar em suspensão para que sejam analisadas uma a uma. As células foram incubadas sobre os filmes e o grupo controle foi a placa de cultura celular. Após 24 h, foi retirado o meio de cultura das placas e as células aderidas foram lavadas com PBS; em seguida, utilizou-se tripsina para deslocar as células dos filmes e da placa. As células foram centrifugadas e ao *pellet* foi adicionado o corante laranja de acridina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e, por último, as células foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur. Para análise estatística, os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), com pós teste de comparação múltipla de Bonferroni, sendo considerados estatisticamente significativos valores com  $p < 0,001$ .

#### **4.4.10. Avaliação por microscopia eletrônica de varredura**

Após a incubação das células sobre os filmes e no grupo controle em placas de 24 poços, as mesmas foram lavadas cuidadosamente com tampão PBS e em seguida incubadas por 5 min em metanol para fixação. Na seqüência, o excesso de metanol foi retirado e os filmes foram lavados em tampão PBS novamente. O excesso de tampão foi removido e realizou-se a coloração May-Grunwald-Giemsas. A metodologia consiste na coloração sucessiva com eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald ó 0,2 g may-grünwald diluído em 100 mL de álcool metílico) e com azul-eosina (Giemsa ó 0,3 g giemsa em pó, 25

mL de glicerina diluídos em 25 mL de álcool metílico). Após a secagem, os filmes foram submetidos à análise por SEM.

**CAPÍTULO 5**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**  
**FILMES DE PS E PMMA**



## CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Este capítulo é destinado a resultados e discussões de filmes obtidos pelo processo de evaporação de solvente ó *casting* formados a partir de PS e PMMA. Apesar desses filmes já serem bastante estudados na literatura, foi obtida pela primeira vez uma excelente adesão e proliferação de células fibroblásticas L-929 e de melanoma B16F10 na mistura de PS:PMMA 1:1. Em função desses resultados, buscou-se explorar com maior profundidade estes sistemas, incluindo a modificação dos filmes por plasma frio com reator do tipo DBD. Após a modificação da superfície, a adesão celular foi melhorada significativamente e novamente a mistura de PS/PMMA 1:1 apresentou melhores resultados.

Publicações:

*Adhesion of L929 Mouse Fibroblast Cells on Poly(Styrene)/Poly(Methyl Methacrylate) Films. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1753-1757, 2009.*

*Polymer surface films unmodified and modified by non thermal plasma as new substrate for cell adhesion. (Submetido para: **Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials**)*



## 5.1. Adesão celular nos filmes não modificados

### 5.1.1. Caracterização dos filmes

Em um estudo preliminar realizado por Melo e colaboradores (MELO *et al.*, 2009), primeiramente os filmes foram caracterizados quanto ao comportamento térmico, morfológico e quanto às propriedades de hidrofiliicidade da superfície.

As temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), foram determinadas através de análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC, não mostradas neste trabalho) e evidenciaram através das curvas de DSC uma única  $T_g$  para o PS e PMMA (90 °C e 101 °C, respectivamente). Dois valores distintos de  $T_g$  são observados para o filme de PS/PMMA 1:1 (82 °C para PS e 98 °C para PMMA), indicando imiscibilidade entre os dois polímeros.

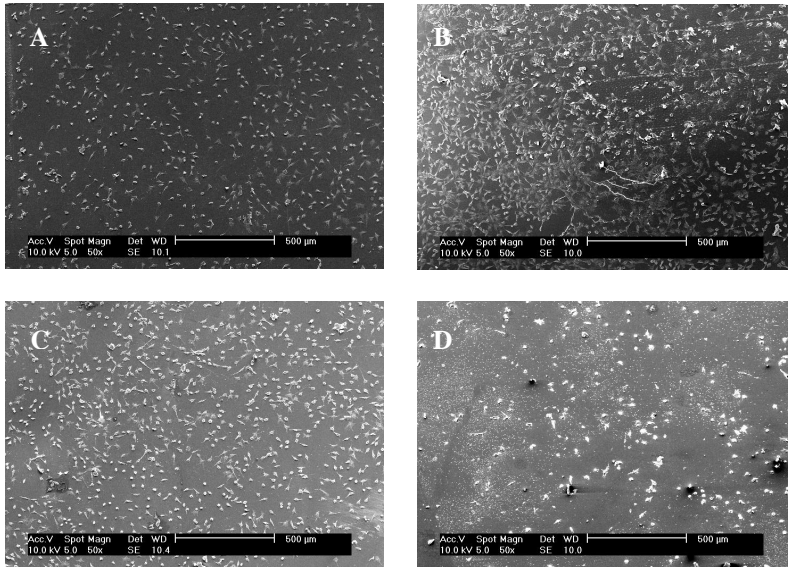
Os valores de ângulo de contato de equilíbrio em água para os filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA foram 95, 81 e 86 °, respectivamente, caracterizando uma superfície mais hidrofóbica para o filme de PS e mais hidrofílica para o filme PS/PMMA 1:1.

As micrografias da superfície que serão mostradas na Figura 5.10 mostram que os filmes de PS e PMMA apresentam características de sistemas densos, homogêneos, ausência de domínios e de rugosidade. Particularmente para o filme da mistura dos dois polímeros, foi possível observar a presença de domínios, possivelmente pela imiscibilidade entre os dois componentes.

Um estudo preliminar de adesão de células de fibroblastos L-929 também foi realizado. Analisando a Figura 5.1 é possível observar que os filmes estudados tiveram as células aderidas nas suas superfícies; no entanto, as imagens de SEM permitem visualizar uma preferência das células L-929 na superfície do filme de PS/PMMA 1:1 (Figura 5.1 B).

Os resultados obtidos neste estudo preliminar sugeriram viabilidade quanto ao uso de filmes de PS/PMMA 1:1 em experimentos futuros. Neste contexto, parece de suma importância uma investigação mais detalhada no que diz respeito às propriedades destes filmes para futura utilização como substratos para adesão e proliferação celular.

Testes de citotoxicidade e adesão celular *in vitro* mais detalhados são necessários para uma avaliação mais precisa e direta das vantagens e/ou desvantagens deste filme como biomaterial. Além disso, torna-se necessária uma avaliação quantitativa para averiguar a quantidade de células aderidas e comparar com o controle.



**Figura 5.1** ó Micrografias obtidas por SEM das células L929 após 24 h de contato com os filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) e controle (lamínula de vidro) (D) ó aumento de 50x.

## 5.1.2. Adesão de células L-929

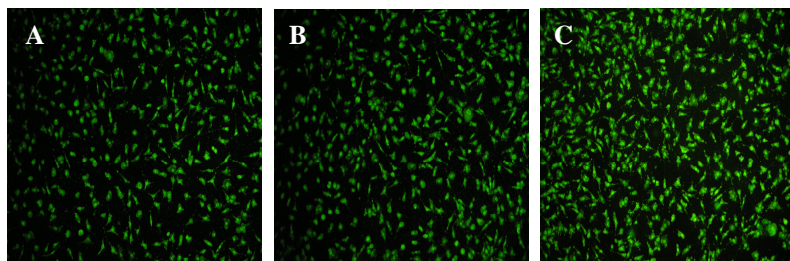
### 5.1.2.1. Métodos de esterilização

Conforme descrito na seção 4.4.6.2, os filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA foram submetidos a três métodos de esterilização distintos. A Figura 5.2 mostra as imagens de imunofluorescência com laranja de acridina das células L-929 aderidas no filme de PS/PMMA 1:1 após passar pelos três processos de esterilização: tampão PBS/UV (Figura 5.2 A), óxido de etileno (Figura 5.2 B) e somente por radiação UV (Figura 5.2 C).

Analisando as imagens pode-se perceber que não houve uma diferença muito significativa no que concerne à adesão celular, uma vez que todos os filmes apresentaram grande quantidade de células aderidas. No entanto, o filme submetido apenas ao método de esterilização por



radiação UV apresentou uma maior proliferação celular quando comparado aos outros métodos, o que levou à adoção desse método de



esterilização para análises posteriores.

**Figura 5.2** ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS/PMMA 1:1 após serem submetidos a três métodos de esterilização: tampão PBS/UV (A), óxido de etileno (B) e somente por radiação UV (C), após 24 h de cultura de células L-929 ó aumento de 40x.

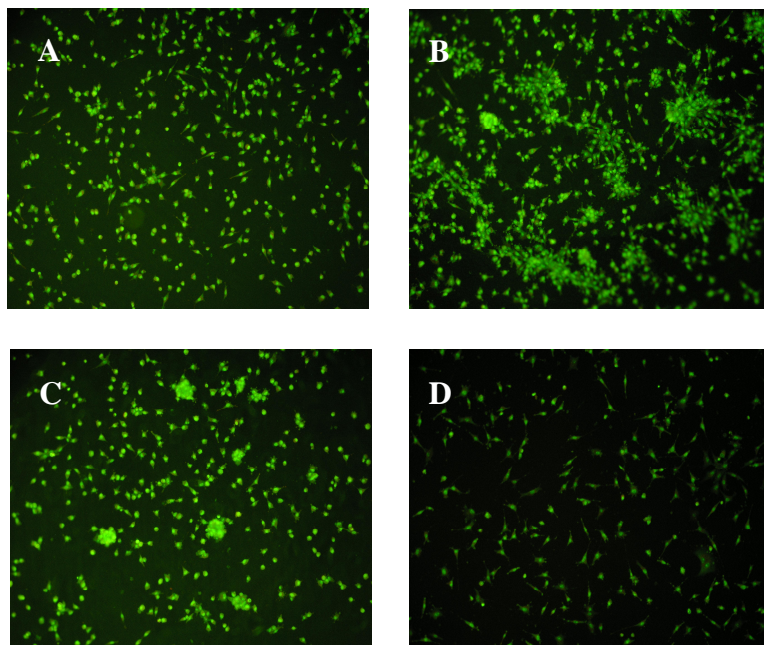
#### 5.1.2.2. Citotoxicidade *in vitro*

O teste de citotoxicidade avalia se o filme polimérico libera produtos nocivos no meio de cultura. Esses produtos entrariam em contato com as células e, portanto, torna-se necessário avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos filmes.

Os resultados obtidos por imunofluorescência utilizando laranja de acridina mostraram que as células L-929 iniciaram o processo de adesão celular na superfície de todos os filmes poliméricos estudados (Figura 5.3). Foi observado que as células aderidas nos filmes não sofreram alterações morfológicas em relação ao controle de toxicidade (lamínula de vidro). Isso mostra que os filmes poliméricos não exercem efeitos citotóxicos para as células que aderem a eles e não liberam substâncias tóxicas para o meio de cultura. Além disso, todos os filmes estudados foram capazes de estimular mais eficientemente a adesão celular que o controle (lamínula de vidro).

Como mostrado anteriormente, um estudo preliminar (MELO *et al.*, 2009) com células de fibroblastos L-929 nos filmes de PS e PMMA permitiu observar uma tendência de adesão mais efetiva no filme de PS/PMMA 1:1 (blenda), o que incentivou a condução de estudos mais avançados a fim de averiguar a efetividade dessa blenda como biomaterial.

Analisando as imagens da Figura 5.3 pode-se perceber que houve diferenças significativas no número de células aderidas em cada filme polimérico. A fim de provar essas diferenças, foi realizada uma avaliação quantitativa por citometria de fluxo (Figura 5.4).

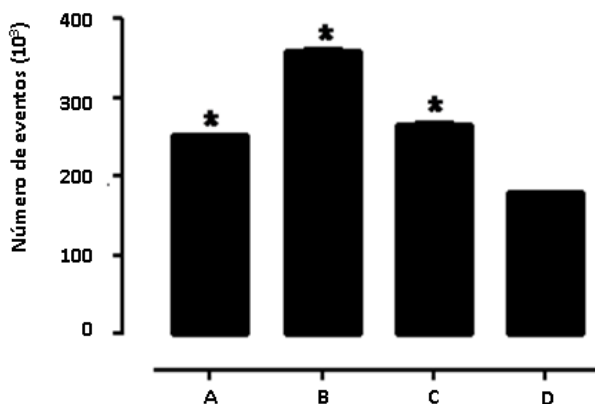


**Figura 5.3** ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. \*  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumento de 40x.

Todos os filmes estudados permitiram a adesão celular e, conseqüentemente, a proliferação, uma vez que o número de células aderidas a cada filme foi muito maior que o número inicial de células ( $5 \times 10^4$ /poço). Como mencionado anteriormente, houve diferenças significativas na proliferação celular para cada filme estudado, quando comparado ao grupo controle. O filme de PS puro (Figura 5.4 A)

mostrou um acréscimo de aproximadamente  $70 \times 10^3$  células quando comparado ao grupo controle (Figura 5.4 D). Esta diferença foi ainda mais significativa para o filme de PMMA puro (Figura 5.4 C), com um aumento de  $80 \times 10^3$  células. No entanto, o filme com maior proliferação celular foi o formado pela mistura de PS/PMMA 1:1 (Figura 5.4 B), com um aumento de aproximadamente 100% em relação ao número original de células.

Os resultados apresentados nas Figuras 5.3 e 5.4 estão de acordo com resultados de estudos prévios (MELO *et al.*, 2009), e sugerem o uso promissor da blenda de PS/PMMA para aplicações biomédicas. Alguns fatores como a molhabilidade da superfície de filmes poliméricos podem influenciar a adesão e proliferação celular, uma vez que a primeira camada da célula que toca a superfície do biomaterial é a água (ELLINGSEN, 1998).



**Figura 5.4** ó Avaliação por citometria de fluxo com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. \*  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni.

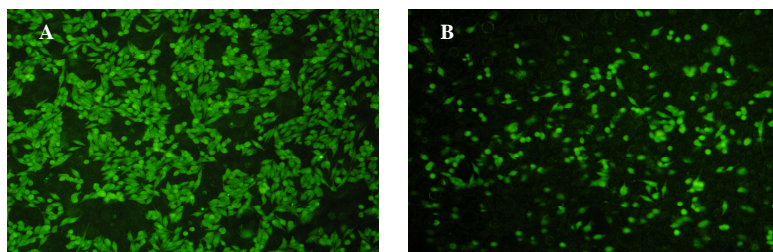
Os filmes estudados têm superfícies hidrofóbicas (ângulos de contato superiores a  $80^\circ$ ), principalmente o PS, devido à ausência de grupos polares em sua estrutura. Alterações da superfície com o objetivo de aumentar o caráter hidrofílico dos filmes devem, então ser realizados.

### 5.1.3. Citotoxicidade *in vitro* ó células B16F10

Apesar de todo avanço alcançado na medicina clínica preventiva, o câncer é uma ameaça oculta e de surgimento inesperado. O melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir dos melanócitos, o qual se caracteriza pela alta capacidade de infiltração no sistema nervoso central (SNC), sendo a principal causa da morte por doença de pele.

Além das células fibroblásticas L-929 também foram testadas no filme de PS/PMMA 1:1 células B16F10, a fim de averiguar possíveis aplicações desse filme no tratamento de melanoma. As imagens obtidas por imunofluorescência utilizando laranja de acridina estão mostradas na Figura 5.5. Analisando as imagens pode-se perceber que assim como o filme da mistura dos dois polímeros (Figura 5.5 A) foi capaz de aderir células L-929, a adesão celular de B16F10 também foi eficiente neste filme, uma vez que pode-se visualizar uma excelente adesão e proliferação celular no filme quando comparado ao grupo controle (Figura 5.5 B) (lamínula de vidro).

Apesar de o filme ter sido um excelente substrato para adesão das células de melanoma, é importante salientar que para este tipo celular não seria interessante apenas a sua adesão e proliferação no filme. Por se tratar de células cancerosas, seria extremamente útil incorporar uma droga capaz de causar apoptose celular. Então, o filme seria utilizado como uma òarmadilha, onde primeiramente seria feita a adesão e em seguida a liberaçõo do princípio ativo. Porém, estudos com incorporação de princípios ativos ainda vêm sendo desenvolvidos para verificar a validade desse método.



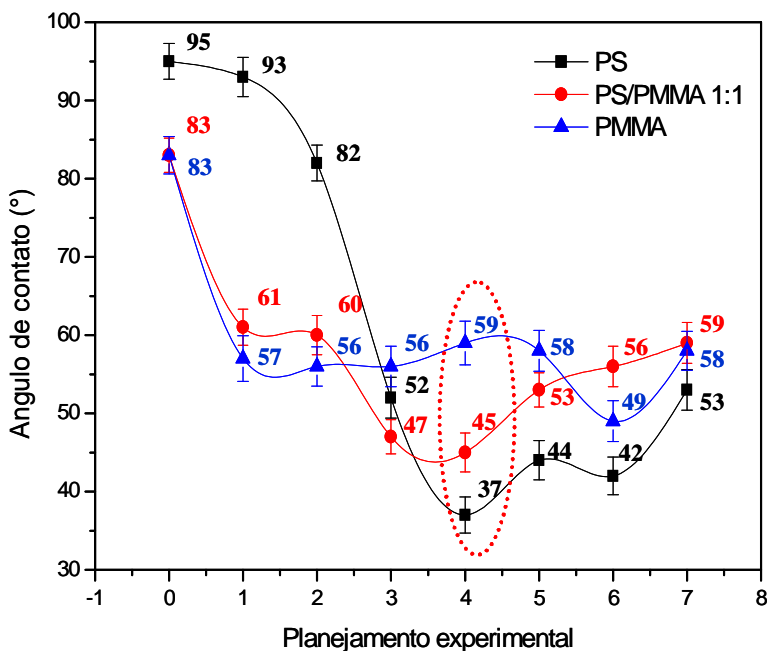
**Figura 5.5** ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS/PMMA 1:1 (A) e controle (B) após 24 h de cultura de células B16F10. \*  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumento de 40x.

## 5.2. Filmes não modificados e modificados por DBD

### 5.2.1. Planejamento experimental

Vários parâmetros de controle do sistema de reator de plasma DBD e a otimização destes parâmetros podem levar a melhores resultados sobre a modificação da superfície de filmes poliméricos. Como um meio para reduzir o número de experimentos e para otimizar o sistema para a modificação desejada dos filmes estudados, foi necessário o uso de um planejamento experimental.

A Figura 5.6 mostra os valores de ângulo de contato obtidos considerando o planejamento experimental. Após a modificação superficial houve um decréscimo significativo nos valores de ângulos de contato para todos os filmes estudados.



**Figura 5.6** ó Valores de ângulos de contato em água para os filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA após o planejamento experimental.

Analisando o gráfico pode-se perceber um maior decréscimo nos valores dos ângulos de contato para o experimento quatro, vazão ( $Q$ ) de  $O_2$  de  $2,0 \text{ L min}^{-1}$  e tempo de tratamento ( $t$ ) de 60 min. Aparentemente o experimento quatro foi o mais promissor para a obtenção de ângulos de contatos menores, porém uma análise estatística torna-se necessária para a escolha adequada.

A Figura 5.7 apresenta as superfícies de resposta resultantes do modelo experimental aplicado aos filmes de PS (Figura 5.7 A), PS/PMMA 1:1 (Figura 5.7 B) e PMMA

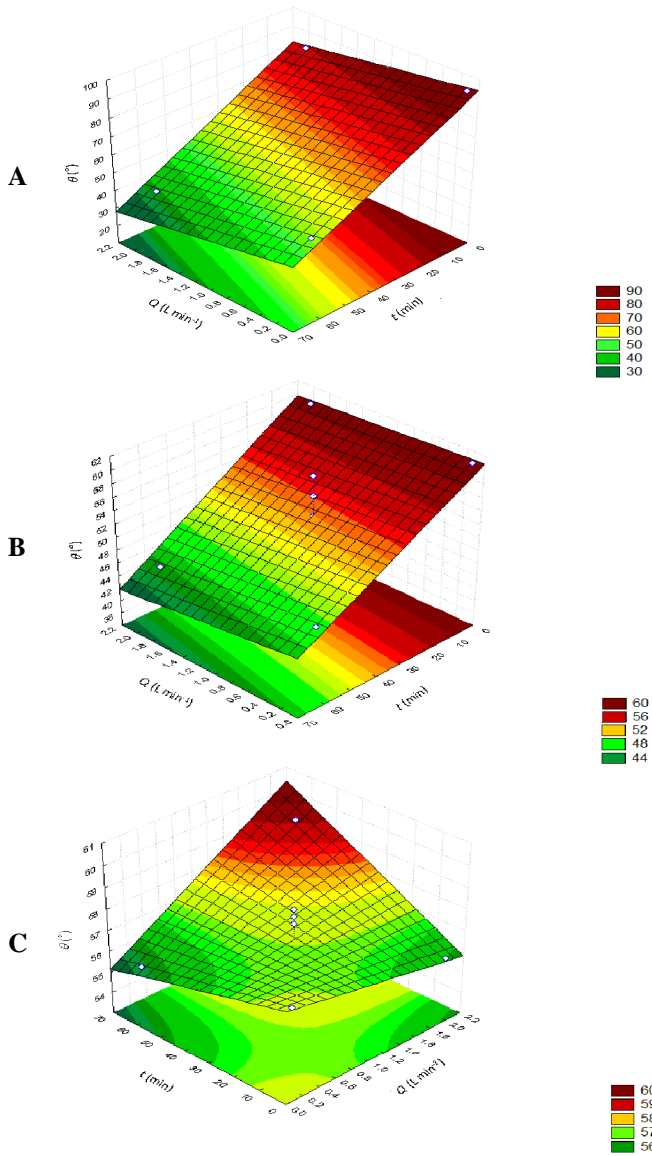
(Figura 5.7 C) modificados por reator DBD com  $O_2$  em diferentes condições de  $Q$  e de  $t$ . Em  $t = 0$  min, os valores de  $\theta$  para os filmes estudados foram: 95, 83 e  $83^\circ$  para o PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA respectivamente. Para o filme de PS (Figura 5.7 A;  $R^2_{\text{ajustado}} = 0,93244$ ), o tempo de tratamento é um parâmetro significativo de acordo com a ANOVA ( $p = 0,0387$ ). A  $Q$  e a interação  $Q/t$  não foram estatisticamente significativos. No entanto, a curvatura obtida para a superfície ajustada é significativa ( $p = 0,0428$ ), indicando que o modelo linear aplicado pode não ser tão satisfatório como um modelo quadrático para os dados experimentais obtidos. De acordo com o modelo da equação [ $\theta = 94,63 \text{ ó } 6,11(Q) \text{ ó } 0,69(t) \text{ ó } 0,0297(Q)$ ], como  $Q$  e  $t$  aumentam,  $\theta$  diminui.

Para o filme de PS/PMMA 1:1 (Figura 5.7 B;  $R^2_{\text{ajustado}} = 0,76946$ ),  $t$  também é significativo, ( $p = 0,0976$ ) em comparação com outros parâmetros (com  $p \times 0,81$ ) como mostrados pela ANOVA. O modelo de equação neste caso [ $\theta = 60,94 \text{ ó } 0,51(Q) \text{ ó } 0,22(t) \text{ ó } 0,0149(Q)(t)$ ] apresenta as mesma características obtidas pelo filme de PS.

Para o filme de PMMA (Figura 5.7 C;  $R^2_{\text{ajustado}} = 0,93223$ ), somente a interação de  $Q$  e  $t$  são significativos de acordo com a ANOVA ( $p = 0,017556$ ). A equação obtida neste caso [ $\theta = 57,43 \text{ ó } 0,74(Q) \text{ ó } 0,033(t) + 0,0445(Q)(t)$ ] mostra um sinal positivo para a interação  $Q$  e  $t$ , o que significa que o efeito  $Q$  depende do nível de  $t$  e vice versa. Assim, o ajuste de  $t$  ao alto nível ( $2,0 \text{ L min}^{-1}$  e 60 min) irá resultar (de acordo com o modelo da equação) em valores superiores de ângulo de contato. No entanto, os valores de  $\theta$  previsto pelo modelo, como visto na superfície de resposta (Figura 5.7 C), não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste  $t$  (comparação entre os pontos altos, baixos e central), o que sugere que qualquer combinação possível entre esses fatores poderia ser usada. Deve também ser observado que, apesar de não haver diferenças significativas nos valores

de  $\theta$  para o filme de PMMA modificado, pode ser observada, na Figura 5.6 diferença de  $\theta$  para o modificado ( $56^\circ$  -  $60^\circ$ ) e para o não modificado ( $83^\circ$ ), o que deve ser levado em conta para análises posteriores e indica claramente a eficácia do tratamento por DBD.

Finalmente, é importante salientar que a seleção de  $\theta$  como fator de resposta em vez de o número de células vivas ( $n$ ) junto à superfície polimérica é, do ponto de vista experimental, a escolha mais adequada, pois as medidas de  $\theta$  podem ser facilmente realizadas. Além disso, devido ao fato de  $\theta$  estar diretamente relacionado com  $n$ , a alteração do fator de resposta entre essas variáveis pode resultar em um perfil diferente de superfície de resposta, de modo que um máximo (ou mínimo) poderia ter sido obtido. Este efeito pode explicar parcialmente a ausência de uma região de máximo na superfície de resposta obtida neste estudo. Assim, com base nos resultados experimentais obtidos e a fim de manter as condições experimentais aplicadas as mais semelhantes possíveis para cada amostra, uma vazão de  $O_2$  de  $2,0 \text{ L min}^{-1}$  e tempo de tratamento de 60 min foram escolhidos como condições adequadas para os experimentos subsequentes com os filmes poliméricos estudados.



**Figura 5.7** ó Superfícies de resposta obtidas a partir de um modelo linear para PS (A), PS/PMMA 1:1 (B) e PMMA (C) usando ângulo de contato em água ( $\theta$ ) em função da vazão ( $Q$ ) de  $O_2$  e tempo de tratamento ( $t$ ).



### 5.2.2. Estudo de molhabilidade

#### 5.2.2.1. Medidas de ângulo de contato

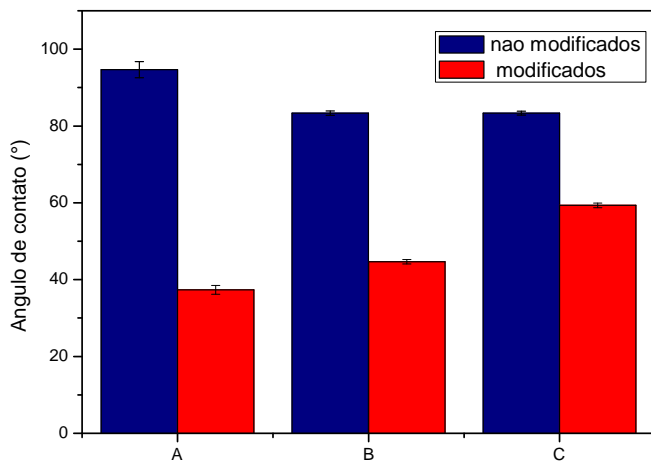
A medida de ângulo de contato é uma das maneiras mais fáceis de avaliar a natureza hidrofóbica ou hidrofílica das superfícies. O ângulo de contato é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado. A condição para a completa molhabilidade de uma superfície sólida é obter ângulo de contato igual à zero. Esta condição é totalmente alcançada quando as forças de atração entre líquido e sólido são iguais ou maiores que as forças da interface líquido-líquido (coesão) (SHAW, 1975).

A hidrofiliabilidade é um dos fatores mais importantes que afetam a citocompatibilidade de biomateriais. A adesão e crescimento das células nas superfícies são considerados como fortemente influenciados pelo balanço hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, frequentemente descritos como molhabilidade. Alguns trabalhos demonstraram que a maior parte das células adere, espalha-se e cresce mais facilmente em substratos com hidrofiliabilidade moderada do que em substratos hidrofóbicos ou muito hidrofílicos (YANG *et al.*, 2002; TEZCANER *et al.*, 2003).

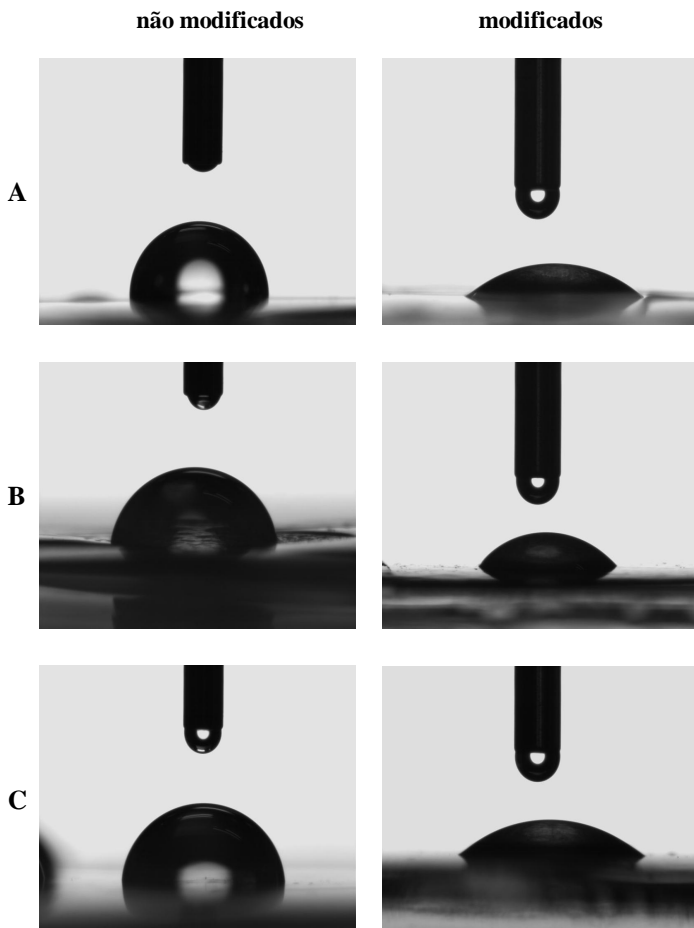
Os valores dos ângulos de contato para a superfície dos filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA, bem como o perfil das gotas de água na superfície dos filmes estão apresentados nas Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente.

A acentuada redução inicial do ângulo de contato de equilíbrio em água foi observada para todos os filmes tratados por DBD, quando comparados aos filmes correspondentes não tratados. Isto indica que um aumento significativo na molhabilidade foi induzido pela modificação. No caso do PS (Figura 5.8 A), o ângulo de contato foi reduzido de 95° para 37° após o tratamento, o que significa que o tratamento por DBD promoveu mudanças drásticas na superfície do PS. Em contraste, o ângulo de contato para o PMMA (Figura 5.8 C), passou de 83° para 59°. No caso da mistura PS/PMMA 1:1 (Figura 5.8 B), o ângulo de contato foi reduzido de 83° para 45°.

Geralmente, uma diminuição do ângulo de contato é devida à adição de novos grupos polares na superfície dos filmes. No entanto, uma mudança da molhabilidade de superfície pode também ser atribuída a muitos outros efeitos, como a rugosidade e mudanças na estrutura química do filme.



**Figura 5.8** ó Valores de ângulo de contato para a superfície dos filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B) e PMMA (C) antes e após a modificação.



**Figura 5.9** ó Imagens de gotas de água na superfície dos filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B) e PMMA (C) antes e após a modificação.

#### 5.2.2.2. Medidas da energia de superfície

Uma importante aplicação das medidas de ângulo de contato é a avaliação da energia superficial sólida ( $\gamma_s$ ) (BUTT *et al.*, 2003).

Os líquidos preferem uma forma geométrica com menor área. Por isso, gotículas de líquidos tendem a ser esféricas, pois nessa forma adquirem uma menor área superficial para um dado volume. Nesse caso,

a tensão superficial pode ser definida como uma força atuando paralelamente à superfície por unidade de comprimento (ADAMSON, 1990).

Assim como a molhabilidade, a energia superficial exerce um importante papel na adesão e proliferação celular, haja vista que quanto maior a molhabilidade, maior também será a energia de superfície. Hallab e colaboradores (HALLAB *et al*, 2001), demonstraram que a energia livre de superfície foi a característica mais importante na aderência e proliferação celular. Schakenraad e colaboradores (SCHAKENRAAD *et al.*, 1988) concluíram que apesar do grande número de parâmetros que interferem na adesão celular, a energia livre de uma superfície sólida aparentemente é um fator dominante na adesão celular.

Como citado na seção 4.4.1.3, utilizou-se o modelo geométrico de OwensóWendt (Equação 1) para o cálculo da energia superficial dos filmes estudados e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5.1.

Para o cálculo da energia de superfície, além de fazer as medidas em um solvente polar (água), torna-se necessário o uso de um solvente pouco polar. No caso deste trabalho utilizou-se o diiodometano, por se tratar de um solvente apolar e por não reagir com os polímeros estudados.

A Tabela 5.1 mostra os valores do ângulo de contato no equilíbrio dos filmes antes e após o tratamento, usando água e diiodometano como líquidos de medida. Observa-se que o ângulo de contato possui o mesmo comportamento para ambos os líquidos estudados, ou seja, após o tratamento, todos os filmes apresentaram maior molhabilidade de superfície. No entanto, os valores de  $\theta_c$  obtidos para o diiodometano ( $\gamma_L = 50,8 \text{ mJ m}^{-2}$ ) foram menores que os obtidos para a água ( $\gamma_L = 72,8 \text{ mJ m}^{-2}$ ), ou seja, apresentam maior molhabilidade sobre a superfície dos filmes estudados. Isto ocorre devido ao diiodometano ter energia livre superficial menor que a água.

**Tabela 5.1** ó Ângulos de contato de equilíbrio ( $\theta_e$ ), energia de superfície total ( $\gamma_s$ ) e componentes de energia de superfície dos filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA antes e após a modificação.

Filmes	$\theta_e$ (°)		$\gamma_s$ (mJ m <sup>-2</sup> )		
	Água	Diiodometano	<sup>2</sup> $\gamma_s^d$	<sup>3</sup> $\gamma_s^p$	<sup>4</sup> $\gamma_s$
PS	94,7 ± 1.16	55,7 ± 1.18	30,1	1,14	31,2
PS/PMMA 1:1	83,3 ± 2.58	39,0 ± 2.63	38,6	2,75	41,3
PMMA	83,3 ± 1.58	43,1 ± 3.23	36,5	3,10	39,6
<sup>1</sup> PS	37,3 ± 2.08	36,7 ± 2.94	35,7	27,7	63,4
<sup>1</sup> PS/PMM A 1:1	44,7 ± 3.15	36,3 ± 3.23	36,7	22,4	59,1
<sup>1</sup> PMMA	59,3 ± 1.58	42,0 ± 2.23	34,8	14,9	49,7

<sup>1</sup>Filmes modificados; <sup>2</sup>Componente dispersiva; <sup>3</sup>Componente polar; <sup>4</sup>Método de Owens-Wendt.

O comportamento da energia de superfície e das suas componentes polar e dispersiva também está mostrado na Tabela 5.1. Após o tratamento não houve uma mudança significativa nos valores das componentes dispersivas, porém o mesmo não foi observado para os valores das componentes polares que apresentaram um aumento significativo após o tratamento para todos os filmes estudados. No caso do filme de PS, este aumento foi ainda maior, aumentando o valor da energia de superfície da componente polar de 1,14 para 27,7 mJ m<sup>-2</sup>, o que corrobora com a adição de novos grupos polares na sua superfície.

O comportamento da energia de superfície para os filmes estudados é similar ao observado para as medidas de  $\theta_e$ , pois após o tratamento houve um aumento na molhabilidade da superfície e, em consequência disso, um aumento na energia de superfície foi observado. O filme de PS apresentou um aumento superior a 100% no valor da energia de superfície após o tratamento. Já no caso do filme de PS/PMMA 1:1 este aumento foi menos significativo, passando de 40% após a modificação superficial. O filme que apresentou um efeito menos

significativo após a modificação foi o filme de PMMA, mostrando um aumento no valor da energia de superfície de aproximadamente 25% quando comparado ao filme não tratado. O menor valor de energia superficial encontrado para o filme de PMMA após o tratamento pode resultar do fato que a modificação causada na superfície desse filme não tenha ocorrido pela adição de novos grupos polares na sua superfície e sim por mudanças na topografia de superfície, através de um aumento de rugosidade. Essa confirmação será mostrada através de outras análises, tais como, microscopia de força atômica, que serão discutidas posteriormente.

### *5.2.2.3. Medidas de histerese*

A histerese do ângulo de contato nada mais é do que uma consequência da não homogeneidade ou aspereza da superfície e pode ser medida através da diferença dos ângulos de avanço e recuo.

A Tabela 5.2 mostra os valores dos ângulos de contato de avanço e recuo, bem como os valores de histerese para os filmes antes e após a modificação. O PS mostrou um valor de histerese de 6°; no entanto, este aumento foi mais significativo nos filmes da mistura de PS/PMMA 1:1 e PMMA, com valores de 13° e 18°, respectivamente. Um aumento no valor de histerese após o tratamento indica que a superfície dos filmes se tornou mais heterogênea após a modificação.

**Tabela 5.2** ó Valores de ângulos de avanço e recuo ( $\theta_a$  e  $\theta_r$  respectivamente) e histerese ( $\Delta\theta$ ) de filmes de PS, PS/PMMA 1:1 e PMMA antes e após a modificação.

Filmes	$\theta_a$ (°)	$\theta_r$ (°)	$\Delta\theta$ (°)
PS	$96,2 \pm 3.23$	$82,7 \pm 3.93$	14,0
PS/PMMA 1:1	$89,4 \pm 2.84$	$81,6 \pm 3.01$	8,00
PMMA	$84,2 \pm 1.25$	$81,8 \pm 2.22$	3,00
<sup>1</sup> PS	$54,8 \pm 2.91$	$34,8 \pm 3.18$	20,0
<sup>1</sup> PS/PMMA 1:1	$51,0 \pm 3.24$	$30,0 \pm 3.98$	21,0
<sup>1</sup> PMMA	$61,0 \pm 3.22$	$40,0 \pm 3.96$	21,0

<sup>1</sup>Filmes modificados.

Este fato pode ser explicado pelo menor ângulo de recuo quando comparado ao ângulo de avanço, indicando a presença de grupos químicos hidrofílicos na superfície. No entanto, uma vez que um menor ângulo de contato após a modificação ( $37^\circ$ ) para o filme de PS foi obtido, um maior valor de histerese teria sido esperado quando comparado com os outros filmes. Isto significa que, além de um aumento no número de grupos químicos polares na superfície, a topografia do filme também deve ser levada em conta. Com base nos resultados obtidos, uma explicação para a grande mudança na molhabilidade dos filmes envolve a adição de grupos polares na superfície de PS e um aumento da rugosidade na superfície de PMMA.

#### 5.2.2.4. Envelhecimento da superfície dos filmes tratados

A fim de verificar a estabilidade dos filmes após o tratamento, foram realizados estudos semelhantes de molhabilidade após os filmes serem deixados em repouso durante 10 dias. Os resultados estão mostrados na Tabela 5.3.

Após 240 h de tratamento, a mudança na medida de ângulo de contato de equilíbrio foi muito pequena, de até  $5^\circ$ , o que pode ser

considerado muito baixo para causar uma mudança significativa na superfície.

**Tabela 5.3** ó Ângulo de contato de equilíbrio ( $\theta_e$ ) em água do envelhecimento dos filmes tratados após 240 h.

Filmes	$\theta_e$ (°) ó 24 h	$\theta_e$ (°) ó 240 h
PS	$37,3 \pm 2,08$	$39,4 \pm 2,01$
PS/PMMA 1:1	$44,7 \pm 3,15$	$49,3 \pm 3,19$
PMMA	$59,3 \pm 1,58$	$61,3 \pm 1,95$

Esta pequena diferença nos valores de ângulo de contato após o envelhecimento dos filmes pode ser explicado pelo relaxamento da superfície do polímero, pois o polímero tende a voltar à sua estrutura original, uma vez que apresenta uma menor tensão superficial. Esta mudança insignificante obtida nos valores de ângulos de contato após 240 h de tratamento confirma a mudança permanente na superfície dos polímeros estudados.

### 5.2.3. Caracterização morfológica da superfície

#### 5.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Estudo de microscopia eletrônica de varredura é importante por vários aspectos, e neste caso foi realizado com o intuito de analisar a morfologia dos filmes, principalmente do filme formado pela mistura dos dois polímeros. A presença de rugosidade e domínios nas micrografias sugere, geralmente, melhor adesão celular.

A morfologia dos filmes obtidos foi primeiramente investigada visualmente. Os filmes dos polímeros puros apresentaram um aspecto diferente quando comparados ao da mistura. Para os polímeros puros, os filmes eram transparentes à temperatura ambiente e homogêneos. No caso da mistura, o filme apresentou-se opaco, heterogêneo, e a formação de macro domínios foi detectável mesmo a olho nu. Além disso,



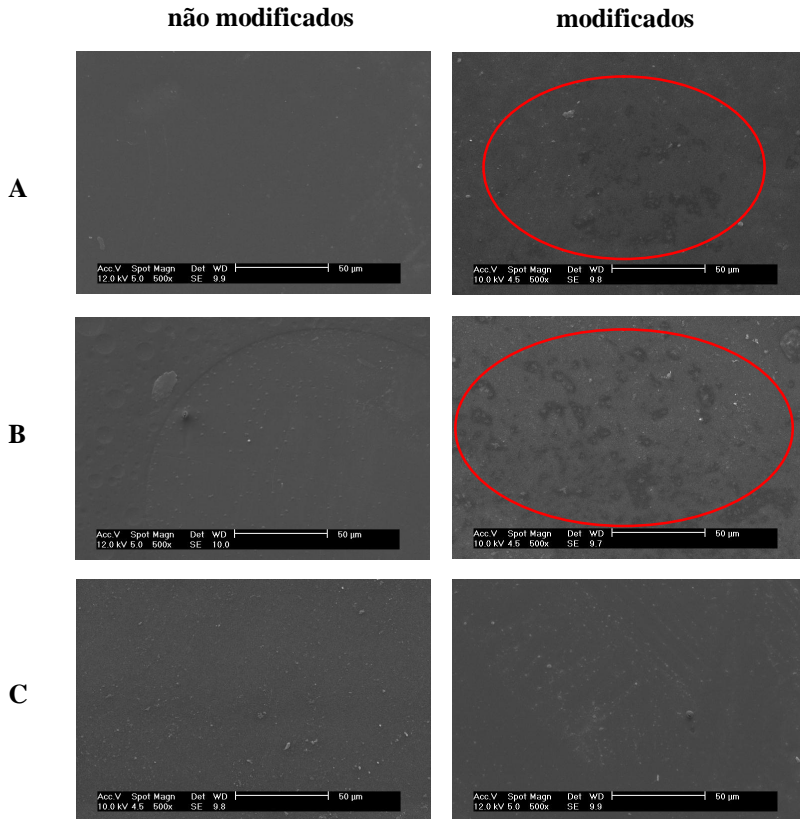
observou-se que os domínios estavam presentes em diferentes alturas, com domínios na região superior e inferior do filme.

As micrografias da superfície dos filmes antes e após a modificação estão mostradas na Figura 5.10. Os filmes de PS e PMMA (Figuras 5.10 A e C) mostram características de superfícies densas, homogêneas, bem como ausência de domínios e rugosidades. Já a micrografia do filme de PS/PMMA 1:1 (Figura 5.10 B) mostra a presença de domínios discretos, o que pode ser explicado, como descrito na seção 5.1.1, pela separação de fases entre os dois polímeros formadores da mistura.

Após o tratamento, houve uma mudança significativa na superfície dos filmes de PS e PS/PMMA 1:1, como mostra o círculo nas imagens (Figuras 5.10 A e B). Esta mudança pode ser explicada pela incidência de microfilamentos de plasma ou faíscas transientes preferenciais em algum ponto da superfície, uma vez que as descargas do plasma atingem a superfície pontualmente, tornando a superfície micro-heterogênea. Além disso, pode-se perceber que o PS é preferencialmente afetado, possivelmente devido à presença de grupos polares que foram adicionados após o tratamento, uma vez que este efeito não foi observado para o filme de PMMA.

#### *5.2.3.2. Espectrometria de energia dispersiva (EDS)*

Como descrito na seção anterior, os domínios formados na superfície do filme da mistura de PS/PMMA 1:1 apresentam distintas regiões (superiores e inferiores) causadas pela separação de fases de seus componentes. Assim, foi necessária uma análise de EDS para identificar cada polímero na mistura, e este estudo foi realizado antes e após a modificação superficial (Tabela 5.4). No filme não modificado, a análise de EDS mostrou aproximadamente 51% de oxigênio na região superior do filme e apenas 14% de oxigênio na região inferior. Após a modificação da superfície do filme, a porcentagem de oxigênio presente na região superior caiu aproximadamente 10%. No caso da região inferior o teor de oxigênio foi de aproximadamente 22%.



**Figura 5.10** ó Micrografias das superfícies para os filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B) e PMMA (C) antes e após a modificação - aumento de 500x.

**Tabela 5.4** ó Estudo de EDS nas regiões superiores e inferiores dos domínios presentes no filme de PS/PMMA 1:1.

PS/PMMA 1:1	Oxigênio (%)
Região superior	50,56
Região inferior	14,44
<sup>1</sup> Região superior	41,30
<sup>1</sup> Região inferior	21,56

<sup>1</sup>Filmes modificados

Esta análise foi de suma importância para distinguir os domínios da mistura, pois a quantidade de oxigênio presente nos filmes não modificados e modificados foi significativamente maior na região superior. Como o PS antes da modificação não apresenta oxigênio na sua estrutura, torna-se evidente que o PMMA predomina a parte superior dos domínios presentes no filme da mistura 1:1 de PS e PMMA. Além disso, após a modificação o teor de oxigênio decresceu na região superior e aumentou aproximadamente 8% na região inferior. Sendo assim, essa análise também concorda com o estudo de molhabilidade, o qual mostrou a incorporação de grupos polares na estrutura do PS. Como o gás utilizado no tratamento por plasma foi o oxigênio, é possível que os grupos polares adicionais na estrutura do PS tenham sido ocasionados por ligações com o oxigênio, aumentando assim o teor deste elemento na região inferior após o filme ter sofrido modificação superficial.

#### 5.2.4. Caracterização topográfica

##### 5.2.4.1. Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é uma das técnicas de captação de imagens geradas por forças de interação que atuam entre dois átomos ou moléculas e podem ser classificadas de acordo com sua capacidade de atração e repulsão. Na análise de AFM pelo modo contato, também conhecido como modo repulsivo (modo utilizado neste trabalho), a ponta está em contato físico com a amostra quando esta varre a superfície do material analisado. Neste caso, a força de interação

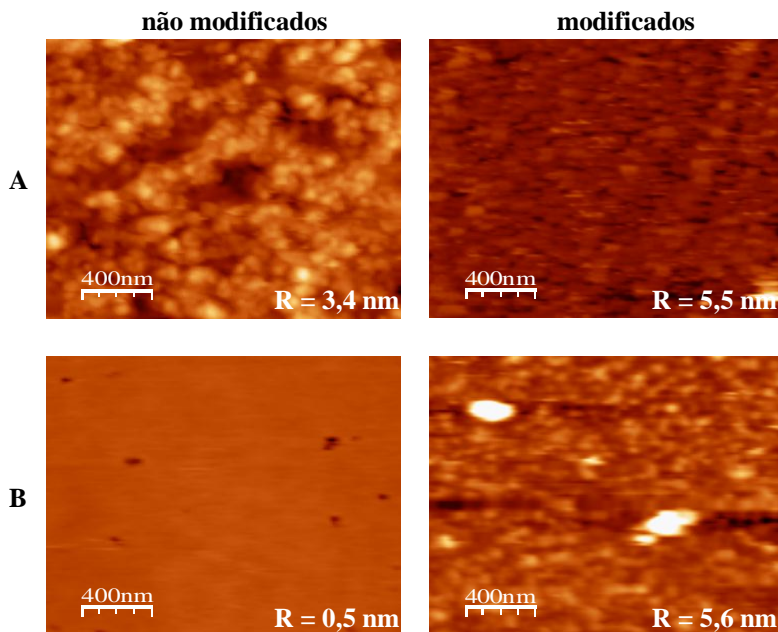
entre a ponta e a amostra é, principalmente, de natureza repulsiva (JALILI & LAXMINARAYANA, 2004).

O tratamento de superfície por plasma pode provocar modificações na topografia dos polímeros. Além disso, assim como a molhabilidade, estudos mostram que superfícies mais rugosas favorecem a adesão e proliferação celular (WOODCOCK *et al.*, 2005; SHIN, 2007).

A Figura 5.11 mostra as imagens de AFM dos filmes de PS (Figura 5.11 A) e PMMA (Figura 5.11 B) antes e após a modificação e os valores de rugosidade (R).

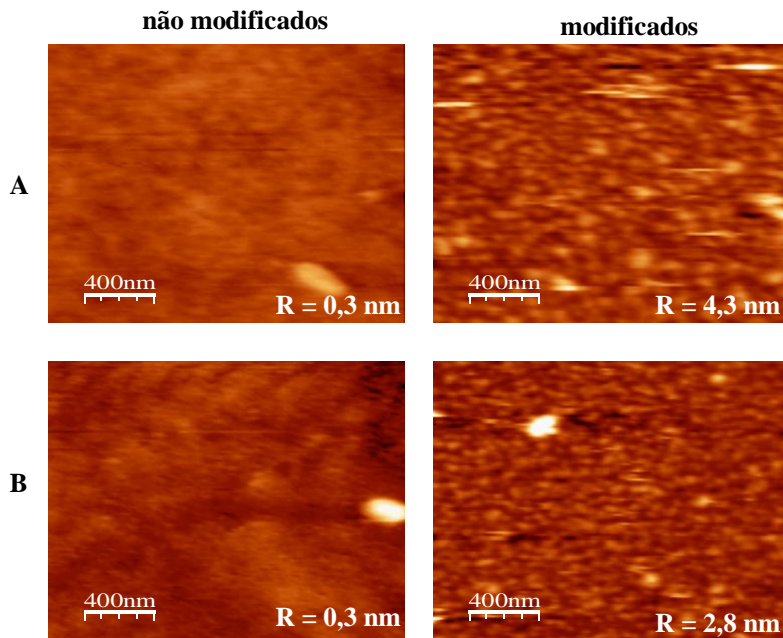
O filme de PS antes da modificação apresentou uma região rugosa com  $R = 3,4$  nm, enquanto que os filmes de PMMA mostrou-se mais plano com  $R = 0,5$  nm.

Após o estudo de EDS, diferentes domínios (superior e inferior) no filme de PS/PMMA 1:1 foram analisados, como pode ser observado na Figura 5.12. O filme da mistura dos dois polímeros antes da modificação apresentou uma superfície plana, tanto no domínio da região superior (Figura 5.12 A) quanto no da inferior (Figura 5.12 B) com  $R = 0,3$  nm para ambas as regiões. Após a modificação, o valor de R na região superior aumentou 4,0 nm, enquanto que na região inferior o aumento foi de apenas 2,5 nm.



**Figura 5.11** ó Imagens topográficas obtidas por AFM ( $2,0 \times 2,0$ )  $\mu\text{m}^2$  da superfície dos filmes de PS (A) e PMMA (B) antes e após a modificação. A escala de altura foi normalizada para uma melhor observação da superfície e R mostra a rugosidade da superfície.

Um comportamento característico para todos os filmes é que a topografia da superfície modificada apresenta uma maior rugosidade quando comparada aos filmes não modificados, com um aumento menos pronunciado para o filme de PS. Além disso, o domínio formado na região superior do filme da mistura após a modificação apresentou maior rugosidade que o domínio na região inferior, o que confirma os resultados obtidos por EDS e histerese de ângulo de contato.



**Figura 5.12** ó Imagens topográficas obtidas por AFM ( $2,0 \times 2,0$ )  $\mu\text{m}^2$  da superfície do filme de PS/PMMA 1:1 (antes e após a modificação) formado pelos domínios da região superior (A) e pelos domínios da região inferior (B). A escala de altura foi normalizada para uma melhor observação da superfície e R mostra a rugosidade da superfície.

### 5.2.5. Análise química

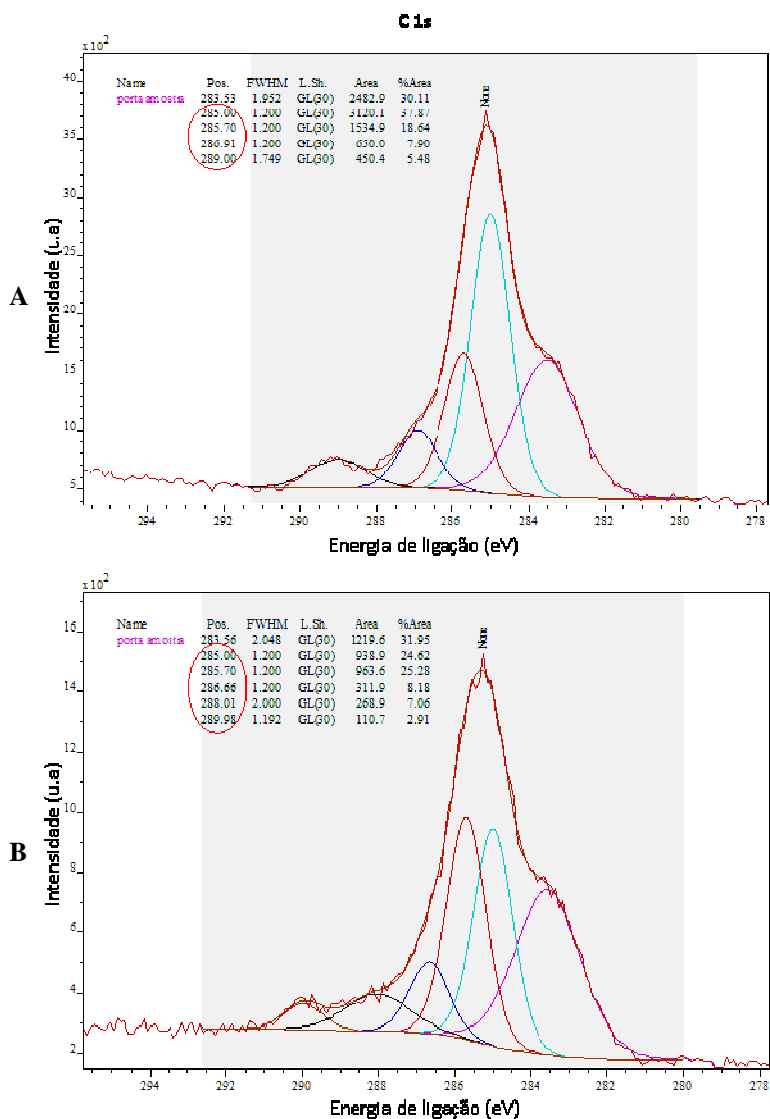
#### 5.2.5.1. Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)

A análise de XPS é um método baseado na fotoemissão de elétrons de diferentes níveis de energia dos elementos em questão, causado pela irradiação de raios-X. A análise de XPS atinge a profundidade de 2-5 nm abaixo da superfície do material analisado. Esta análise é utilizada para determinar a composição química superficial dos materiais antes e depois da modificação por plasma (OHRING, 1991).

O efeito do tratamento por DBD na superfície química dos filmes estudados foi avaliado por XPS e as energias das ligações obtidas foram circuladas nos espectros para melhor visualização. Analisando o espectro de XPS do sinal de carbono na região do orbital 1s ( $C_{1s}$ ) para o

filme de PS não modificado (Figura 5.13 A), pode-se perceber a presença de um pico em 285,0 eV que, de acordo com a literatura (LARRIEU *et al.*, 2005; DøSA *et al.*, 2010), corresponde a ligações alifáticas e aromáticas C-C/C-H. Além desse pico, a literatura (LARRIEU *et al.*, 2005; DøSA *et al.*, 2010) relata um pico em aproximadamente 292,0 eV e atribui à transição  $\pi$ - $\pi^*$  do anel aromático. No entanto, o filme de PS não modificado não apresentou este pico. Além disso, como mostrado na Figura 2.1, o PS antes do tratamento não apresenta ligações com oxigênio na sua estrutura química. Porém, o filme apresentou três picos referentes a ligações com oxigênio. Dessa forma, de acordo com a literatura (DøSA *et al.*, 2010), essas energias de ligações são correspondentes a: 285,7 eV (C-O), 286,9 eV (O=C/O-C-O-) e 289,0 eV (O=C-O) para o PS após sofrer algum tipo de modificação com oxigênio.

É importante salientar que XPS é uma técnica de medidas de superfície, o que significa que apenas os primeiros nm das amostras são analisados. Dessa forma, pequenas contaminações, tais como impureza na amostra ou contaminação do reator, podem influenciar significativamente no espectro obtido. Após o tratamento com O<sub>2</sub> por DBD (Figura 5.13 B), o filme de PS apresentou as mesmas ligações que o não modificado, porém com surgimento de um pico de baixa intensidade em 288,0 eV (O=C-OR) que, de acordo com a literatura (VESEL, 2010), pode ser atribuído à ligação de grupo carboxila ou éster.



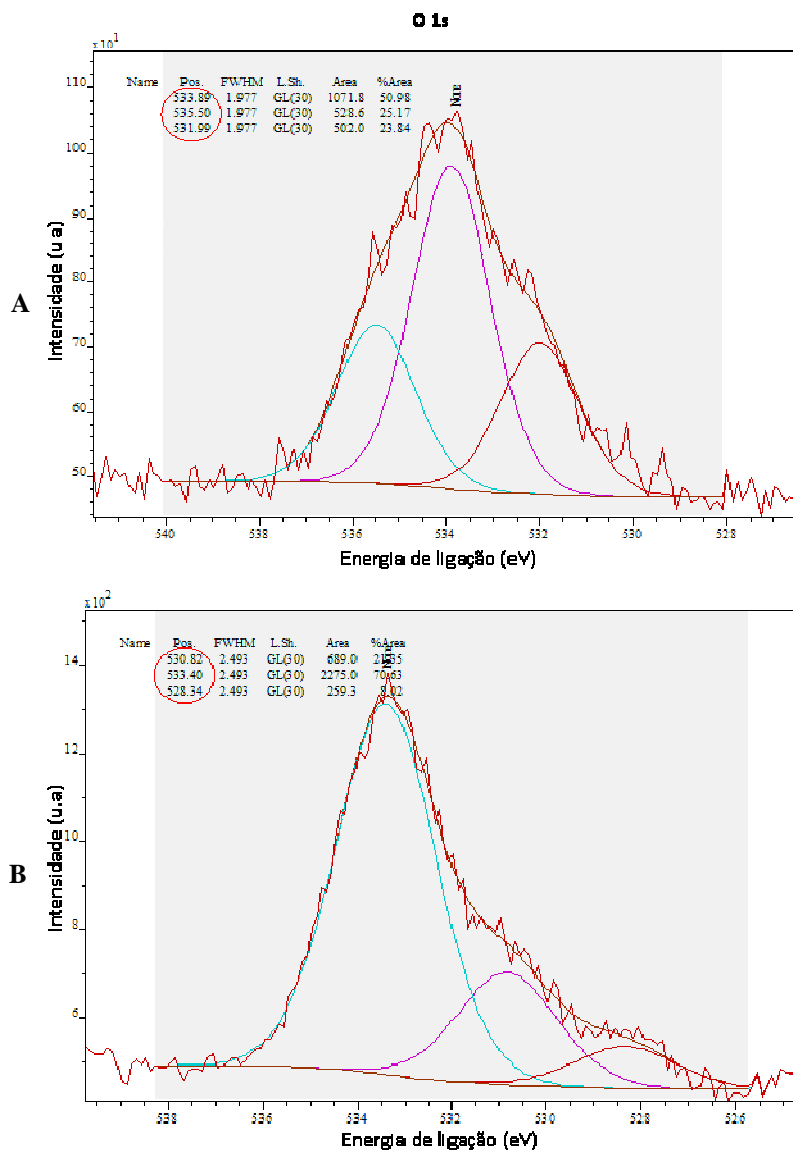
**Figura 5.13** ó Espectros de XPS do sinal do C<sub>1s</sub> dos filmes de PS não modificados (A) e modificados (B) por DBD.



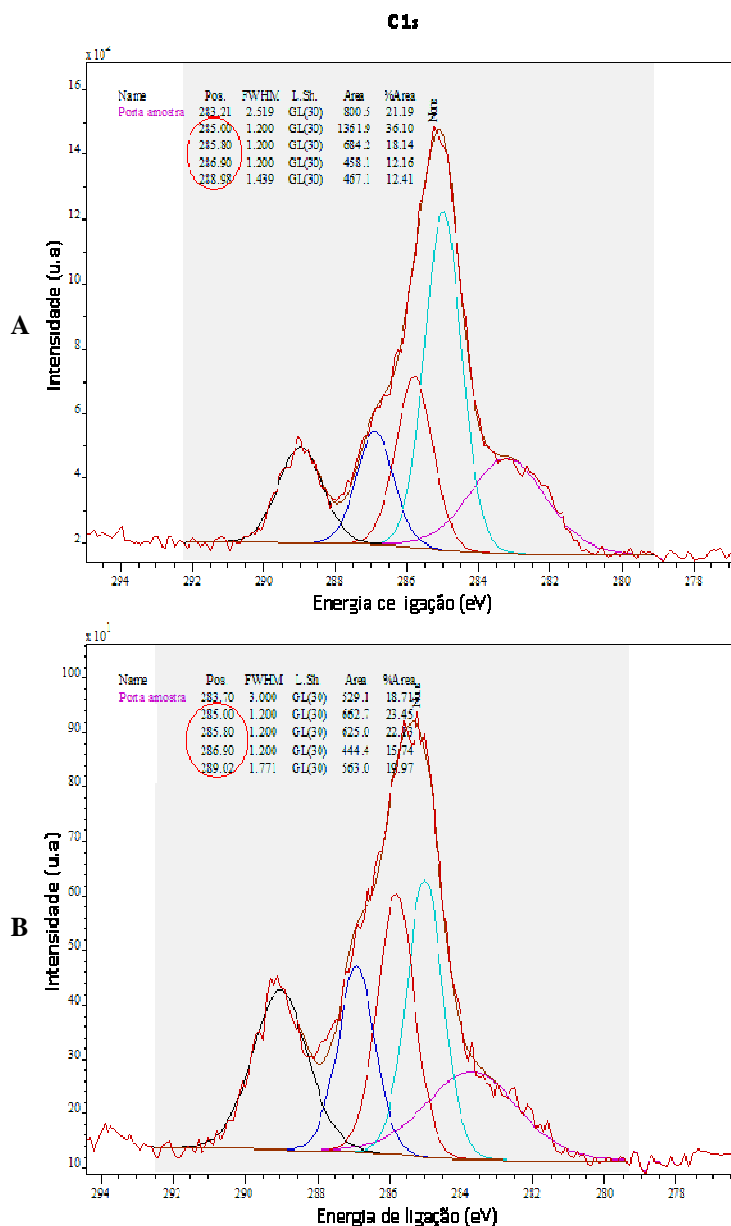
A Figura 5.14 mostra os espectros de XPS do sinal de oxigênio na região do orbital 1s ( $O_{1s}$ ) para os filmes de PS não modificados e modificados por DBD. O espectro de  $O_{1s}$  para o filme não modificado (Figura 5.14 A) apresentou dois picos já conhecidos na literatura (DøSA *et al.*, 2010), um correspondente à energia de ligação C=O em 532,0 eV, outro em 533,9 eV que corresponde à ligação O-C. No entanto, além dessas energias de ligação, o filme apresentou um pico em 535,5 eV, que é descrito na literatura (Qiu *et al.*, 1990; WAN-JUNG *et al.*, 2009) por se tratar de um tipo diferente de ligação com oxigênio, como oxigênio pertencente à forma ôquase molecularö, como por exemplo  $O_2^-$  ou oxigênio ligado a água (O- $H_2O$ ).

Assim como o espectro de  $O_{1s}$  para o filme de PS não modificado, o espectro de  $O_{1s}$  para o filme de PS depois da modificação (Figura 5.14 B) apresentou três picos, sendo um pico em 530,8 eV (C=O), um em 533,4 eV (O-C) e um último, de menor intensidade, em 528,3 eV. A literatura relata apenas que este pico está associado a superfícies oxidadas (Qiu *et al.*, 1990).

Os espectros de XPS do sinal do  $C_{1s}$  para o filme de PMMA antes do tratamento (Figura 5.15 A) apresentaram picos com energias de ligação de 285,0 eV, correspondentes às ligações alifáticas (C-C/C-H) presentes na estrutura do PMMA. Além desse pico, foi visualizado o aparecimento de contribuições de ligações de grupos oxigenados em 285,8 eV (C-C-O), 286,9 eV (C-O) e 289,0 eV (O=C-O). Essas ligações já eram esperadas, uma vez que o PMMA apresenta na sua estrutura química ligações com oxigênio através do grupamento éster, conforme mostrado na Figura 2.2. Após a modificação (Figura 5.15 B), não houve acréscimo ou exclusão de ligações e os valores de energia de ligação ficaram muito próximos aos não modificados, apresentando apenas um pequeno aumento no pico correspondente à porcentagem da ligação O=C-O.



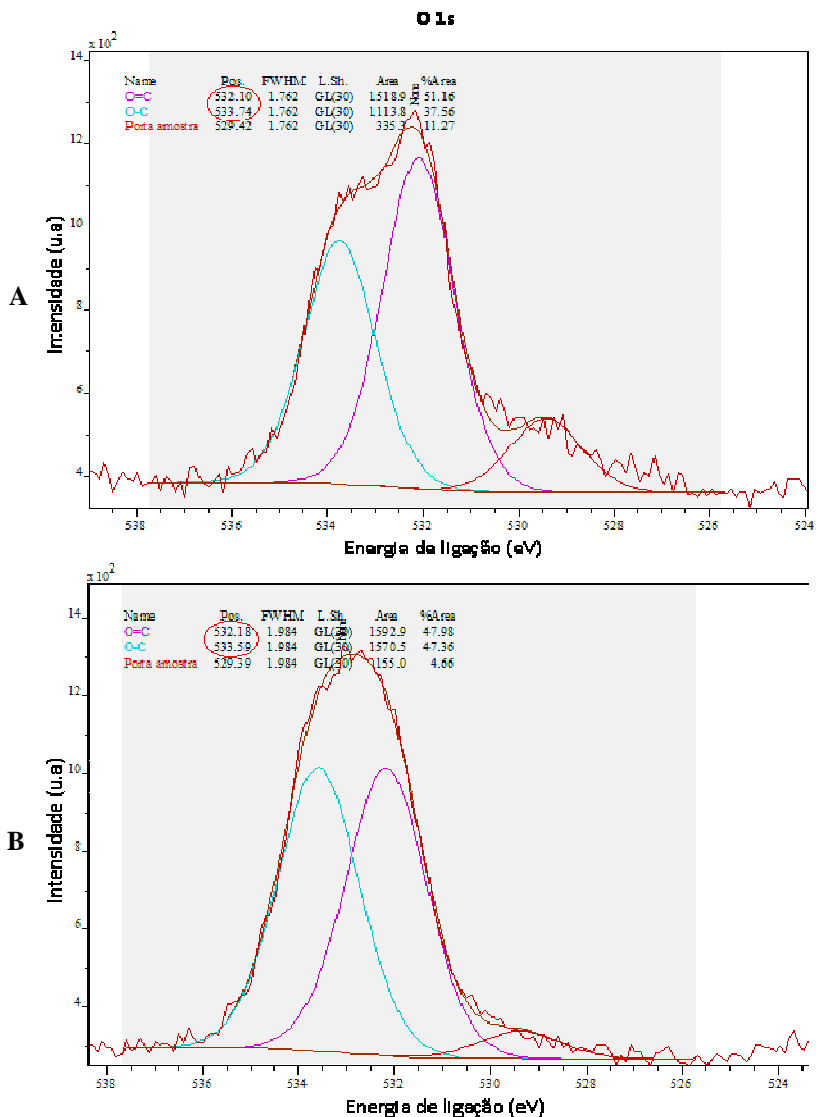
**Figura 5.14** ó Espectros de XPS do sinal do O<sub>1s</sub> dos filmes de PS não modificados (A) e modificados (B) por DBD.



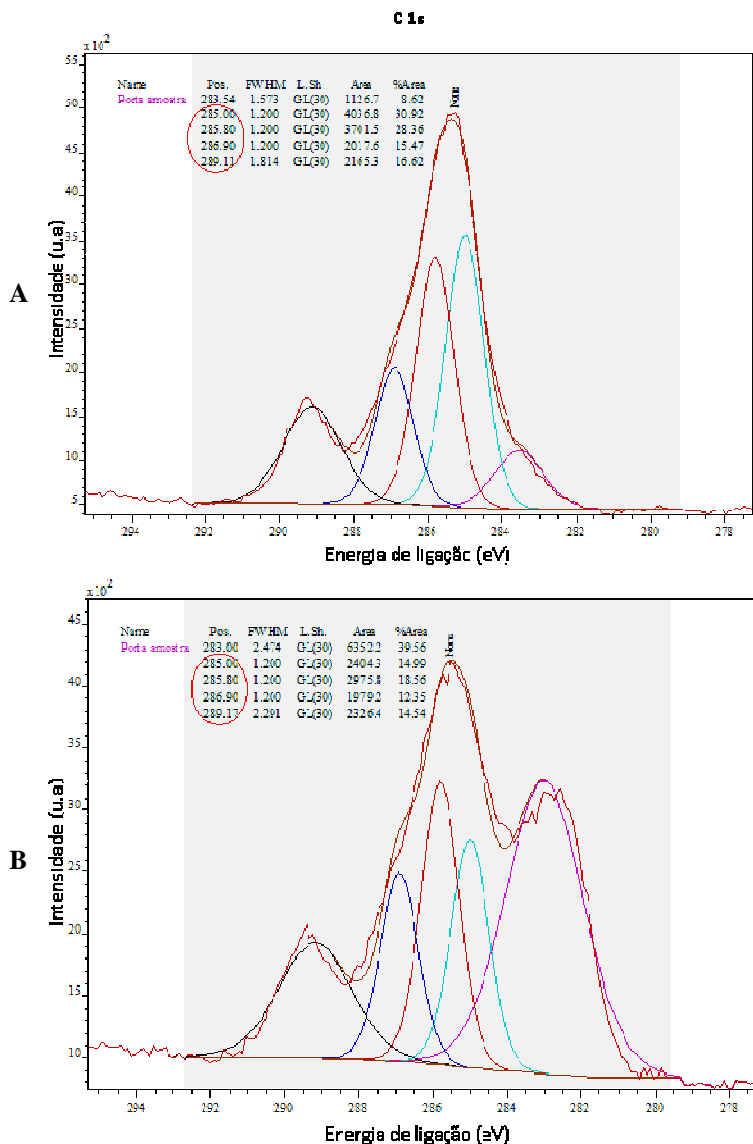
**Figura 5.15** ó Espectros de XPS do sinal do C<sub>1s</sub> dos filmes de PMMA não modificados (A) e modificados (B) por DBD.

Na análise de XPS, como mostram os espectros da Figura 5.16, correspondentes à região do orbital  $O_{1s}$  dos filmes de PMMA não modificados (Figura 5.16 A) e modificados (Figura 5.16 B) por DBD, dois picos de energia de ligação foram detectados. O primeiro pico corresponde à ligação C=O em 532,1 eV e o segundo correspondente à ligação O-C- em 533,6 eV. É importante ressaltar que esses dados estão de total acordo com os já relatados na literatura (DøSA *et al.*, 2010).

No caso do filme formado pela mistura dos dois polímeros antes do tratamento (Figura 5.17 A), o espectros de XPS do  $C_{1s}$  apresentou energias de ligação em 285,0 eV, 285,8 eV, 286,9 eV e 289,1 eV podendo ser atribuídas às mesmas ligações descritas anteriormente. Isso já era esperado, uma vez que neste filme estão presentes o PS e PMMA simultaneamente, devendo aparecer suas devidas ligações. Após a modificação (Figura 5.17 B), não houve alteração quanto às ligações químicas do filme de PS/PMMA 1:1 quando comparado ao não modificado.



**Figura 5.16** ó Espectros de XPS do sinal do O<sub>1s</sub> dos filmes de PMMA não modificados (A) e modificados (B) por DBD.

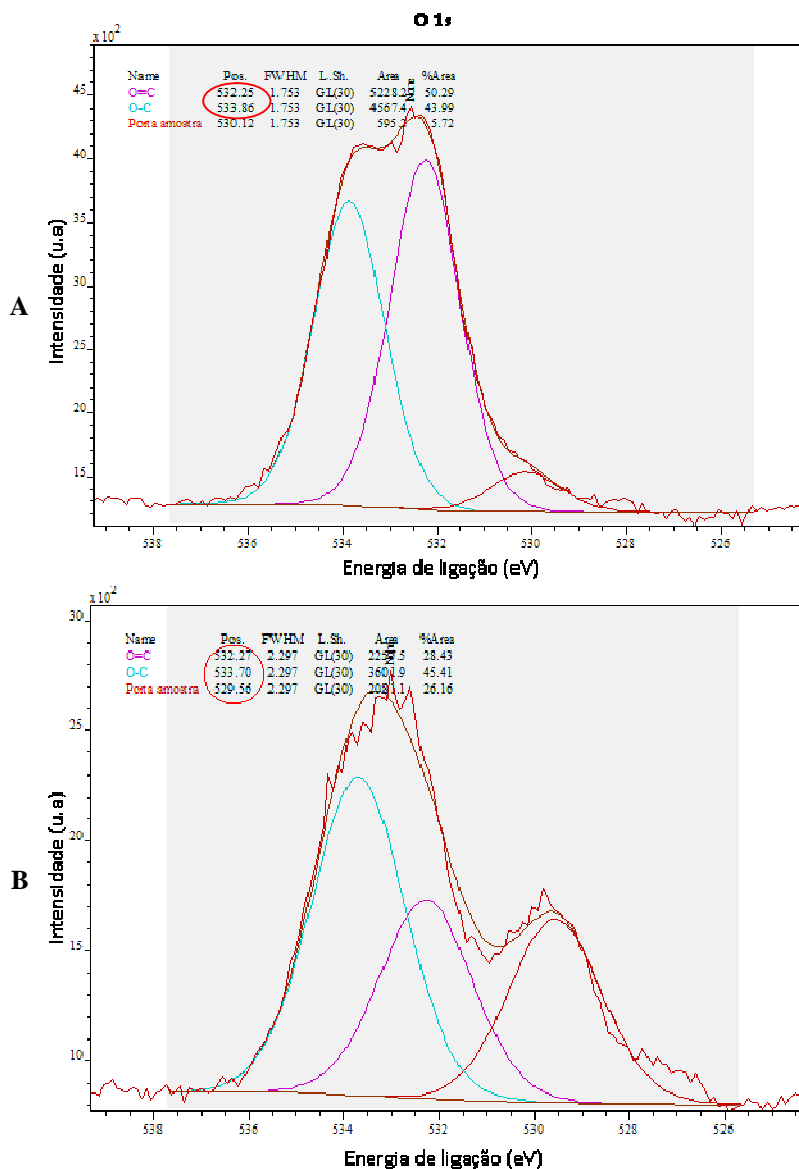


**Figura 5.17** ó Espectros de XPS do sinal do C<sub>1s</sub> dos filmes de PS/PMMA 1:1 não modificados (A) e modificados (B) por DBD.

Os espectros de XPS do  $O_{1s}$  para o filme de PS/PMMA 1:1 estão mostrados na Figura 5.18. Tanto antes do tratamento (Figura 5.18 A) quanto após (Figura 5.18 B), o filme apresentou dois picos em aproximadamente 532,3 e 533,8 eV, atribuídos às ligações C=O e O-C, respectivamente. Estas ligações também já foram visualizadas nos espectros de XPS do O 1s para os filmes de PS e PMMA antes e após a modificação.

Com o objetivo de avaliar o que acontece quimicamente na estrutura dos polímeros após a modificação e verificar se houve aumento da porcentagem de ligações com oxigênio após o tratamento, foram realizados cálculos das porcentagens de carbono e oxigênio presentes nos filmes estudados a partir dos espectros obtidos. Os espectros de Survey estão mostrados no Apêndice dessa tese e todos os valores correspondentes às porcentagens calculadas estão mostrados na Tabela 5.5.

O filme de PS antes do tratamento apresentou 54,2% de ligações C-C/C-H e após a modificação esse valor caiu para 36,2%. Como explicado anteriormente, mesmo antes da modificação, o filme de PS apresentou ligações com oxigênio e esse valor foi correspondente a 45,8%. Após a modificação essa porcentagem subiu para 59,5% apresentando um acréscimo de 13,7% nessas ligações.



**Figura 5.18** ó Espectros de XPS do sinal do O<sub>1s</sub> dos filmes de PS/PMMA 1:1 não modificados (A) e modificados (B) por DBD.



No que concerne a porcentagem atômica total de  $O_{1s}$  e  $C_{1s}$ , o filme antes do tratamento apresentou 16,2 e 83,8%, respectivamente. Após o tratamento os valores passaram para 20,2 e 79,8%. Com base nessas informações, pode-se sugerir a incorporação de grupos polares na superfície do PS após a modificação, favorecendo o aumento da molhabilidade obtida para este filme após o tratamento com oxigênio.

**Tabela 5.5** ó Valores percentuais de  $C_{1s}$  e  $O_{1s}$  obtidos no espectro de XPS para os filmes de PS, PS/PMMA 1:1 E PMMA antes e após a modificação.

Filmes	at (%)							
	O1s			C1s				
	Total	O=C	O-C	Total	C-H/C-C	C-O	C=O/ C-C-O	O-C=O
PS	16,2	23,9	60,0	83,8	54,2	26,7	11,3	7,80
PS/PMMA 1:1	20,3	57,4	46,6	79,7	33,9	16,9	31,0	18,1
PMMA	21,2	57,7	42,3	78,8	45,8	15,4	23,0	15,7
<sup>1</sup> PS	20,2	21,4	70,6	79,8	36,2	37,1	12,0	10,4
<sup>1</sup> PS/PMMA 1:1	23,6	38,5	61,5	76,4	24,8	20,4	30,7	24,0
<sup>1</sup> PMMA	27,9	50,3	49,3	72,1	28,9	19,4	27,2	17,7

<sup>1</sup>Filmes modificados.

No caso do PMMA não modificado a porcentagem obtida para a ligação C-C/C-H foi 45,8% e essa porcentagem diminuiu para 28,9% após a modificação. Além disso, as ligações com oxigênio passaram de 54,1 para 64,3% quando o filme foi tratado. Quanto às porcentagens atômicas do  $O_{1s}$  e  $C_{1s}$ , os valores também foram aumentados, passando de 21,2 para 27,9% e de 78,8 para 72,1%, respectivamente de PS. No filme de PS/PMMA 1:1, a diminuição no percentual das ligações alifáticas e aromáticas C-C/C-H foi de aproximadamente 9% após o tratamento. Um aumento semelhante ocorreu nas ligações com oxigênio. As porcentagens atômicas de  $O_{1s}$  e  $C_{1s}$  passaram de 20,3 para 23,6% e de 79,7 para 76,4%, respectivamente. Esse filme apresenta os dois polímeros unidos fisicamente entre si, então é evidente que seriam

observados alguns percentuais mais próximos do PS e outros do PMMA.

Com os resultados obtidos para a molhabilidade da superfície (incluindo medidas de energia de superfície) e os estudos de morfologia, topografia e as análises de XPS, é possível reforçar a explicação proposta anteriormente. A mudança que ocorre no filme de PS tem como origem as mudanças químicas da superfície (adição de grupos polares na estrutura), enquanto no filme de PMMA ocorre um aumento na rugosidade da superfície. Nos filmes formados pela mistura de PS e PMMA, a mudança após o tratamento pode ser explicada pela adição de grupos polares nos domínios da região inferior e aumento da rugosidade da superfície nos domínios da região superior do filme.

### **5.2.6. Adesão de células L-929**

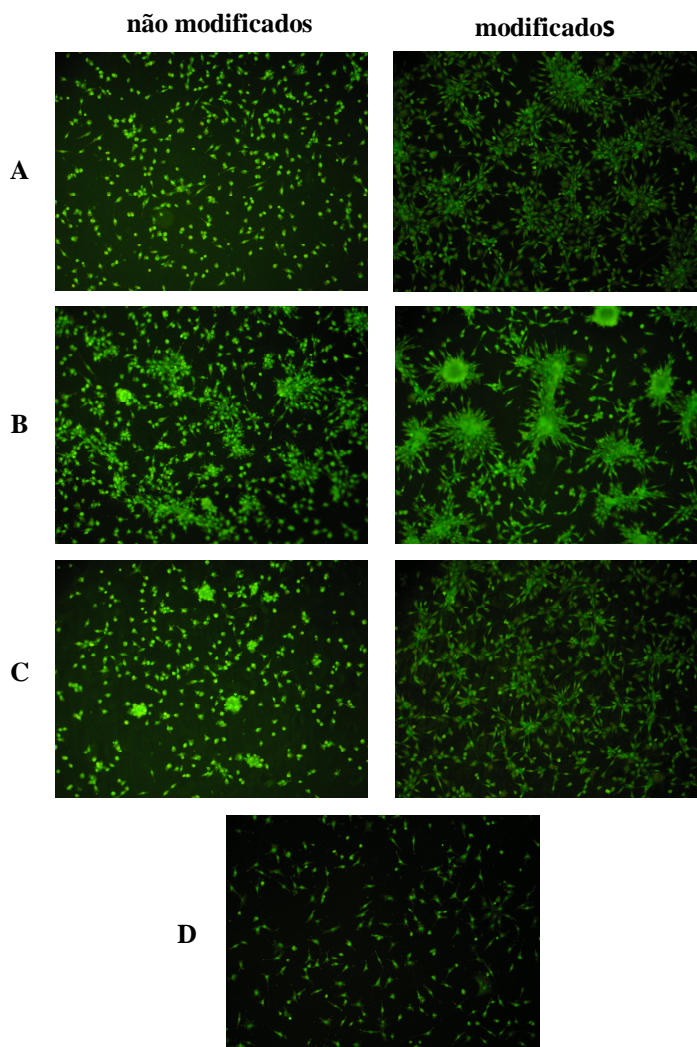
#### *5.2.6.1. Estudo de citotoxicidade in vitro*

A Figura 5.19 mostra as imagens de imunofluorescência obtidas a partir dos filmes antes e após a modificação.

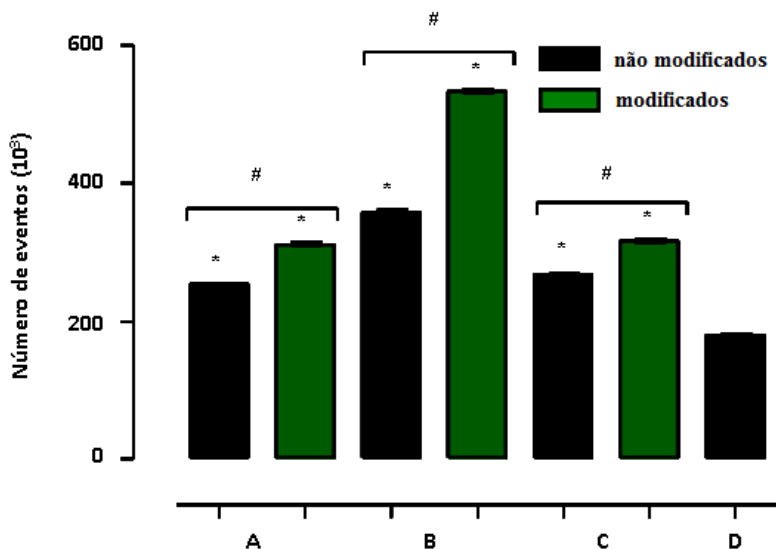
A análise das imagens permite a identificação de diferenças significativas no número de células aderidas à superfície dos filmes modificados. No entanto, com o intuito de confirmar a análise qualitativa, estudos quantitativos por citometria de fluxo foram realizados para mostrar a proliferação das células e avaliar a citotoxicidade dos filmes estudados. Os resultados do estudo quantitativo são mostrados na Figura 5.20, onde o número de eventos representa o número de células aderidas na superfície dos filmes.

O filme de PS modificado (Figura 5.20 A) apresentou  $5,7 \times 10^4$  células a mais quando comparado ao filme não modificado. Da mesma forma, o filme de PMMA (Figura 5.20 C) mostrou um aumento de  $4,8 \times 10^4$  células após o tratamento. Embora a diferença no número de células aderidas fosse menos pronunciada no filme de PMMA, o número total de células aderidas no filme de PMMA foi cerca de  $5 \times 10^3$  maior que no filme de PS modificado.

O filme com maior proliferação celular foi o filme formado pela mistura de PS e PMMA (Figura 5.20 B), resultando em  $1,7 \times 10^5$  células a mais quando comparado ao filme antes do tratamento. Além disso, o filme formado pela mistura dos dois polímeros apresentou  $3,5 \times 10^5$  células a mais quando comparado ao grupo controle, ou seja, a proliferação das células foi triplicada.



**Figura 5.19** ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) (antes e após a modificação) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. \*  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumento de 40x.

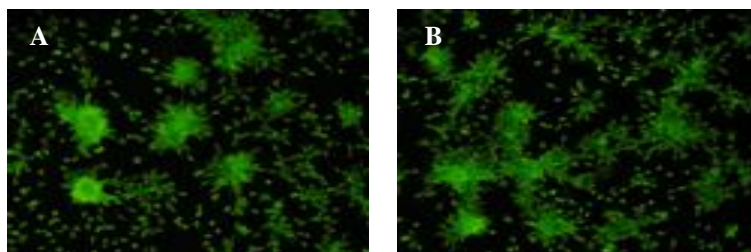


**Figura 5.20** ó Avaliação por citometria de fluxo com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) (antes e após a modificação) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. \*  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle e #  $P < 0,001$  comparado aos filmes não modificados, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni.

Conforme descrito na seção 5.2.3.2, este filme possui domínios os quais foram caracterizados como os da região superior e inferior do filme, com prevalência de PS na região inferior e PMMA na região superior.

A fim de examinar se existem locais preferenciais para a adesão celular nos filmes, a avaliação de imunofluorescência foi realizada separadamente para cada região dos domínios e essas imagens são mostrados na Figura 5.21, nomeadas como domínio de PS (Figura 5.21 A) e domínio de PMMA (Figura 5.21 B). A análise das imagens permite a visualização de adesão celular em ambas às regiões, com apenas um pequeno aumento na quantidade de células associadas aos domínios de PMMA. Isso já era esperado, uma vez que o número de células aderidas na superfície do filme de PMMA modificado foi ligeiramente superior que no filme de PS também tratado. Com base nesses resultados, conclui-se que as células L-929 mostraram uma ligeira preferência por

superfícies mais rugosas, uma vez que esta característica foi predominante no filme de PMMA.



**Figura 5.21** ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície do filme de PS/PMMA 1:1 modificado formado pelos domínios de PS (A) e pelos domínios de PMMA (B) após 24 h de cultura de células L-929. \*  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumento de 40x.

#### 5.2.6.2. Estudo da morfologia celular

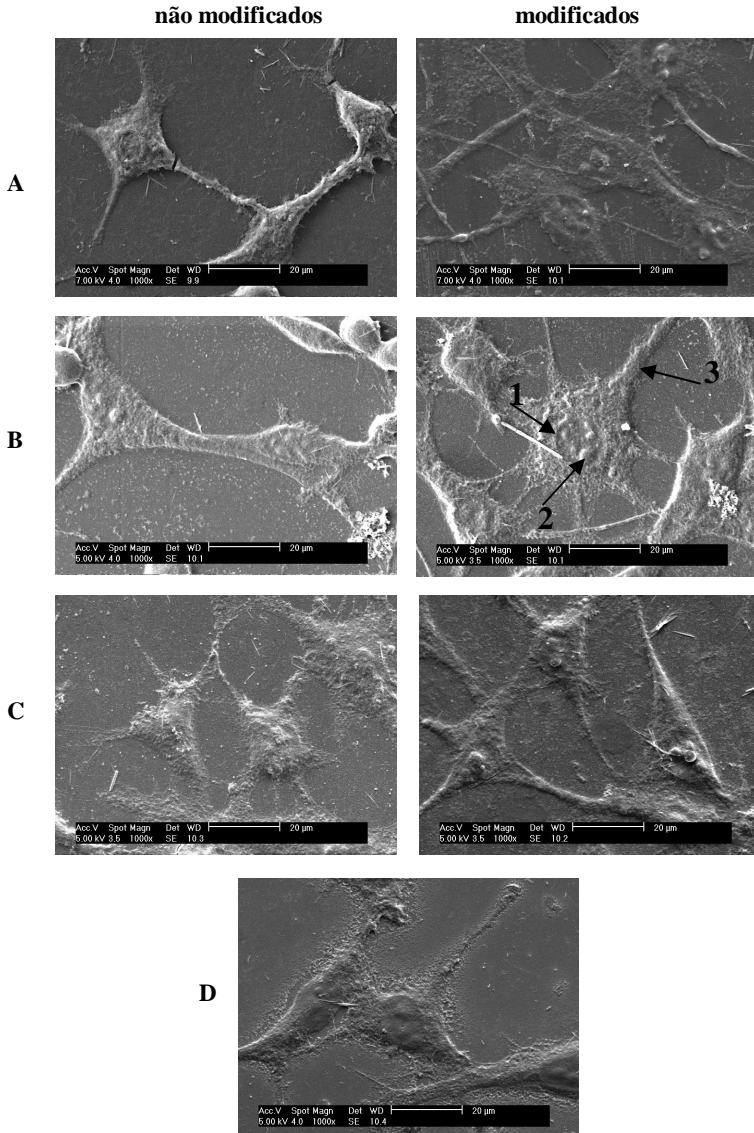
Informações detalhadas sobre a integridade da morfologia das células após a adesão nas superfícies poliméricas são necessárias. Tal avaliação foi realizada através da análise por SEM com alta ampliação (Figura 5.22), pois este é um método capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície e da estrutura das células (FRIEDMANN *et al.*, 2011).

A análise das células permitiu observar diferentes padrões de adesão celular para os filmes antes e após o tratamento. Nos filmes não modificados, as células apresentaram-se relativamente isoladas, com morfologia arredondada ou ligeiramente fusiforme. No entanto, nos filmes modificados, há células conectadas entre si através do citoplasma e a morfologia varia entre alongada e na forma de estrela. No filme PS/PMMA 1:1 (Figura 5.22 B), a morfologia estrelada foi predominante. As setas na Figura 5.22 B destacam o núcleo da célula com uma forma ovóide (1), bem como a presença de nucléolos (2) e expansão citoplasmática (3), que são características de células de fibroblastos ativos.

Alguns autores relatam o uso de imagens obtidas por SEM para estudar a morfologia dos fibroblastos aderidos em diferentes materiais (OU *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2010; FUJII *et al.*, 2009). De fato, a morfologia das células com a fácil identificação dos componentes

celulares foi satisfatoriamente observada neste trabalho, especialmente no filme da mistura dos dois polímeros.

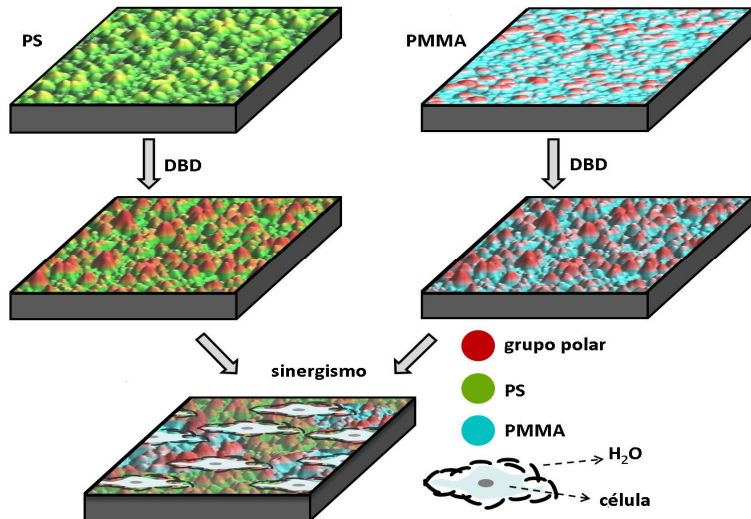
Em geral, a adesão de células nos filmes poliméricos foi mais eficiente que no controle, indicando a eficiência dos filmes investigados para induzir o processo de adesão e proliferação celular.



**Figura 5.22** ó Imagens obtidas por SEM das células L929 após 24 h de contato com os filmes de PS (A), PS/PMMA 1:1 (B), PMMA (C) (antes e após a modificação) e controle (D) ó aumento de 1000x.

### 5.2.7. Justificativa para a adesão celular ter sido mais eficiente no filme de PS/PMMA 1:1

O filme de PS tratado por DBD mostrou uma superfície mais hidrofílica quando comparado ao filme de PMMA que apresentou uma superfície mais rugosa após o tratamento. A hidrofilicidade e rugosidade superficial são fatores determinantes na melhora da adesão e proliferação celular. No entanto, o filme formado pelos dois polímeros mostrou ser mais eficiente sobre a proliferação celular, apesar de sua superfície ser menos hidrofílica quando comparado ao filme de PS e menos rugosa se comparado ao filme de PMMA. Uma explicação para este fato pode ser o efeito de sinergismo que está presente no filme formado pelas misturas dos dois polímeros, conforme esquematicamente representado na Figura 5.23. No mesmo filme, há um efeito concomitante de hidrofilicidade (maior energia de superfície) e rugosidade, o que induz de maneira significativa a adesão celular.



**Figura 5.23** é Mecanismo proposto para a eficiência do processo de adesão e proliferação celular na superfície do filme de PS/PMMA 1:1 modificado.



**CAPÍTULO 6**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**  
**FILMES DE ZEÍNA**



## CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Este capítulo descreve os resultados e discussões sobre filmes finos obtidos pelo processo de *spin coating* formados a partir da proteína de milho, zeína. A escolha desse polímero justifica-se pelo fato de se tratar de um polímero de origem natural, biodegradável e de baixo custo, o que favorece a aplicação como biomaterial. Além disso, não há estudos na literatura que mostram a modificação química da superfície da zeína por plasma frio com DBD, obtendo-se pela primeira vez a modificação superficial desse polímero por esse método com resultados satisfatórios, uma vez que a adesão de células L-929 foi favorecida após a modificação. Além da modificação por DBD, será demonstrada nesse capítulo a modificação por tratamento físico, através da adsorção da proteína de soro bovino (BSA), utilizada como fator de crescimento, sendo que a adesão celular também foi favorecida após o tratamento.

Publicação:

*Protein adhesion and cell response on atmospheric pressure dielectric barrier discharge-modified zein surfaces. (em preparação)*



## **6.1. Filmes não modificados e modificados por DBD**

### ***6.1.1. Planejamento experimental***

A fim de avaliar que tensão elétrica primária ( $v$ ) e tempo de tratamento ( $t$ ) levariam a bons resultados de modificação do filme de zeína, adotou-se um planejamento experimental.

O planejamento foi realizado com o intuito de obter como fator resposta uma análise quantitativa de células aderidas na superfície do filme. No entanto, as células se apresentaram fortemente aderidas aos filmes, o que impossibilitou a realização da análise quantitativa por citometria de fluxo, técnica esta que necessita da descolagem das células dos filmes para que, em suspensão, possam ser quantificadas. Desta forma, tornou-se inviável obter as superfícies de resposta utilizando o programa STATISTICA 6.0. Com base nessas informações, o planejamento experimental foi avaliado apenas pela visualização das imagens obtidas por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina e para cada experimento foi atribuído uma pontuação, conforme mostrado na Tabela 6.1.

Analisando a Tabela 6.1, pode-se perceber que os experimentos 1 e 2, cujas duplicatas correspondentes são os experimentos 12 e 13, respectivamente, foram os únicos que resultaram em pontuação máxima. Já no caso do experimento 4 (com duplicata 15), obteve-se a menor pontuação e este experimento corresponde ao filme com  $t$  de 0 min, ou seja, sem tratamento. Assim, com base nesses resultados e o intuito de manter as condições experimentais aplicadas o mais semelhante possível para cada amostra, uma  $v$  de 120 V e  $t = 1$  min (experimento 1) e 120 V com  $t = 10$  min (experimento 2) foram escolhidos como condições adequadas para os experimentos subsequentes com os filmes poliméricos de zeína, e foram aqui nomeados como tratamentos 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 6.1** ó Pontos atribuídos aos experimentos referentes ao planejamento experimental dos filmes de zeína, onde os pontos 1, 2 e 3 referem-se a pouca, média e excelente adesão celular, respectivamente.

<b>Experimentos/ duplicatas</b>	<b>Tensão elétrica primária (V)</b>	<b>Tempo de tratamento (min)</b>	<b>Pontos/pontos duplicatas</b>
<b>1/12</b>	120,0	1,000	<b>3/3</b>
<b>2/13</b>	120,0	10,00	<b>3/3</b>
3/14	220,0	1,000	2/3
4/15	220,0	10,00	3/1
5/16	99,00	5,500	1/2
6/17	240,0	5,500	2/1
<b>7/18</b>	170,0	0,000	<b>1/1</b>
8/19	170,0	12,00	3/2
9/20	170,0	5,500	2/1

### **6.1.2. Adesão de células L-929**

#### *6.1.2.1. Estudo de citotoxicidade in vitro*

A Figura 6.1 mostra as imagens de imunofluorescência obtidas a partir dos filmes antes e após serem submetidos ao tratamento por plasma.

Para os filmes de zeína, não foi possível utilizar lamínulas de vidro como grupo controle, uma vez que as placas de cultura utilizadas para este experimento foram de poços quadrados nas dimensões 3 x 3 cm, a mesma dimensão das placas de silício, não havendo possibilidade de utilizar as lamínulas nestes poços. Desta forma, além de análises realizadas com os filmes de zeína, foi também realizado o estudo de

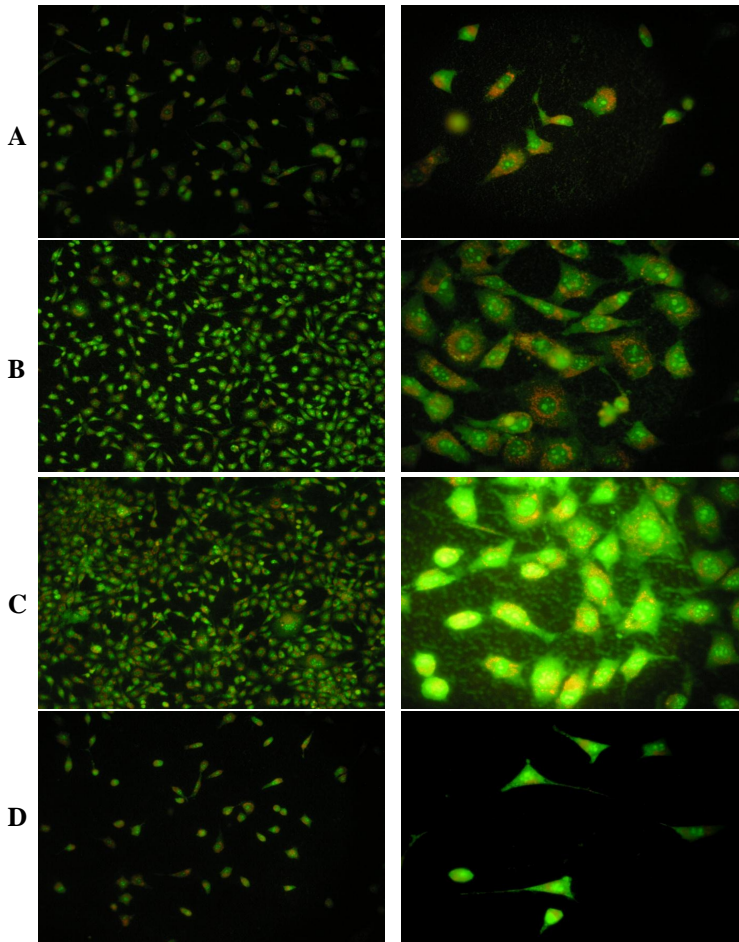
adesão celular sobre a placa de silício, para verificar se há alguma afinidade celular pela placa.

A análise das imagens permite a identificação de diferenças significativas no número de células aderidas à superfície dos filmes modificados.

A superfície do filme de zeína antes do tratamento (Figuras 6.1 A) apresentou pouca afinidade com as células L-929, sendo evidente que uma modificação superficial melhorou a adesão celular.

Os filmes submetidos aos tratamentos 1 (Figuras 6.1 B) e 2 (Figuras 6.1 C) mostraram maior eficiência no que concerne a adesão celular nas suas superfícies quando comparados as do filme de zeína sem o tratamento (Figura 6.1 A). Além disso, torna-se evidente que o filme submetido ao tratamento 2 (Figura 6.1 C), o qual difere do 1 (Figura 6.1 B) apenas pelo tempo de tratamento, apresentou uma quantidade de células aderidas superior aos filmes do tratamento 1. Desta forma, pode-se supor que submeter o filme por mais 9 min de tratamento melhora a adesão celular.

As Figuras 6.1 D (aumentos de 40 e 80x) mostram as imagens de imunofluorescência apenas para a placa de silício, sem sofrer qualquer tipo de modificação. Analisando as imagens pode-se verificar que não houve uma boa adesão celular na superfície da placa e essa adesão foi menos favorecida quando comparada aos filmes de zeína sem tratamento. Sendo assim, é possível afirmar que após a deposição do filme de zeína sobre a placa de silício, as células têm preferência pelo filme de zeína e não pelo substrato.



**Figura 6.16** Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de zeína antes (A), após os tratamentos 1 (B), 2 (C) e controle (D) após 24 h de cultura de células L-929. \*  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle, usando ANOVA seguido por teste t Bonferroni ó aumentos de 40x à esquerda e de 80x à direita.



De modo geral, esta análise permite afirmar que as células aderidas na superfície dos filmes não sofreram alterações morfológicas, pois analisando as imagens com aumento maior (80x), dispostas na coluna da direita, pode-se verificar a integridade da morfologia celular como descrito na seção 5.2.6.2. Isso mostra que os filmes de zeína não exercem efeitos citotóxicos para as células aderidas.

### **6.1.3. Caracterização da superfície**

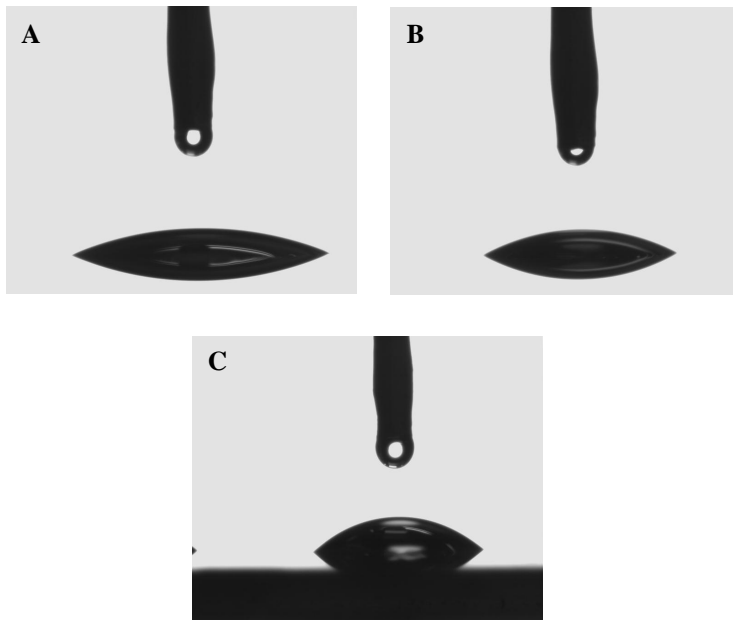
#### *6.1.3.1. Estudo de molhabilidade - Medidas de ângulo de contato*

Esta análise foi realizada com o propósito de avaliar se houve alteração na molhabilidade dos filmes de zeína após o tratamento por DBD.

O perfil das gotas de água na superfície dos filmes de zeína antes (Figura 6.2 A) e após os tratamentos por plasma (Figuras 6.2 B e C) está mostrado na Figura 6.2.

Para o filme de zeína não modificado, o ângulo de contato obtido foi de aproximadamente 22°, sendo a superfície do filme altamente hidrofílica. A princípio, este valor não era esperado, pois como citado na seção 2.1.2.1 a zeína apresenta caráter hidrofóbico, devido aos grupamentos apolares serem predominantes na sua estrutura. No entanto, é importante ressaltar que o substrato no qual foi depositado o filme de zeína apresenta uma fina camada de SiO<sub>2</sub> na superfície e nenhum tratamento foi realizado a fim de eliminá-la. Assim, existe uma grande possibilidade de ocorrer algum tipo de interação da zeína com o substrato. Como a zeína apresentou um ângulo de contato muito abaixo do esperado, é provável que os grupos apolares da zeína estejam interagindo com a placa de silício, deixando somente os grupos polares expostos na superfície, o que justificaria a grande molhabilidade observada.

Foram também realizadas medidas de ângulo de contato para a placa de silício, sem nenhum tratamento prévio. O substrato apresentou diferentes ângulos de contato, variando de 34° a 47°. Devido à variação dos ângulos, tornou-se inviável o cálculo do desvio padrão. Uma explicação plausível para estes valores é o fato de que quando a gota de água toca a superfície onde predomina o Si (apolar), o ângulo medido é maior do que quando a gota toca a superfície onde predomina o oxigênio (polar), por isso, a grande variação de desvio padrão.



**Figura 6.2** ó Imagens de gotas de água na superfície dos filmes de zeína antes (A) e após submetidos ao tratamento 1 (B) e 2 (C).

Após o tratamento 1, o ângulo medido foi de aproximadamente  $26^\circ$ , apresentando uma pequena variação de  $4^\circ$  quando comparado ao filme sem tratamento. Esta diferença foi mais significativa para o filme submetido ao tratamento 2, que apresentou um acréscimo de aproximadamente  $10^\circ$ . É evidente que o tratamento por plasma não proporcionou mudanças significativas na superfície do filme ou nos valores de ângulo de contato, quando o mesmo foi tratado durante 1 min. Já com a adição de 9 min pode-se supor que alguma modificação na superfície ocorreu. O planejamento experimental mostrou que as células preferem aderir em superfícies modificadas pelos tratamentos 1 e 2 quando comparadas às não modificadas.

A explicação para a eficiência celular no filme submetido ao tratamento 2 pode residir no aumento do valor de ângulo de contato, ou seja, devido ao aumento da hidrofobicidade da superfície. Conforme citado na seção 5.2.2.1, a adesão celular em superfícies com um balanço entre hidrofilicidade/hidrofobicidade é mais efetiva quando comparado a

superfícies totalmente hidrofílicas ou hidrofóbicas. Porém, vários fatores podem influenciar a adesão celular, tais como a rugosidade da superfície, que será discutida a seguir.

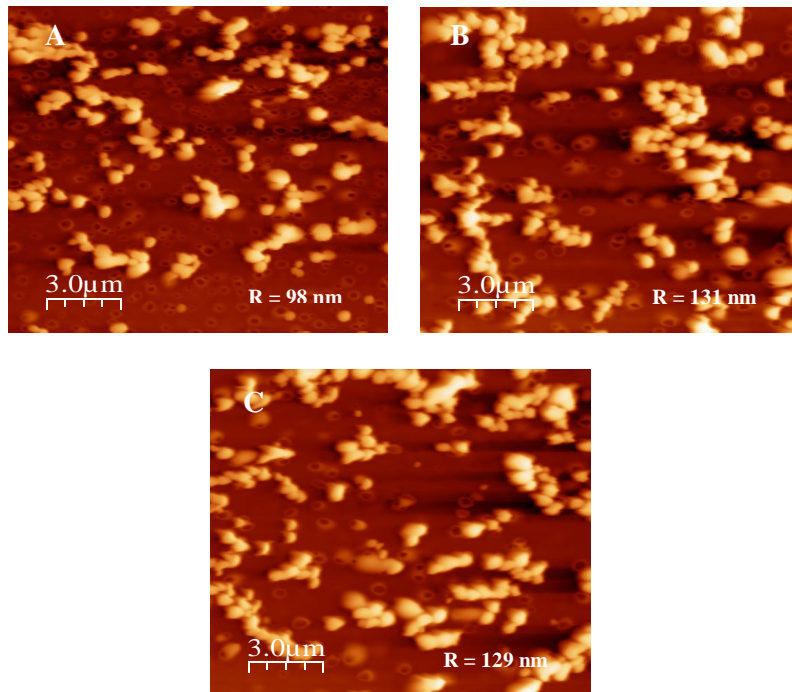
Assim como o filme submetido ao tratamento 2, o planejamento experimental também mostrou uma melhor adesão celular quando comparado ao filme não modificado. Neste caso, o fato do aumento do ângulo de contato ter sido muito pequeno, pode sugerir que a melhora na adesão celular tenha sido causada por outros fatores e não pelo aumento da hidrofobicidade, como no tratamento 1.

#### *6.1.3.2. Estudo de topografia - Microscopia de força atômica (AFM)*

A Figura 6.3 mostra as imagens de AFM dos filmes de zeína antes (Figura 6.3 A) e após a modificação (Figuras 6.3 B e C) e os valores de R.

Todos os filmes apresentaram superfícies rugosas. No entanto, após o tratamento por plasma houve um aumento de rugosidade. O filme de zeína antes do tratamento (Figura 6.3 A) apresentou  $R = 98$  nm. Quando submetido ao tratamento 1 (Figura 6.3 B), a rugosidade aumentou para 131 nm. No caso do filme submetido ao tratamento 2 (Figura 6.3 C), o valor de  $R = 129$  nm. Analisando estes valores, pode-se perceber que não há diferença no valor de R dos filmes submetidos a tratamento por tempos superiores a 1 min, ou seja, deixar o filme sob tratamento durante 1 ou 10 minutos não interfere na rugosidade da superfície.

As análises de AFM sugerem que a preferência das células pelos filmes após o tratamento 1 está relacionado apenas ao aumento da rugosidade de superfície. Já no caso do filme submetido ao tratamento 2, a eficiência da adesão celular pode estar relacionada tanto com a molhabilidade quanto com a topografia da superfície, o que proporciona, desta forma, um efeito sinérgico. O mesmo fato foi descrito no capítulo 5 para o filme de PS/PMMA 1:1. Além disso, como citado na seção 5.2.4.1, estudos mostram que superfícies mais rugosas favorecem a adesão e proliferação celular (WOODCOCK *et al.*, 2005; SHIN, 2007).



**Figura 6.3** ó Imagens topográficas obtidas por AFM ( $15,0 \times 15,0$ )  $\mu\text{m}^2$  da superfície dos filmes de zeína antes (A) e após submetidos ao tratamento 1 (B) e 2 (C). A escala de altura foi normalizada para uma melhor observação da superfície e R mostra a rugosidade da superfície.

#### 6.1.4. Adsorção de albumina de soro bovino (BSA)

##### 6.1.4.1. Estudo de citotoxicidade *in vitro*

Além da modificação química da superfície realizada através dos tratamentos por plasma com DBD, as superfícies dos filmes de zeína também foram modificadas fisicamente, através da adsorção de um fator de crescimento utilizado na cultura celular, a albumina de soro bovino (BSA).

Como citado na seção 2.2, as proteínas ligadas à superfície do biomaterial têm o intuito de orientar e organizar a adesão celular na interface célula-biomaterial e, assim, promover o processo de migração, diferenciação e crescimento celular tecidual.

A interação da proteína na superfície do biomaterial pode ocorrer de diversas maneiras; no entanto, a adsorção por interação eletrostática tem se mostrado mais eficiente, por se tratar de um processo rápido e simples (DøSA *et al.*, 2010).

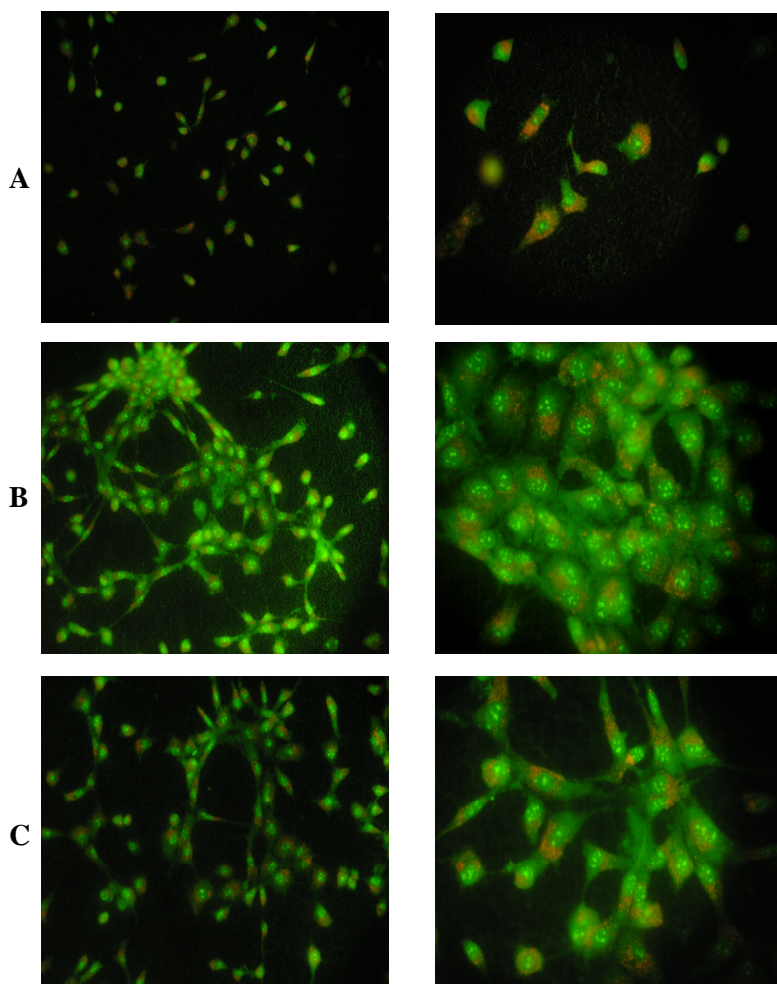
A zeína apresenta ponto isoelétrico (pI) na faixa de 6,2 (PATEL *et al.*, 2010). O pI de uma proteína nada mais é do que o valor de pH onde as proteínas apresentam carga elétrica líquida igual a zero. O solvente utilizado para solubilizar a zeína foi etanol/água na composição 85/15, O pH da solução medido foi de 5,2. Isso permite concluir que a zeína estava presente em um pH inferior ao do seu pI, apresentando dessa maneira, carga residual positiva. No caso da BSA, o pI está na faixa de 5,1 (GERBERDING & BYERS, 1998) e sua dissolução foi realizada em PBS (pH = 7,4). Sendo assim, a BSA apresenta carga residual negativa. Com base nessas informações, pode-se inferir que a adsorção da BSA na superfície de zeína ocorreu por interação eletrostática.

A Figura 6.4 mostra as imagens obtidas por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina dos filmes de zeína antes e após a adsorção da albumina. Além dessa análise, foi também realizada a adsorção de albumina na superfície de zeína, após o filme ter sido submetido ao tratamento por plasma. No entanto, para a adsorção de albumina na superfície de zeína após o tratamento por plasma, ainda não foi realizado planejamento experimental. Para as análises com o tratamento mostradas na Figura 6.4, os parâmetros de plasma foram:  $v = 250$  V e  $t = 10$  min.

Analisando as imagens, pode-se perceber uma diferença significativa na adesão celular antes (Figura 6.4 A) e após (Figuras 6.4 B e C) a adsorção de BSA na superfície do filme de zeína. É importante salientar que a modificação por plasma antes da adsorção de BSA (Figura 6.4 C) não favoreceu a adesão das células L-929 quando comparado ao filme de zeína com adsorção de BSA sem o tratamento (Figura 6.4 B). Porém, a adesão celular foi favorecida após a adsorção da BSA tanto antes quanto após o tratamento por plasma, quando comparado ao filme de zeína sem BSA. Uma explicação para após o tratamento a adsorção de albumina não ter sido igualmente eficiente quando comparado ao filme não exposto ao plasma reside no fato que o plasma é capaz de modificar a superfície do polímero e, possivelmente,

alguns grupos modificados não ficaram disponíveis para realizar a interação eletrostática com a BSA. Para confirmar esta suposição, análises de ângulo de contato em água, bem como análise por AFM estão sendo conduzidas.

De maneira geral, tanto a modificação química por plasma, mostrada anteriormente, quanto a modificação por adsorção de BSA na superfície dos filmes de zeína foram de grande valia, pois representaram mudanças significativas frente à adesão celular e integridade morfológica das células. Porém, é de suma importância realizar a adsorção de albumina após ter submetido o filme ao tratamento de plasma conforme experimentos 1 e 2 realizados no planejamento experimental. Somente assim será possível sugerir qual o melhor método de modificação para o filme estudado.



**Figura 6.4** ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de zeína antes (A), após a adsorção de BSA (B) e após tratamento por plasma e adsorção de BSA (C) após 24 h de cultura de células L-929 - aumentos de 40x à esquerda e de 80x à direita.





**CAPÍTULO 7**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**  
**FILMES DE PS-*b*-PAA**



## CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Este capítulo está destinado aos resultados e discussões relativos a um estudo preliminar dos filmes finos obtidos pelo processo de *spin coating* formados a partir de dois copolímeros diblocos, ambos formados por poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA), diferenciando apenas na massa molar de cada bloco. A escolha desse copolímero como biomaterial está no fato de esse polímero poder se organizar em nanoestruturas, formando assim, um filme fino nanoestruturado. Na área de biomateriais seria interessante testar esse material, uma vez que muitas vezes imitam as características físicas da matriz extracelular (ECM) em escala nanométrica. Assim como nos demais polímeros testados, os copolímeros terão suas superfícies modificadas por plasma e será avaliada a eficiência da adesão de células L-929 antes e após o tratamento.

Publicação:

*Poliestireno-**b**-poli(ácido acrílico) surface films unmodified and modified by non thermal plasma as new substrate for cell adhesion. (em preparação)*



## 7.1. Formação de nanoestruturas

O copolímero em bloco PS<sub>n</sub>-*b*-PAA<sub>m</sub> (PS<sub>115</sub>-*b*-PAA<sub>15</sub> e PS<sub>183</sub>-*b*-PAA<sub>19</sub>, denominados C1 e C2, respectivamente) utilizado para a preparação dos filmes está representado na Figura 2.6. As frações relativas em volume, *f*, calculadas para o bloco PAA foram de 0,11 e 0,09 para os copolímeros C1 e C2, respectivamente. Os cálculos foram feitos baseados nos valores de massa molar numérica média e densidade de cada bloco.

Como descrito na seção 2.1.3, a característica principal do copolímero em bloco é de sofrer separação de fase em escala nanométrica. Então, além de filmes finos os filmes dos copolímeros de PS-*b*-PAA podem também ser chamados de filmes nanoestruturados. Além do copolímero em bloco poder formar nanoestruturas, outra propriedade importante consiste na possibilidade de apresentar domínios organizados, sob determinadas condições. Este fenômeno pode ser possível com o aumento da temperatura, pois o aquecimento é capaz de proporcionar um aumento da mobilidade da cadeia, facilitando a organização dos domínios. Após a organização, os domínios podem formar estruturas regulares, como linhas, quando se tem aproximadamente 50% de cada bloco; cilindros de um bloco dispersos na matriz de outro, quando se tem entre 20 e 40% de um bloco em relação ao outro e esferas de um bloco disperso no outro, em geral quando se tem entre 10 a 20% de um bloco. Conforme supracitado, os copolímeros de C1 e C2 apresentam 10% de um bloco (relacionado à massa molar) quando comparado a outro, então, caso o filme tivesse sido submetido ao aquecimento, esperava-se que os blocos estariam organizados na forma de esferas. No entanto, esta organização não foi induzida neste trabalho, pois não seria interessante uma estrutura totalmente organizada para promover a adesão de células na superfície dos filmes poliméricos. Esse fato foi explorado nos filmes de PS e PMMA após ser comparada a efetividade da adesão das células L-929 na superfície dos filmes de PS-*b*-PMMA, com a adesão celular na superfície do filme formado apenas pela mistura física dos dois polímeros, no qual o filme forma macrodomínios totalmente desorganizados (MELO *et al.*, 2009).

## **7.2. Filmes não modificados e modificados por DBD**

### **7.2.1. Caracterização de superfície**

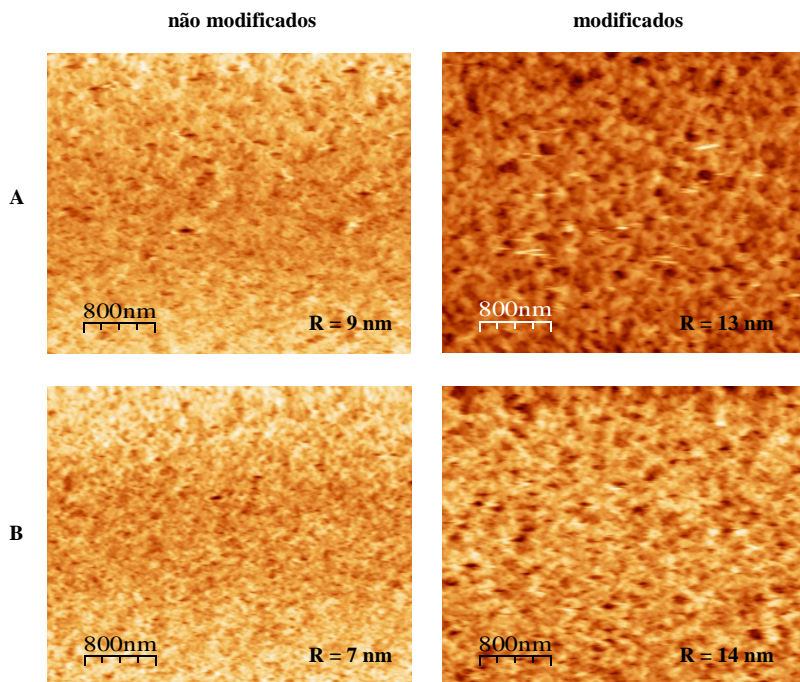
#### *7.2.1.1. Estudo de topografia ó Microscopia de força atômica (AFM)*

Assim como os filmes de zeína após a adsorção da BSA, os filmes formados pelos copolímeros C1 e C2 não foram submetidos a experimentos programados por planejamento experimental. Sendo assim, serão utilizados os mesmos parâmetros do reator DBD que foram utilizados para os filmes da proteína ( $v = 250$  V e  $t = 10$  min).

A análise por AFM foi realizada para verificar possível aumento nos valores de R após a modificação da superfície por plasma frio. As imagens obtidas por AFM estão mostradas na Figura 7.1.

Os filmes antes do tratamento apresentaram superfícies rugosas, com valores de R = 9 nm e 7 nm, respectivamente.

Após a modificação da superfície por DBD, tanto o copolímero C1 (Figura 7.1 A), quanto o C2 (Figura 7.1 B), apresentaram superfícies mais rugosas quando comparados aos copolímeros não modificados. Esta diferença nos valores de R foi mais significativa para o copolímero C2, que apresentou um aumento de 100%.



**Figura 7.1** ó Imagens topográficas obtidas por AFM ( $4,0 \times 4,0$ )  $\mu\text{m}^2$  da superfície dos filmes de copolímeros C1 (A) e C2 (B) antes e após a modificação. A escala de altura foi normalizada para uma melhor observação da superfície e R mostra a rugosidade da superfície.

Analisando as imagens acima, é possível perceber que o tratamento por plasma corrobora com o aumento de rugosidade da superfície dos copolímeros estudados. Apesar de não terem sido realizados até o momento estudos de molhabilidade da superfície, é possível que o aumento da rugosidade favoreça a adesão e proliferação celular nos copolímeros C1 e C2.

### 7.2.2. Adesão de células L-929

#### 7.2.2.1. Estudo de citotoxicidade *in vitro*

Com o propósito de avaliar se os copolímeros C1 e C2 apresentam superfícies adequadas para adesão das células L-929 e se

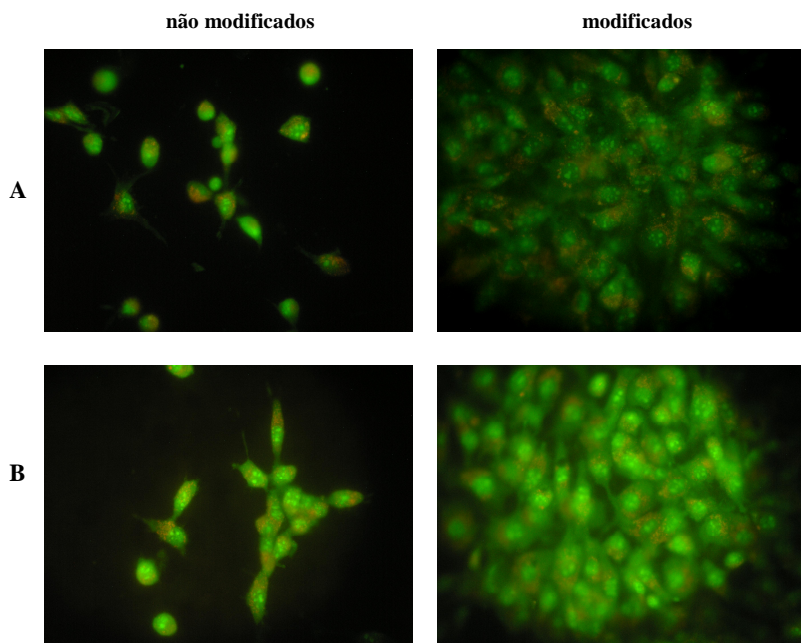
após a modificação os mesmos tornam-se mais propícios à adesão celular, foram realizadas análises por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina e as imagens obtidas antes e após o tratamento estão mostradas na Figura 7.2

Assim como os filmes de zeína, para os filmes dos copolímeros também não foram utilizadas lamínulas de vidro como grupo controle, pelo mesmo motivo descrito na seção 6.1.2.1.

A Figura 7.2 A mostra as imagens de imunofluorescência para o copolímero C1 antes e após o tratamento. Antes da modificação da superfície por DBD, o copolímero C1 não apresentou uma resposta satisfatória frente à adesão de células L-929. Após a modificação, a eficiência celular foi significativamente melhor. O mesmo aconteceu com o copolímero C2 (Figura 7.2 B), no qual é visualmente detectável o maior número de células aderidas quando comparado ao filme de C2 não tratado.

Unindo esses resultados com os de AFM, pode-se sugerir que a melhora na adesão das células está associada ao aumento significativo na rugosidade da superfície dos copolímeros após o tratamento. O aumento da rugosidade foi ligeiramente maior no copolímero C2 e o mesmo pode-se observar frente à adesão celular, resultando em um número superior de células aderidas neste copolímero.





**Figura 7.2** ó Avaliação por microscopia de imunofluorescência com laranja de acridina de adesão e proliferação celular na superfície de filmes de copolímeros C1 (A) e C2 (B) antes e após a modificação - aumentos de 80x.

Como citado anteriormente, para estes copolímeros foi realizado apenas um estudo preliminar, o que impossibilita afirmar se o copolímero C2 é realmente mais eficiente na adesão celular quando comparado ao C1. Porém, de maneira geral, pode-se afirmar que o tratamento por plasma foi eficiente para os dois copolímeros estudados o que possibilita a continuação do trabalho com a realização de análises complementares, tais como, estudo de molhabilidade de superfície e citotoxicidade.



**CAPÍTULO 8**  
**CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**  
**FUTURAS**



## **8.1. Conclusões**

A capacidade de filmes poliméricos com superfícies hidrofóbicas produzidos a partir de PS e PMMA de promoverem a adesão e proliferação de células de fibroblastos L-929 foi mostrada neste trabalho. A melhor resposta, em relação à adesão celular foi obtida através da mistura física dos dois polímeros. A modificação da superfície dos filmes de PS e PMMA utilizando um reator com DBD tornou-se mais eficaz quando determinados os melhores parâmetros (vazão e tempo de tratamento) operacionais do reator, proporcionando superfícies mais hidrofílicas quando comparado aos filmes não modificados. No entanto, a maior molhabilidade da superfície foi obtida para o filme de PS. Incorporação de grupos polares na superfície do filme de PS e modificação na topografia da superfície do filme de PMMA foram consequências da modificação superficial e fatores determinantes para melhorar a adesão e proliferação celular na superfície desses filmes. Após a modificação, o filme de PMMA apresentou maior adesão de células quando comparado ao filme de PS. Desta forma, é evidente que as células L-929 preferem aderir em uma superfície mais rugosa do que em uma superfície mais hidrofílica. No entanto, o filme de PS/PMMA 1:1 proporcionou os melhores resultados, sugerindo que o efeito sinérgico é favorável para a adesão e proliferação celular. Em suma, o filme de PS/PMMA 1:1 pode ser utilizado como um substrato para muitas aplicações biológicas.

Em um segundo momento, filmes finos a partir de um polímero natural, a zeína, tiveram a sua superfície modificada pelo sistema de plasma. Após a modificação superficial, superfícies ligeiramente mais hidrofóbicas foram observadas. O estudo de molhabilidade de superfície dos filmes mostrou a ocorrência de uma interação de zeína com a placa de silício, o que proporcionou uma superfície totalmente molhável para este filme. Após a modificação, o filme de zeína apresentou maior adesão de células quando comparado ao filme não modificado. A morfologia característica de fibroblastos também pôde ser observada para os filmes de zeína, mostrando que a integridade celular foi mantida. Tanto a modificação química por plasma, quanto a modificação física através da adsorção de BSA na superfície dos filmes de zeína, resultou em melhora significativa frente à adesão celular. Avaliando os resultados obtidos pode-se sugerir que o filme de zeína possa ter aplicabilidade como biomaterial na engenharia de tecido, uma vez que este filme foi formado a partir de um polímero natural, de baixo custo e biodegradável, possibilitando assim diversas aplicações na área médica.

Finalmente, filmes finos nanoestruturados formados a partir de blocos de PS e PAA tiveram suas superfícies modificadas por plasma com DBD e, após o tratamento, os copolímeros C1 e C2 apresentaram uma melhora significativa quanto à adesão de células fibroblásticas, com favorecimento do copolímero C2.

A técnica de modificação da superfície por plasma frio com DBD proporcionou, em todos os sistemas estudados, modificação de superfície extremamente eficaz para suportar a adesão e proliferação celular. De maneira similar, a modificação de superfície por adsorção de BSA na superfície de filmes de zeína também resultou em uma superfície mais adequada para o crescimento celular.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que todos os sistemas investigados podem ser classificados como bons candidatos para serem utilizados como biomaterial, uma vez que além da forte interação célula-substrato, os testes *in vitro* indicaram que os substratos não apresentam citotoxicidade.

## 8.2. Perspectivas Futuras

No que diz respeito aos filmes de PS e PMMA, pretende-se ainda realizar testes *in vivo*, através da aplicação dos filmes em camundongos.

No caso do segundo sistema (filmes de zeína), tem-se como meta futura, aprofundar os estudos de caracterização de superfície dos filmes a fim de concluir qual o tipo de interação que está ocorrendo entre o filme e o substrato (placa de silício). A partir deste estudo, pode-se realizar um tratamento da placa a fim de eliminar a camada de SiO<sub>2</sub> da superfície ou, até mesmo, substituir os grupamentos contendo átomos de oxigênios por outros grupos, utilizando a própria técnica de plasma descrita neste trabalho. Pretende-se também realizar um planejamento experimental após adsorver o fator de crescimento BSA nos filmes e realizar a caracterização superficial do filme após a adsorção. Além disso, pretende-se desenvolver um método capaz de quantificar o número de células aderidas no filme e finalmente pretende-se testar outros tipos celulares, tais como as células de melanoma B16F10 para futura incorporação de princípios ativos nos filmes, promovendo apoptose neste tipo celular.

Seria igualmente interessante aprimorar os estudos dos filmes nanoestruturados formados pelos copolímeros em blocos C1 e C2, incluindo caracterização superficial e estudos mais detalhados quanto à capacidade de aderir e proliferar células fibroblásticas.

Como provável maior desafio, pretende-se aderir e proliferar células de cordão umbilical na superfície dos filmes para aplicação no tratamento de leucemia, um trabalho já em andamento e com boas perspectivas quanto aos resultados.





## **CAPÍTULO 9**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



ABETZ, V. **Block Copolymers I: Advances in Polymer Science**. Springer, Germany, 2005.

ADAMSON, W. A. **Physical Chemistry of surfaces**. John Wiley & Sons, 1990.

ALAERTS, J. A.; DE CUPERE, V. M.; MOSER, S.; VAN DER BOSH DE AGUILAR, P.; ROUXHET, P. G. Surface characterization of poly(methyl methacrylate) microgrooved for contact guidance of mammalian cells. **Biomaterials**, v. 22, p. 1635-1642, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Science, New York, 2002.

AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A. Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido ó estado atual. **Pesquisa odontológica brasileira**, v. 15, p. 166-173, 2001.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667-681, 2000.

ARGOS, P.; PEDERSON, K.; MARKS, M. D.; LARKINS, B. A. Structure model for maize zein proteins. **Journal Biological Chemistry**, v. 257, p. 9984-9990, 1982.

ARIMA, Y.; IWATA, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. **Biomaterials**, v. 28, p. 3074-3082, 2007.

ARTZI, N.; ZEIGER, A.; BOEHNING, F.; RAMOS, Ab.; VLIET, K.V.; Edelman, E. R. Tuning adhesion failure strength for tissue-specific applications. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 67-74, 2011.

ATHANASIOU, K. A.; AGRAWAL, C. M.; BARBER, F. A.; BURKHART, S. S. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopy and Related Surgery**, v. 14, p. 726-737, 1998.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 13-21, 2005.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Effect of salt leaching on PLGA(50/50) resorbable scaffolds. **Materials Research**, v. 11, p. 75-80, 2008.

BISWAS, A.; SELLING, G. W.; WOODS, K. K.; EVANS, K. Surface modification of zein films. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 168-171, 2009.

BRYDSON, J. A. **Plastics Materials**. London: Butterworth-Heinemann, 1999.

BUTT, H. J.; GRAF, K.; KAPPL, M. **Physics and chemistry of interfaces**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2003.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2002.

CAVICCHI, K. A.; BERTHIAUME, K. J.; RUSSELL, T. P. Solvent Annealing Thin Films of Poly(isoprene-b-lactide). **Polymer**, v. 46, p. 11635-11639, 2005.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHEN, C-C.; CHUEH, J-Y.; TSENG, H.; HUANG, H-M.; LEE, S-Y. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. **Biomaterials**, v. 24, p. 1167-1173, 2003.

CHENG, N.; CAO, X. Photoactive SAM surface for control of cell attachment. **Journal Colloid surface Science**, v. 348, p. 71-79, 2010.

CHO, S.Y.; LEE, S.Y.; RHEE, C. Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1234-1239, 2010.

CHU, P. K.; CHEN, J. Y.; WANG, L. P.; HUANG, N. Plasma-surface modification of biomaterials. **Materials Science and Engineering R**, v. 36, p. 143-206, 2002.

CORAZZA FILHO, E. C. **Termoplásticos, os materiais e suas transformações**. São Paulo, 1995.

COSTA, T. H. C.; FEITOR, M. C.; ALVES JÚNIOR, C.; BEZERRA, C. M. Caracterização de filmes de poliéster modificados por plasma de O<sub>2</sub> a baixa pressão. **Matéria**, v. 13, p. 65-76, 2008.

CRISWELL, K. A.; KRISHNA, G.; ZIELINSKI, D.; URDA, G. A.; JUNEAU, P.; BULERA, S.; BLEAVINS, M. R. Validation of a flow cytometric acridine orange micronuclei methodology in rats. **Mutation Research**, v. 528, p. 1-18, 2003.

DACULSI, G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. **Biomaterials**, v. 19, p. 1473-1478, 1998.

DALBY, M. J.; YARWOOD, S. J.; RIEHLE, M. O.; JOHNSTONE, H. J. H.; AFFROSSMAN, S.; CURTIS, A. S. G. Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13 nm high polymer demixed island. **Experimental Cell Research**, v. 276, p. 1-9, 2002.

DARLING, S. B. Directing the self-assembly of block copolymers. **Progress in polymer science**, v. 32, p. 1152-1204, 2007.

DAS, R. N.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Nanocrystalline - Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> using sucrose. **Journal American Ceramic Society**, v. 84, p. 2421-2423, 2001.

DEKEYSER, C. M.; BILTRESSE, S.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; ROUXHET P. G. ; DUPPONT-GILLAIN, Ch. C. Submicrometer-scale heterogeneous surfaces by PS-PMMA demixing. **Polymer**, v. 45, p. 2211-2219, 2004.

DEWEZ, J. L.; LHOEST, J. B.; DETRAIT, E.; BERGER, V.; DUPONT-GILLAIN, C. C.; VINCENT, L. M.; SCHNEIDER, Y. J.; BERTRAND, P.; ROUXHET, P. G. Adhesion of mammalian cells to

polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomaterials**, v. 19, p. 1441-1445, 1998.

DI SILVIO, L.; DALBY, M. J.; BONFIELD, W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. **Biomaterials**, v. 23, p. 101-107, 2002.

DONG, J.; SUN, Q.; WANG, J-Y. Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 25, p. 4691-4697, 2004.

DONG, Y.; LI, P.; CHEN, C-b.; WANG, Z-h.; MA, P.; CHEN, G-Q. The improvement of fibroblasts growth on hydrophobic byopolyesters by coating with polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with cell adhesion motif RGD. **Biomaterials**, v. 31, p. 8921-8930, 2010.

DØSA, R. A.; BURKE, G. A.; MEENAN, B. J. Protein adhesion and cell response on atmospheric pressure dielectric barrier discharge modified polymer surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2609-2620, 2010.

ELIAS, H-G. **Macromolecules: synthesis, materials, and technology**. USA: Plenum Publishing Corporation, 1984.

ELLINGSEN, J. E. Surface configurations of dental implants. **Periodontology 2000**, v. 17, p. 36-46, 1998.

ESPOSITO, A. R.; LUCCHESI, C.; FERREIRA, B. M. P.; DUEK, E. A. R. Estudo da interação celular vero/PLGA após a modificação da superfície por plasma de oxigênio. **Revista Matéria**, v. 12, p. 164-172, 2007.

FAGHIHI, S.; AZARI, F.; LI, H.; BATENI, M. R.; SZPUNAR, J. A.; VALI, H.; TABRIZIAN, M. The significance of crystallographic texture of titanium alloy substrates on pre-osteoblast responses. **Biomaterials**, v. 27, p. 3532-3539, 2006.

FOULK, J. A.; BUNN, J. M. Physical and barrier properties of developed bilayer protein films. **Applied engineering in agriculture**, v. 17, p. 635-641, 2001.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros Biodegradáveis ó Uma solução para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, p. 811-816, 2006.

FRANCK, K. P.; RUDOLPH, R.; MIESSNER, H. Design and Operating Characteristics of a Simple and Reliable DBD Reactor for Use with Atmospheric Air. **Plasma Chemical and Plasma Processing**, v. 23, p. 47-57, 2003.

FREED, L. E.; MARQUIS, J. C.; NOHRIA, L. E.; EMMANUAL, J.; MIKOS, A. G.; LANGER, R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultures on synthetic biodegradable polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 27, p. 11-23, 1993.

FRIDMAN, A.; CHIROKOV, A.; GUTSOL, A. Non-thermal atmospheric pressure discharges. **Journal of Physics**, v. 38, p. 1-24, 2005.

FRIDMAN, A. **Plasma Chemistry**. Cambridge University Press: New York, 2008.

FRIEDMANN, A.; HOESS, A.; CISMAK, A.; HEILMANN, A. Investigation of cell-substrate interactions by focused ion beam preparation and scanning electron microscopy. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 2499-2507, 2011.

GENG, Y. J.; AZUMA, T.; TANG, J. X.; HARTWIG, J. H.; MUSZYNSKI, M.; LIBBY, Q. W. P.; KWIATKOWSKI, D. J. Caspases-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. **European Journal of Cell Biology**, v. 7, p. 294-302, 1998.

FUJII, S.; OKADA, M.; SAWA, H.; FURUZONO, T.; NAKAMURA, Y. Hydroxyapatite nanoparticles as particulate emulsifier: Fabrication of hydroxyapatite-coated biodegradable microspheres. **Langmuir**, v. 25, p. 9759-9766, 2009.

GERBERDING, S. J.; BYERS, C. N. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of chromatography A**, v. 808, p. 141-151, 1998.

GRIGGS, J. A.; KISHEN, A.; LE, K. N. Mechanism of strength increase for a hydrothermal porcelain. **Dental Materials**, v. 19, p. 625-631, 2003.

HALLAB, N. J.; BUNDY, K. J.; O'CONNOR, K.; MOSES, R. L.; JACOBS, J. J. Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion. **Tissue engineering**, v. 7, p. 55-71, 2001.

HAMLEY, I. W. Nanostructure fabrication using block copolymers. **Nanotechnology**, v. 14, p. R396R54, 2003.

HAMLEY, I. W. **Block Copolymers in Solution**. Wiley, England, 2007.

HE, B.; WAN, Y.; BEI, J.; WANG, S. Synthesis and cell affinity of functionalized poly(L-lactide-co-malic acid) with high molecular weight. **Biomaterials**, v. 25, p. 5239-5247, 2004.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

HINDIÉ, M.; DEGAT, M.-C.; GAUDIÈRE, F.; GALLET, O.; TASSEL, P. R. V.; PAUTHE, E. Pre-osteoblasts on poly(L-lactic acid) and silicon oxide: Influence of fibronectin and albumin adsorption. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 387-394, 2011.

HORBETT, T. A.; SCHWAY, M. B.; RATNER, B. D. Hydrophilic-hydrophobic copolymers as cell substrates: effect on 3T3 cell-growth rates. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 104, p. 28-39, 1985.

HORCAS, I.; FERNÁNDEZ, R.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J. M.; COLCHERO, J.; GÓMEZ-HERRERO, J.; BARO, A. M. **Review of Scientific Instruments**, v. 78, p. 013705-1 ó 013705-8, 2007.

HUBBELL J A. Biomaterials in tissue engineering. **Nature Biotechnology**, v. 13, p. 565-576, 1995.

ISO 10993-5 **Biological Evaluation of Medical Devices ó Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods**. International organization for standardization, Geneva, 1992.



ITRI, R.; AMARAL, L. Q. Micellar-shape anisometry near isotropic-liquid-crystal phase transitions. **Physical Review E**, v. 47, p. 2551-2557, 1993.

JALILI, K.; ABBASI, F.; OSKOEI, S. S.; ALINEJAD, Z. Relationships between the morphology, swelling and mechanical properties of poly(dimethyl siloxane)/poly(acrylic acid) interpenetrating networks. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 2, p. 534-541, 2009.

JALILI, N.; LAXMINARAYANA, K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. **Mechatronics**, v. 14, p. 907-945, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAPLAN, D. L. **Introduction to Biopolymers from renewable resources**. In: **Biopolymers from renewable resources**, Springer-Verlag, 1998.

KASEMO, B. Biological surface science. **Surface science**, v. 500, p. 656-677, 2002.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 113-131, 2001.

KEEN, I.; BROOTA, O.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; TRAU, M.; GRONDAHL, L. Introducing amine functionalities on a poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) surface: comparing the use of ammonia plasma treatment and ethylenediamine aminolysis. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 427-434, 2006.

KETTERING, J. D.; TORABINEJAB, M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeL a cells and fibroblasts. **International Endodontic Journal**, v. 17, p. 60-66, 1984.

KIM, J. K.; YANG, S. Y.; LEE, Y.; KIM, Y. Functional nanomaterials based on block copolymer self-assembly. **Progress in polymer science**, v. 35, p. 1325-1349, 2010.

KOGELSCHATZ, U. Atmospheric-pressure plasma technology. **Plasma Physics and Controlled Fusion**, v. 46, p. B63-B75, 2004.

KWOK, D. Y.; LAM, C. N. C.; LI, A.; LEUNG, A.; WU, R.; MOK, E.; NEUMANN, A. W. Measuring and interpreting contact angles: a complex issue. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 142, p. 219-235, 1998.

LARRIEU, J.; HELD, B.; MARTINEZ, H.; TISON, Y. Ageing of atactic and isotactic polystyrene thin films treated by oxygen DC pulsed plasma. **Surface & Coatings Technology**, v. 200, p. 2310-2316, 2005.

LEE, H. U.; JEONG, Y. S.; KOH, K. N.; JEONG, S. Y.; KIM, H-G.; BAE, J. S.; CHO, C. R. Contribution of power on cell adhesion using atmospheric dielectric barrier discharge (DBD) plasma system. **Current Applied Physics**, v. 9, p. 219-223, 2009.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX M. M. **Principles of Biochemistry**. USA: Worth, 1993.

LI, S. J.; NIINOMI, M.; AKAHORI, T.; KASUGA, T.; YANG, R.; HAO, Y. L. Fatigue characteristics of bioactive glass-ceramic-coated Ti<sub>6</sub>Zr<sub>2</sub>Nb<sub>1</sub> for biomedical application. **Biomaterials**, v. 25, p. 3369-3378, 2004.

LIU, C.; MEENAN, B. J. Effect of Air Plasma Processing on the Adsorption Behaviour of Bovine Serum Albumin on Spin-Coated PMMA Surfaces. **Journal of Bionic Engineering**, v. 5, p. 204-214, 2008.

LIU, X.; SUN, Q.; WANG, H.; ZHANG, L.; WANG, J-Y. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. **Biomaterials**, v. 26, p. 109-115, 2005.

LIU, Y.; SHENG, X.; DAN, X.; XIANG, Q. Preparation of mica/apatite glass ceramics biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 26, p. 1390-1394, 2006.

LOCATELLI, C. I.; ENGLERT, G. E.; KWITKO, S.; SIMONETTI, A. B. Aderência bacteriana *in vitro* a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e silicone. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, p. 241-248, 2004.

LU, Y.; SUN, J.; SHEN, J. Cell Adhesion Properties of Patterned Poly(acrylic acid)/Poly(allylamine hydrochloride) Multilayer Films Created by Room-Temperature Imprinting Technique. **Langmuir**, v. 24, p. 8050-8055, 2008.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros-Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro, E-papers Serviços Editoriais, 2001.

LYAKHOVA, K. S.; ZVELINDOVSKY, A. V.; SEVINK, G. J. A. Kinetic Pathways of Order-to-Order Phase Transitions in Block Copolymer Films under an Electric Field. **Macromolecules**, v. 39, p. 3024-3037, 2006.

MA, P. X. Biomimetic materials for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 184-198, 2008.

MA, Z.; MAO, Z.; GAO, C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 60, p.137-157, 2007.

MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 207-233, 2007.

MALMONGE, S. M.; ZAVAGLIA, C. A. C.; SANTO JR, A. R.; WADA, M. L. F. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de poliHEMA: um estudo *in vitro*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 15, p. 49-54, 1999.

MANDL, S.; RAUSCHENBACH, B. Plasma immersion ion implantation. A new method for homogeneous surfaces modification of complex forms of medical implants. **Biomedical Technik**, v. 45, p. 193-198, 2000.

MELO, A.; BET, A. C.; ASSREUY, J.; DEBACHER, N. A.; SOLDI, V. Adhesion of L929 Mouse Fibroblast Cells on Poly(Styrene)/Poly(Methyl Methacrylate) Films. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1753-1757, 2009.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology ó Animal**, v. 36, p. 539-543, 2000.

MOLLICA, F.; VENTRE, M.; SARRACINO, F.; AMBROSIO, L.; NICOLAIS, L. Mechanical properties and modelling of a hydrophilic composite used as a biomaterial. **Composites Science and Technology**, v. 66, p. 92-101, 2006.

MOMANY, F. A.; SESSA, D.J.; LAWTON, J.W.; SELLING, G.W.; HAMAKER, S. A. H.; WILLET, J. L. Structural Characterization of  $\alpha$ -zein. **Journal of Agricultural and Food Chemical**, v. 54, p. 543-547, 2006.

NELSON, O. E. Genetic modification of protein quality in plants. **Advanced Agronomy**, v. 21, p. 171-194, 1969.

OAK, J-J.; INOUE, A. Attempt to develop Ti-based amorphous alloys for biomaterials. **Materials Science and Engineering: A**, v. 449-451, p. 220-224, 2007.

OHRING, M. **The materials science of thin films**. San Diego - Califórnia: Academic Press, 1991.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

OU, W.; QIU, H.; CHEN, Z.; XU, K. Biodegradable block poly(ester-urethane) based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymers. **Biomaterials**, v. 32, p. 3178-3188, 2011.

OWENS, D. K.; WENDT, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 13, p. 1741-1747, 1969.

PADILHA, G. S.; GIACON, V. M.; BARTOLI, J. R. Modificação da superfície dos filmes de PMMA por plasma de  $\text{CHF}_3$ . **Exacta**, v. 8, p. 13-18, 2010.

PATEL, A. R.; BOWENS, E. C. M.; VELIKOV, K. P. Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 12497-12503, 2010.

PÉREZ-LUNA, V. H.; HORBETT, T. A. ; RATNER, B. D. Developing correlations between fibrinogen adsorption and surface properties using multivariate statistics. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, p. 1111-1126, 1994.

PRASANNA, B. M.; VASAL, S. K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N. N. Quality protein maize. **Current Science**, v. 81, p. 1308-1319, 2001.

QIU, S. L.; LIN, C. L.; CHEN, J.; STRONGIN, M. The formation of metal-oxygen species at low temperatures. **Journal of Vacuum Science & Technology A**, v. 8, p. 2595-2598, 1990.

RAABE, D.; SANDER, B.; FRIÁK, M.; MA, D.; NEUGEBAUER, J. Theory-guided bottom-up design of  $\alpha$ -titanium alloys as biomaterials based on first principles calculations: Theory and experiments. **Acta Materialia**, v. 55, p. 4475-4487, 2007.

RATNER, B. D. **Biomedical applications of polymer**. Oxford, Pergamon Press, 1989.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.

ROSSNAGEL, S. M.; CUOMO, J. J.; WESTWOOD, W. D. **Handbook of plasma Processing Technology ó fundamentals, etching, deposition and surface interactions**. New Jersey, 1989.

SAITO, N.; MURAKAMI, N.; TAKAHASHI, J.; HORIUCHI, H.; OTA, H.; KATO, H.; OKADA, T.; NOZAKI, K.; TAKAOKA K. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 103761048, 2005.

SANTOS JR, A. R.; BARBANTI, S. H.; DUEK, E. A. R.; DOLDER, H.; WADA, R. S.; WADA, M. L. F. Vero cell growth and differentiation on Poly(L- lactic acid) membranes of different pore diameters. **Artificial Organs**, v. 25, p. 7-13, 2001.

SCHAKENRAAD, J. M.; BUSSCHER, H. J.; WILDEVUUR, C. R.; ARENDS, J. Thermodynamic aspects of cell spreading on solid substrata. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 13, p. 75-91, 1988.

SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. **Journal Cell Biochemical**, v. 56, p. 340-347, 1994.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.

SEIDI, A.; RAMALINGAM, M.; ELLOUMI-HANNACHI, I.; OSTROVIDOV, S.; KHADEMHOSEINI, A. Gradient biomaterials for soft-to-hard interface tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 1441-1451, 2011.

SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGI, M.; PENA, J.; RAMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLES, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 5603-5611, 2004.

SHIMIZU, R. N. ; DEMARQUETTE, N. R. Evaluation of surface energy of solid polymers using different models. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, p. 1831-1845, 2000.

SHIN, H. Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions. **Biomaterials**, v. 28, p. 126-133, 2007.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, p. 171-192, 2001.

SILVA, J. V. L. A biofabricação de tecidos e órgãos. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, Nº. 102, 2008.

SILVER, F.; DOILLON, C. **Biocompatibility, interactions and implantable materials**. New York: VCH, 1989.

SILVIA, G.; LEONOR, I. B.; MANO, J. F.; REIS, R. L.; KAPLAN, D.L. Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 1-17, 2012.

SIOSHANSI, P. Surface modification of industrial components by ion implantation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 37-38, p. 667-761, 1989.

SMOLKO, E.; MAZZEI, R.; TADEY, D.; LOMBARDO, D. Attachment and spreadout study of 3T3 cells onto PP track etched films. **Nuclear instruments and Methods in Physics Research B**, v. 185, p. 204-209, 2001.

STROBEL, M.; LYONS, C. S.; STROBEL, J. M.; KAPAUN, R. S. **Journal Adhesion Science Technology**, v. 6, p. 429-443, 1992.

TATTINI JR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 127-136, 2006.

TEZCANER, A.; BUGRA, K.; HASIRCI, V. Retinal Pigment Epithelium Cell Culture on Surface Modified poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Thin Films. **Biomaterials**, v. 24, p. 4573-4583, 2003.

TRINDADE, M. C. D.; LIND, M.; SUUN, D.; SCHURMAN, D. J.; GOODMAN, S. B.; SMITH, L. *In vitro* reaction to orthopaedic biomaterials by macrophages and lymphocytes isolated from patients undergoing revision surgery. **Biomaterials**, v.22, p. 253-259, 2001.

VERRIER, S.; BAREILLE, R.; ROVIRA, A.; DARD, M.; AMEDEE, J. Human osteoprogenitor responses to orthopedic implant: Mechanism of cell attachment and cell adhesion. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 7, p. 46-51, 1996.

VESEL, A. Modification of polystyrene with a highly reactive cold oxygen plasma. **Surface & Coatings Technology**, v. 205, p. 490-497, 2010.

VOGLER, E. A.; BUSSIAN, R. W. Short-term cell-attachment rates: A surface-sensitives test of cell-substrate compatibility. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 21, p. 1197-1211, 1987.

WAN-JUNG, C.; CHENG-CHIEN, W; CHUH-YUNG, C. The improvement of electrical property of multiwalled with plasma modification and chemical oxidation in the polymer matrix. **Journal of Inorganic Organometallic polymers and materials**, v. 19, p. 234-242, 2009.

WILLIAMS D. F. **Progress in biomaterial engineering: Definition in Biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987.

WOLKENHAUER, A.; AVRAMIDIS, G.; CAI, Y.; MILITZ, H.; VIÖL, W. Investigation of Wood and Timber Surface Modification by Dielectric Barrier Discharge at Atmospheric Pressure. **Plasma Processes and Polymer**, v. 4, p. S470-S474, 2007.

WOODCOCK, S. E.; JOHNSON, W. C.; CHEN, Z. Collagen adsorption and structure on polymer surfaces observed by atomic force microscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 292, p. 99-107, 2005.

WU, S. Calculation of interfacial tension in polymer systems. **Journal of Polymer Science Part C : Polymer Symposia**, v. 34, p. 19-30, 1971.

YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Enhanced cell affinity of poly(d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. **Biomaterials**, v. 23, p. 2607-2614, 2002.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 576-602, 2006.

ZHITOMIRSKY, I. Electrophoretic hydroxyapatite coatings and fibers. **Materials Letters**, v. 42, p. 262-271, 2000.



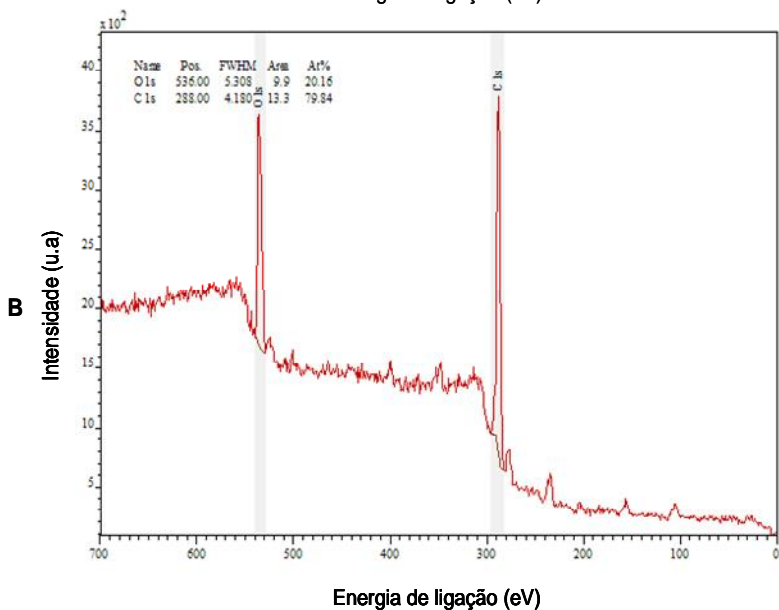
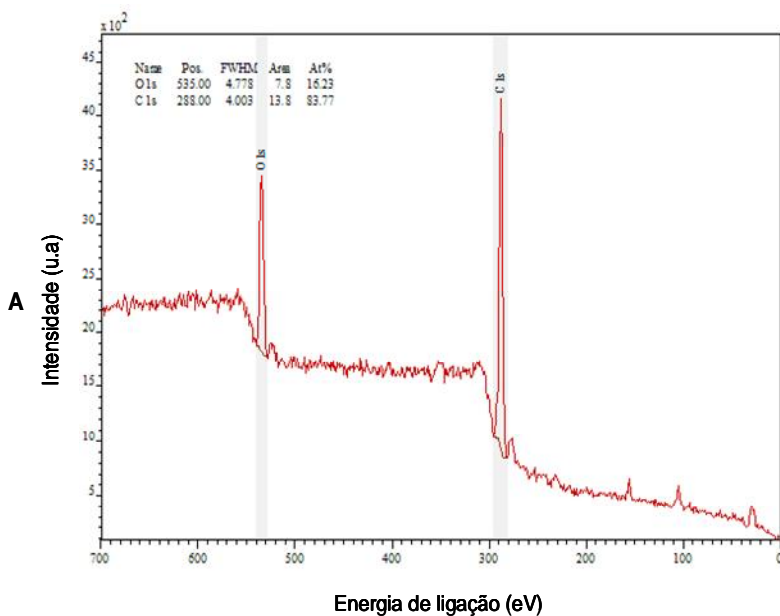
ZHU, X.; CHIAN, k. S.; CHAN-PARK, M. B. E.; LEE, S. T. Effect of argon ó plasma treatment on proliferation of human óskin derived fibroblast on chitosan membrane in vitro. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 73A, p. 264-274, 2005.



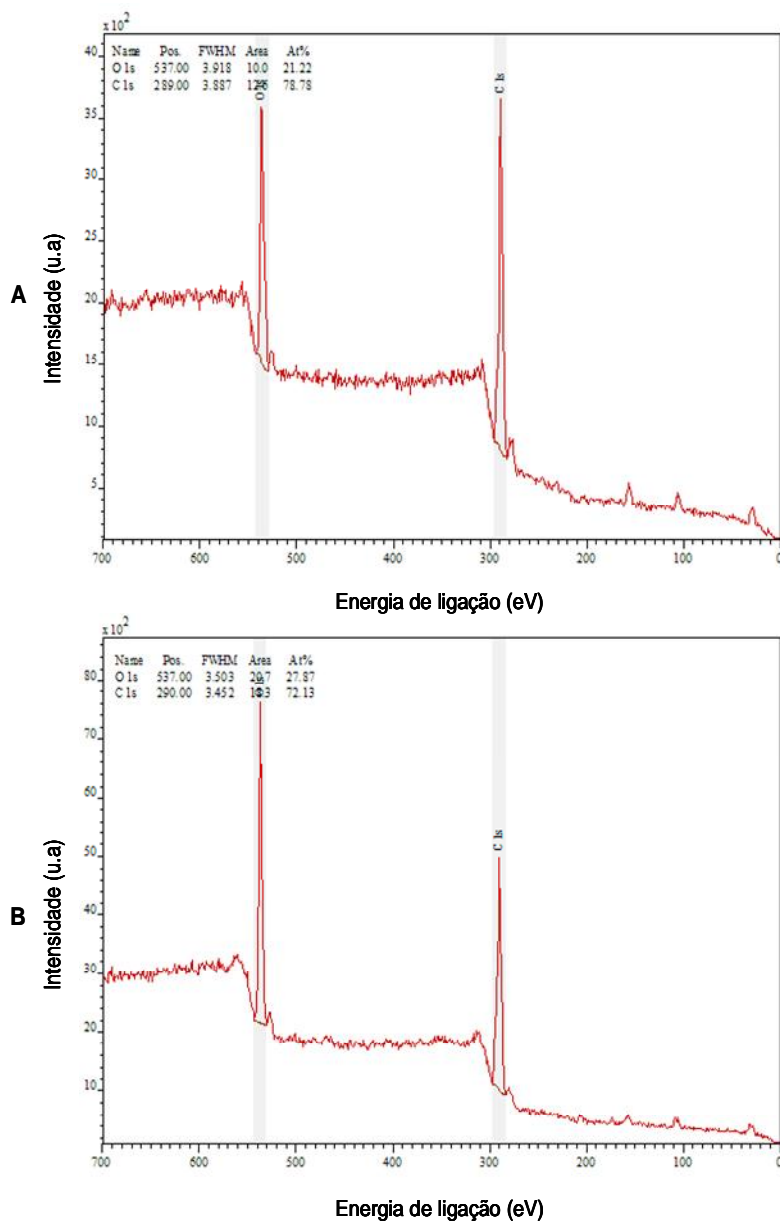
## **CAPÍTULO 10**

### **APÊNDICE**

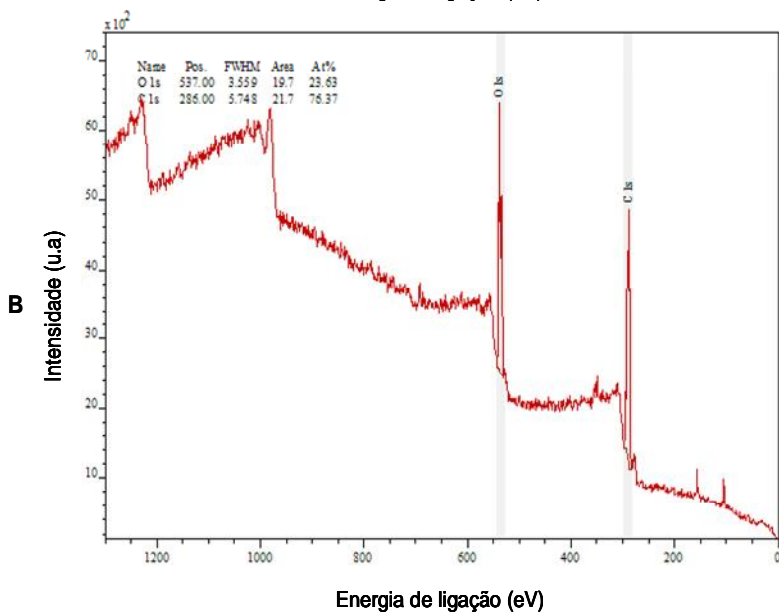
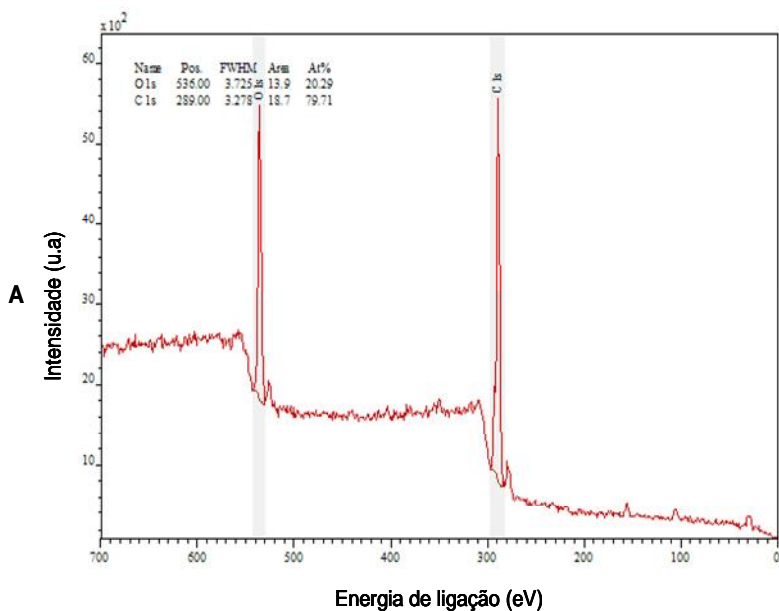




Espectros de Survey das análises de XPS do sinal do C<sub>1s</sub> e O<sub>1s</sub> dos filmes de PS não modificados (A) e modificados (B) por DBD.



Espectros de Survey das análises de XPS do sinal do C<sub>1s</sub> e O<sub>1s</sub> dos filmes de PMMA não modificados (A) e modificados (B) por DBD.



Espectros de Survey das análises de XPS do sinal do C<sub>1s</sub> e O<sub>1s</sub> dos filmes de PS/PMMA 1:1 não modificados (A) e modificados (B) por DBD.