



CENTRO UNIVERSITÁRIO SOCIESC - UNISOCIESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

IRLAINE MACHADO

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO POR PLASMA PRODUZIDO EM
ATMOSFERA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MODIFICAÇÃO DE
SUPERFÍCIES DAS MEMBRANAS DE POLI (L-ÁCIDO LÁCTICO)-PLLA.**

Joinville

2015

IRLAINE MACHADO

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO POR PLASMA PRODUZIDO EM
ATMOSFERA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MODIFICAÇÃO DE
SUPERFÍCIES DAS MEMBRANAS DE POLI (L-ÁCIDO LÁCTICO)-PLLA.**

Dissertação submetida ao Colegiado do curso de
Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica do
Centro Universitário SOCIESC – UNISOCIESC, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Mecânica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Adriana Tomaz Duarte

Coorientadora: Prof^a. Dra. Viviane L. Soethe

Joinville

2015

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO POR PLASMA PRODUZIDO EM
ATMOSFERA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MODIFICAÇÃO DE
SUPERFÍCIES DAS MEMBRANAS DE POLI (L-ÁCIDO LÁCTICO)-PLLA.**

IRLAINE MACHADO

**Dissertação defendida e aprovada em 30 de abril de 2015 pela banca
examinadora constituída pelos seguintes professores:**

Prof^a. Dra. Márcia Adriana Tomaz Duarte
Centro Universitário SOCIESC - UNISOCIESC

Prof^a. Dra. Viviane Lilian Soethe
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Dr. Diego Alexandre Duarte
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof^a. Dra. Palova Santos Balzer
Centro Universitário SOCIESC – UNISOCIESC

Prof. Dr. Rogério Gomes Araújo
Centro Universitário SOCIESC - UNISOCIESC

"É exatamente disso que a vida é feita, de momentos.
Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio
aprendizado.

Nunca esquecendo o mais importante: Nada nessa vida é por acaso.
Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte,
da melhor forma possível.

A vida nem sempre segue a nossa vontade,
mas ela é perfeita naquilo que tem que ser."

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a Deus, que nos faz compreender o quão belo são seus
planos, mesmo que contrários ao nosso.

Aos meus pais Ely e Ijair pelo apoio, incentivo, paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

A professora orientadora Dra Márcia Adriana Tomaz Duarte pela amizade, orientação, críticas e direcionamento durante toda a pesquisa.

A professora Dra Viviane Lilian Soethe pela coorientação, viabilização dos testes necessários para a pesquisa e transferência de conhecimento.

Ao professor Dr. Júlio César Sagás por sua solidariedade e por viabilizar vários testes e transferir seus conhecimentos.

A minha avó Augusta Maciel Machado (in memoriam), que com certeza sempre orou e continua orando por minhas conquistas.

A minha avó Adhélia por sua paciência.

Aos meus pais Ely e Ijar e meus irmão Mirian e Jonas que sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao meu sobrinho Ijair Erick que tanto amo, que sempre me trouxe muitas alegrias.

A Adriana A. C. Ribeiro (Adri) amiga do coração.

A professora MSc. Katiusca Wessler Miranda por disponibilizar seu tempo e me auxiliar nas análises de RMN.

A Thais Macedo Vieira, bolsista de Iniciação Científica do laboratório de Física da UDESC por me ajudar com a análise de ângulo de contato e por seu espírito de solidariedade.

Aos professores Dr. Rogério Gomes Araújo e Dra Palova Santos Balzer, membros da banca de qualificação pelas sugestões que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho e por aceitar o convite de Defesa da Dissertação.

Ao professor Dr. Diego Alexandre Duarte por aceitar o convite de Defesa de Dissertação.

A Caroline Rettore Moraes que me auxiliou durante esta jornada.

A Sintia S. Gehrmann secretária acadêmica do Mestrado por sua dedicação profissionalismo sempre presente e disposta a ajudar os Mestrandos.

Ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação-FUMDES pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

A laboratorista da UNISOCIESC Adriana pela colaboração nas análises realizadas.

A Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) pela disponibilização dos equipamentos.

A Universidade Federal do Paraná (UFPR) pela disponibilização do equipamento de XPS, em especial ao professor Dr. Wido Herwig Schreiner.

A UNIVILLE por disponibilizar o equipamento de estufa a vácuo.

Slepicka Petr pelos esclarecimentos fornecidos sobre seus artigos e o conhecimento compartilhado que contribuíram muito para discussão desta dissertação.

Silvie Rimpelová que demonstrou atenção aos questionamentos feitos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica do Centro Universitário Tupy UNISOCIESC.

Em especial a minha família, por tudo que sempre fizeram por mim.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso do trabalho, meu muito obrigada.

RESUMO

As propriedades da superfície dos biomateriais determinam o tipo e a força de interação com o meio biológico. Neste intuito o objetivo do presente trabalho recai em analisar a influencia do tratamento por plasma de peróxido de hidrogênio na superfície da membrana de Poli (L-Ácido Láctico) PLLA com a finalidade de verificar quais os parâmetros de tratamento apresentam alterações superficiais no polímero e que promovam a viabilidade celular. Para tal, as membranas de PLLA foram obtidas por evaporação de solvente e tiveram suas superfícies modificadas por plasma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As características químicas, física e morfológicas da superfície das membranas foram analisadas por Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raio-X (XPS), Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectrometria de Raio-X por Energia Dispersiva (EDX), Microscopia de Força Atômica (MFA), Análise Termogravimétrica (TG), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), ângulo de contato, e viabilidade celular. Os dados de XPS mostraram que o tratamento por plasma leva a mudanças na concentração de grupos polares e não polares. A análise térmica de DSC revela alterações na temperatura de transição vítrea (T_g) e no grau de cristalinidade, indicando a ação do plasma. Análises de MEV permitiram observar que as superfícies da membrana após exposição ao plasma apresentaram modificações na morfologia com aparente formação de cristais na superfície e uma elevação no numero de gomos. A análise de EDX evidenciou um aumento na quantidade de oxigênio após modificação da superfície do PLLA, o que contribuiu para a obtenção de superfície hidrofílica. Após tratamento por plasma mudanças na superfície morfológica do PLLA foram detectadas com consequente aumento na rugosidade. A modificação por plasma não afetou a estabilidade térmica do material. Análise de RMN ^{13}C permitiu afirmar as mudanças na estrutura química. O estudo por meio da técnica de ângulo de contato permitiu observar uma diminuição na molhabilidade da superfície das membranas, ou seja, após o tratamento por plasma, as membranas tornaram-se hidrofílicas. O estudo da viabilidade celular a partir das células de linhagem osteoblásticas foram realizadas nas membranas sem tratamento e tratadas por plasma de 1 e 2 minutos. O ensaio mostrou que todas as amostras são atóxicas e a amostra tratada por 2 minutos permitiu uma melhor adesão celular quando comparada com a amostra tratada e não tratada, inclusive ao grupo controle. Por meio dos resultados obtidos, é possível concluir que as membranas de PLLA após tratamento por plasma de H_2O_2 , tiveram suas propriedades superficiais modificadas o que auxiliou na adesão e proliferação celular, sendo assim, estas membranas são indicadas para utilização em dispositivos biomédicos, onde as propriedades obtidas neste trabalho sejam exigidas.

Palavras-chave: Modificação de Superfície. Plasma. Biomateriais. Poli (L-Ácido Láctico) - PLLA.

ABSTRACT

The surface properties of biomaterials determine the type and strength of interaction with the biological environment. Thus, the aim of this research was to analyze the influence of the hydrogen peroxide by plasma treatment on the surface of the Poly (L-lactic acid) (PLLA) membrane in order to determine which treatment parameters promote suitable surface polymer change as morphology, physical and chemical change. PLLA membranes were obtained by solvent evaporation and had their surfaces modified by plasma in hydrogen peroxide (H_2O_2) atmosphere. X-ray Spectroscopy Photoelectron (XPS), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX), Atomic Force Microscopy (AFM), Thermogravimetric Analysis (TG), ^1H and ^{13}C – Nuclear Magnetic Resonance (^1H , ^{13}C RMN), Contact angle, and cell viability were used to analyze the membranes' morphologies, chemical and physical structure. XPS measurements showed that plasma treatment leads to change in proportion of polar and non-polar groups. DSC thermal analysis reveals changes in the glass transition temperature (T_g) and degree of crystallinity (X_c), thus indicating the effect of the H_2O_2 plasma treatment. It was observed topography change due to plasma acting, resulting in a surface with greater number of buds and the presence of veins become more intense, and formation of some grooves on the surface. Also, it was observed an increased of oxygen in the sample, what is related to deposition of this element by the hydrogen peroxide gas, what contributed to improve hydrophilicity. MFA results highlighted a rough surface showing the effect of plasma etching. TG data confirmed that the thermal stability was not affected by plasma treatment. Chemical structure was confirmed by ^1H , ^{13}C RMN and was observed chemical structure change after plasma treatment. Contact angle values decreased, showing that plasma treatment in hydrogen peroxide atmosphere can alter surface properties of wettability. In order evaluated cell viability in different time 1, 2 minutes and unmodified sample, cell culture of osteoblastic were utilized in this study. The in vitro results demonstrated that plasma modification of the polymer membranes resulted in an increase on cell adhesion for the membranes modified with plasma from 2 minutes compared to the other sample and controls. Based on the results, it is possible to agree that after plasma treatment in H_2O_2 atmosphere, surface membranes of PLLA had their physical, morphological and chemical properties modified, what improves the cell adhesion and proliferation on the PLLA. These evidences can increase this polymer application in medical devices whose properties found in this work are required.

Keywords: Surface modification. Plasma. Biomaterials. Poly (L-lactic acid) - PLLA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama representativo das fases utilizadas para a síntese de PLA por rota convencional	23
Figura 2 - a) Representação esquemática dos principais tipos de interação do plasma com a superfície (a) ablação/ataque químico e limpeza e (b) enxerto e polimerização	28
Figura 3 – Esquema do processo de tratamento de superfície por plasma com a formação de grupos funcionais	29
Figura 4 – Emprego da Tecnologia do Plasma em diversas áreas tecnológicas	30
Figura 5 - (a) Ilustração do equipamento de plasma utilizado para o tratamento das membranas de PLLA e (b) porta amostras	38
Figura 6 – Imagem referente a descarga luminescente gerada durante o tratamento da membrana de PLLA por plasma de peróxido de hidrogênio.....	39
Figura 7 – Porcentagem atômica de carbono C(1s) e oxigênio O(1s) na camada superficial do PLLA não tratado e tratado por plasma em 1, 2, 3, 4, e 5 minutos e relação da concentração atômica entre carbono e oxigênio C/O.....	44
Figura 8- Espectros de XPS para amostra de PLLA não tratada.....	46
Figura 9 - Espectro do carbono deconvoluído da amostra de PLLA modificadas e não modificadas (A) PLLA sem tratamento, (B) 1min, (C) 2min , (D) 3min, (E) 4min e (F) PLLA 5min.....	47
Figura 10 – Espectros de XPS do oxigênio deconvoluído da amostra de PLLA modificadas e não modificadas (A) PLLA sem tratamento, (B) 1min, (C) 2min , (D) 3min, (E) 4min e (F) PLLA 5min.....	48
Figura 11 – Curvas de DSC (temperatura de transição vítrea e fusão) para as membranas de PLLA tratadas por plasma em diferentes tempo de exposição (1 a 5 minutos) e membranas não modificadas, especificadas como tempo 0	50
Figura 12 – Valores da concentração atômica de Oxigênio (%) para as membranas não tratadas e tratadas por plasma de H ₂ O ₂ , obtidos por XPS × valores de Tg.	52
Figura 13 – Imagens de MEV das membranas de PLLA não modificada (A) e modificadas por plasma de H ₂ O ₂ por 1min (B), 2min (C), 3min (D), 4min (E) e 5min (F). Magnitude: 3.000X para fotos em destaque e 1.000X para fotos menores.....	53
Figura 14 – Teor de Carbono e Oxigênio das membranas de PLLA antes e após tratamento por plasma de H ₂ O ₂	55

Figura 15 – Análise de rugosidade das membranas de PLLA não modificada (A) e modificadas por plasma de H ₂ O ₂ por 1 min (B), 2 min (C), 3 min (D), 4 min (E) e 5 min (F).....	59
Figura 16 - Valores da rugosidade de superfície obtidas por MFA <i>versus</i> o tempo de exposição a partir das membranas de PLLA não tratadas e tratadas por plasma de H ₂ O ₂ – <i>Ra vertical</i>	61
Figura 17 - Curvas de TG para as membranas de PLLA tratadas por plasma em diferentes tempo de exposição (1 a 5 minutos) e membranas sem tratamento	62
Figura 18 – Espectros de ¹ H RMN para o PLLA sem tratamento.....	64
Figura 19 – Espectros de ¹³ C RMN para o PLLA sem tratamento	65
Figura 20 - Espectros de ¹ H RMN para o PLLA sem tratamento (A), amostras tratadas 1 min (B) e 2 min (C)	66
Figura 21 - Espectros de ¹³ C RMN para o PLLA sem tratamento (A), amostras tratadas 1 min (B) e 2 min (C)	68
Figura 22-(A) Valores da análise do ângulo de contato e (B) energia de superfície para as amostra de PLLA não modificadas e tratadas por plasma de H ₂ O ₂	70
Figura 23 – Imagem da gota de água sobre a superfície das membranas de PLLA em diferentes tempos de exposição ao plasma de H ₂ O ₂ (0 a 5 minutos) obtido por meio de equipamento de ângulo de contato	72
Figura 24 - Crescimento celular de osteoblastos cultivados sobre as amostras não tratadas e tratadas por plasma de 1 e 2 minutos, em que o controle é a placa de poliestireno ao longo de 7 dias, onde *p<0,05 significância estatística em relação ao controle.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de diferentes parâmetros e resultados encontrados na literatura para o tratamento por plasma sobre substratos de PLLA e poliéster	32
Tabela 2 - Parâmetros e resultados do tratamento por plasma em membranas de PLLA utilizando plasma de N ₂	33
Tabela 3 – Parâmetros e resultados do tratamento por plasma de Ar em membranas de PLLA e PMP	35
Tabela 4 - Parâmetros e resultados de tratamento por plasma de O ₂ em membranas de PLLA	35
Tabela 5 – Parâmetros do processo de plasma utilizado para modificação da superfície do PLLA	39
Tabela 6 – Resultados encontrados na análise de DSC para as membranas de PLLA MM por plasma e MN.	51
Tabela 7 – Valores da rugosidade de superfície obtidas por MFA a partir das membranas de PLLA não tratadas e tratadas por plasma de H ₂ O ₂ – <i>Ra vertical</i>	57
Tabela 8 - Comparativo entre as análises de MEV, DSC e MFA para as amostras de PLLA tratadas e não tratadas por plasma de H ₂ O ₂	61
Tabela 9 – Dados da TG para as membranas de PLLA tratadas por plasma e membranas sem tratamento.....	63
Tabela 10 - Efeito do tratamento por plasma de H ₂ O ₂ no ângulo de contato e na energia de superfície do PLLA	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

D- Dextrógiro

DBDs - Descarga de barreira dielétrica

DC - Descarga de corrente contínua

DMEM - Meio eagle modificado por Dulbecco – Nutricell

DMSO - Dimetil sulfóxido

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

EDX - Espectrometria de raio-X por energia dispersiva

FDA - *Food and Drug Administration*

FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

HAP - Hidroxiapatita

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISO - *International Organization for Standardization*

ITA – Instituto Tecnológico de Aeronáutica

L – Levógiro

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MFA - Microscopia de força atômica

MM - Membranas modificadas

MN - Membranas não modificadas

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium

M_w - Massa molar ponderal média.

PCL - Poli(ε-caprolactona)

PDLA - Poli(D-ácido láctico)

PDLLA - Poli(DL-ácido láctico)

PDS - Poli(p-dioxanona)

PGA - Poli(ácido glicólico)

PUC - Pontifícia Universidade Católica

AHAs - (α -hidroxi-ácidos)

PHB - Poli(hidroxibutirato)

PHBV Poli(hidroxibutirato)-co-poli(hidroxivalerato)

PLLA - Poli(L-ácido láctico)

PMP - Poli(4-metil-1-penteno)

RF - Rádio frequência

RTG - Regeneração tecidual guiada

SFB - Soro fetal bovino

TG – Termogravimetria

UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UNICAMP – Universidade estadual de Campinas

UV - Ultravioleta

XPS – Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raio-X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO	15
2 BIOMATERIAIS	16
2.1 APLICAÇÕES DOS BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS	19
2.2 POLI (L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA)	21
2.3 TIPOS DE TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE	26
2.3.1 Plasma	26
3 METODOLOGIA	37
3.1 MATERIAIS	37
3.2 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS	37
3.2.1 Tratamento da superfície por plasma	38
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	40
3.3.1 Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raio-X (XPS)	40
3.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	40
3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Raio-X por Energia Dispersiva (EDX)	41
3.3.4 Microscopia de Força Atômica (MFA)	41
3.3.5 Termogravimetria (TG)	41
3.3.6 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ¹ H) e RMN ¹³ C	42
3.3.7 Ângulo de Contato	42
3.3.8 Viabilidade Celular	42
3.3.8.1 Adesão celular em membranas de PLLA modificadas e não tratadas	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RÁIO-X (XPS)	44
4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	49
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROMETRIA DE RÁIO-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDX)	53
4.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	56
4.5 TERMOGRAVIMETRIA (TG)	62

4.6	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN ^1H) e RMN de ^{13}C	63
4.7	ÂNGULO DE CONTATO	69
4.8	VIABILIDADE CELULAR.....	73
4.8.1	Adesão celular em membranas de PLLA modificadas e não tratadas	73
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXO 1.....	90

1 INTRODUÇÃO

Em virtude do desenvolvimento da área de biomateriais, estudos têm sido realizados para criação ou modificação de dispositivos que possam ser aplicados no corpo humano (NAIR; LAURENCIN, 2007). Esse interesse provém da importância de melhorar a qualidade de vida, incentivando a busca por alternativas que visam ampliar a interação dos biomateriais com o organismo, com o intuito de apurar a regeneração e o reparo do tecido danificado ou defeituoso de partes do corpo humano (CIAMBELLI et al., 2013; SATHISKUMAR; MADRAS, 2011; DUARTE, 2009).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que a expectativa de vida aumentou 5% entre os anos de 2000 a 2011 (IBGE, 2012). De acordo com Soares et al. (2010, p. 297), “estima-se, para 2020, 30 milhões de brasileiros com mais de 60 anos”. Com o incremento da expectativa de vida, traumas decorrentes de lesões, acidentes de trânsito e desgastes de partes do corpo, aumentam, tornando necessária a busca por dispositivos substitutos aos tecidos lesionados que garantam a qualidade de vida (SOARES et al., 2010; SANTOS Jr., 2007).

No entanto, os dispositivos médicos utilizados no Brasil são em sua maioria importados, o que eleva os custos para Previdência Social e Sistemas de Saúde, sendo necessário, portanto, aumentar a demanda desta tecnologia em nosso país, de forma a diminuir os custos com importação (SILVA, 2011).

Desta forma, busca-se criar dispositivos médicos que atendam as normas ISO 10.993 – Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos, que aprimorem e/ou desenvolvam novos biomateriais que se enquadrem nos requisitos da avaliação biológica de biofuncionalidade e biocompatibilidade (BORELLI, 2011).

Em determinadas aplicações estes dispositivos estimulam a recuperação do tecido ou órgãos danificados em função de traumas mecânicos, deformidades do desenvolvimento ou doenças, portanto, previnem e melhoram os membros comprometidos favorecendo a qualidade de vida (LASPRILLA, 2011; OLIVEIRA, 2010; SANTOS Jr., 2007).

Entre os biomateriais utilizados na área biomédica para fabricação de dispositivos e implantes, destaca-se o poliéster alifático poli(L-ácido láctico) (PLLA), devido as suas propriedades mecânicas superiores aos demais biomateriais (módulo

de elasticidade e tensão máxima) por apresentar característica de biocompatibilidade e absorção pelo organismo e não toxicidade. Neste sentido, a utilização de biomateriais à base de PLLA reduz a necessidade de realização de novas cirurgias para retirada do material implantado (STANKEVICH et al., 2015; XU et al., 2011; YAMAOKA, 2011; CASARANO, 2009; JAHNO, 2005), pois a estrutura deste polímero é hidrolisada e os subprodutos são metabolizados pelo organismo, evitando a produção de substâncias tóxicas (EPAILLARD et al., 2013; BOCCAFOSCHI et al., 2012; OIKONOMOU, 2010). Além disso, o PLLA é frequentemente utilizado e tem atraído interesse por ser produzido a partir de fontes renováveis.

Por outro lado, o PLLA apresenta como desvantagem, sua característica hidrofóbica, baixa rugosidade e a ausência de grupos funcionais que propicie a interação química tecido/implante, o que inviabiliza e dificulta a proliferação das células no substrato (LIU et al., 2014; RASAL et al., 2010; LIN et al., 2006), tornando necessária a modificação de sua superfície para aumentar sua aplicabilidade principalmente no setor biomédico.

As propriedades de superfície determinam o tipo e a força de interação entre o biomaterial e o ambiente biológico (MATTIOLI; KENNY; ARMENTANO, 2012). Características como, hidrofobicidade, morfologia e energia de superfície são de interesse significativo para aplicações dos dispositivos médicos, pois podem afetar a viabilidade celular (CHU, 2013; YANG, 2012; MATTIOLI; KENNY; ARMENTANO, 2012; LIM, 2004). Os fatores críticos para biocompatibilidade são a molhabilidade (hidrofilicidade/hidrofobicidade), estrutura química e rugosidade. Sendo assim, a modificação da superfície dos biomateriais por tratamentos da superfície tem sido um tema recorrente nessa década na comunidade científica (LIU et al., 2014; EPAILLARD et al., 2013; JIAO, 2012; HAO, 2005).

Diferentes técnicas têm sido empregadas para modificação da superfície de polímeros, sendo as mais frequentemente utilizadas aquelas que incluem ataque químico, radiação por feixe de elétrons e tratamento por plasma gasoso (MORENT; GEYTER, 2012; KENN et al., 2006).

O tratamento por plasma gasoso é particularmente vantajoso porque a modificação é restrita à superfície, enquanto que a maior parte do material permanece inalterada, podendo ser utilizado para alterar características superficiais como molhabilidade (CHU, 2013; EMNA et al., 2013; EPAILLARD et al., 2013;

WOEDTKE et al., 2013; CHU et al., 2002). A molhabilidade é um dos fatores mais comumente utilizados para caracterização do material e é gerado pela polaridade do material e pela energia livre de superfície. Esta propriedade pode ser alcançada através da modificação da superfície (SLEPICKA et al., 2015d).

Nesta dissertação é proposto o tratamento das membranas por plasma com atmosfera de peróxido de hidrogênio e o estudo das mudanças que este tratamento proporciona na superfície do substrato com o objetivo de aumentar a interação do tecido/implante no hospedeiro. A escolha do tratamento por plasma ocorre por se tratar de uma técnica sustentável, que não gera subprodutos tóxicos ao meio ambiente (COSTA, 2008) dependendo do gás utilizado e possibilitar uma grande varredura de parâmetros de processo. Já a escolha do peróxido de hidrogênio como atmosfera gasosa justifica-se pelo fato de a mesma possibilitar a criação de um plasma com diferentes estruturas energéticas (H_2O_2 , H_2 , O_2 , H_2O , entre outros) e ampliar, desta forma o número de grupos reativos que podem interagir com a superfície do polímero.

1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a influência do tratamento por plasma produzido em atmosfera de peróxido de hidrogênio na modificação de superfícies das membranas de poli (L-ácido láctico) (PLLA).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter a membrana de PLLA por evaporação de solvente;
- b) Tratar a membrana por plasma de peróxido de hidrogênio em diferentes condições experimentais;
- c) Caracterizar as membranas não tratadas e as tratadas por plasma de peróxido de hidrogênio através dos ensaios de: Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raio-X (XPS), Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectrometria de Raio-X por Energia Dispersiva (EDX), Microscopia de Força Atômica (MFA), Análise Termogravimétrica (TG), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), ângulo de contato, e viabilidade celular;

d) Analisar a viabilidade celular sobre as amostras.

1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

Este estudo está estruturado em sete capítulos, sendo que:

No Capítulo 1 é apresentada a parte introdutória do trabalho, enquanto que o Capítulo 2 aborda o referencial teórico sobre biomateriais, sua importância e aplicações. No Capítulo 3 é apresentado os tipos de tratamentos de superfície e as modificações de superfície por plasma, e no Capítulo 4 discute-se sobre o método utilizado para obtenção das membranas e o tratamento da superfície por plasma empregado na realização do presente trabalho, além das análises utilizadas para caracterização das membranas. No Capítulo 5 são apresentados os resultados e discussões, enquanto que o Capítulo 6 aborda as considerações finais seguido das referências.

2 BIOMATERIAIS

Biomateriais podem ser constituídos de materiais poliméricos (naturais ou sintéticos), cerâmicos, metálicos ou compósitos (BORELLI, 2011; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006), utilizados para obtenção de dispositivos médicos, como instrumentos, implantes, acessórios ou aparelhos que substituam, previnam, controlem ou regenerem órgãos ou tecidos do corpo humano (RECUM, 1999).

Segundo Williams (2009) “material” é um termo que expressa a individualidade de uma determinada composição, como a cerâmica de hidroxiapatita, uma liga de titânio ou um vírus revestido em material polimérico catiônico. Portanto, o autor prefere evitar os conceitos tradicionais e definir biomateriais como substância ou sistema. Baseado nisso, é inábil conceituar o que é uma substância, deste modo, a definição de substância pode ser semelhante ao conceito de matéria, que é especificado como tudo que tem massa e ocupa lugar no espaço.

Neste contexto, para Williams (2009) biomaterial é uma substância que foi projetada para adquirir uma forma específica, que sozinha ou adjunta com um sistema complexo é capaz de interagir com o sistema biológico de forma a direcionar o percurso do tratamento médico, na medicina ou veterinária.

Em outras palavras, biomaterial é um material biocompatível, natural ou sintético, destinado a interagir com o sistema biológico, usado para substituir, regenerar ou auxiliar partes de um órgão, tecido ou funções do corpo humano, até que sua função se cumpra (CHEN; THOUAS, 2015; TVERDOKHLEBOV et al., 2015).

Os biomateriais têm desempenhado um papel importante no avanço dos cuidados da saúde, sendo aplicados em vários campos da área médica, como dispositivos extracorpóreos em lentes de contato ou dialisadores renais, dispositivos de longa permanência ou temporários, como sistemas para liberação de fármacos (BAZAKA et al., 2011; DESMET et al., 2009) e na regeneração do coração (GIL et al., 2015).

Os biomateriais podem ser utilizados como implantes temporários ou permanentes. Os implantes permanentes são aqueles que ficam por tempo indeterminado no corpo do hospedeiro, a fim de substituir os tecidos, órgãos ou funções do corpo que foram lesionados. Os implantes temporários se caracterizam por permanecer no ambiente fisiológico até a regeneração do tecido danificado.

Ambos devem reter suas propriedades até o final da vida útil a qual se destina o implante (SANTOS Jr., 2007).

Deste modo, tornou-se necessária a regularização destes, de forma a garantir a segurança e efetividade de sua aplicabilidade, visto que são implantados no corpo humano e não podem causar reações inflamatórias no corpo do hospedeiro. Os parâmetros biológicos, físico-químicos e mecânicos que evidenciam a conformidade e segurança dos dispositivos médicos e dos biomateriais são regularizados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil. Estas agências seguem as diretrizes normatizadoras da *International Organization for Standardization* (ISO), *American Society for Testing and Materials* (ASTM) e Farmacopéia Americana (USP) (BORELLI, 2011).

A ISO 10.993 é uma das normas das agências normatizadoras mais utilizadas como base para avaliação da segurança biológica dos biomateriais (BORELLI, 2011). Dentre os testes que especificam os dispositivos médicos como biomateriais, a avaliação da biocompatibilidade é um dos ensaios primordiais requeridos pelas agências regulatórias (BORELLI, 2011; CHEUNG et al., 2007).

A biocompatibilidade é uma das características mais importantes para os polímeros utilizados na área biomédica, pois é a partir dos testes de biocompatibilidade que se determina a toxicidade do material, se é não-carcinogênico e se provocam irritabilidade e/ou reações que comprometam os órgãos ou tecidos quando alocados no meio biológico. Além disso, os produtos de degradação não devem interferir na cicatrização do tecido (BORELLI, 2011; RASAL et al., 2010; CHEN et al., 2008; CASADEI, 2009).

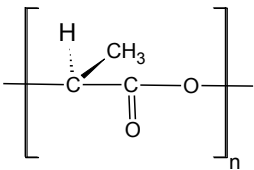
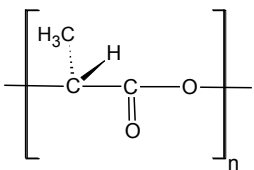
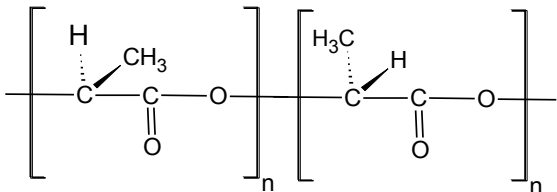
Outra característica que torna o biomaterial polimérico mais atrativo é sua condição biorreabsorvível, pois o dispositivo ou polímero com esta característica tem a capacidade de se degradar através da cisão da cadeia polimérica e ser reabsorvido *in vivo* e os subprodutos gerados são eliminados por rotas metabólicas do organismo (JAHNO, 2005). Estes podem ser classificados em polímeros sintéticos ou polímeros naturais, de acordo com sua origem. Os polímeros sintéticos, por serem capazes de se adaptar a um determinado fim ou função e tolerarem modificações, proporcionam aplicações mais versáteis na área biomédica (TIAN et al., 2012).

Dentre os biomateriais poliméricos, destaca-se a classe dos (α -hidroxi-ácidos) conforme citado no Quadro 1 (FERREIRA et al., 2008b; SANTOS Jr., 2007).

Quadro 1 – Estrutura química dos polímeros da classe dos (α -hidroxi-ácidos) (continua)

Polímero	Sigla	Estrutura
Poli(ácido glicólico)	PGA	$\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O}) \right]_n$
Poli(p-dioxanona)	PDS	$\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O}) \right]_n$
poli(hidroxibutirato)	PHB	$\left[\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O} \right]_n$
poli(hidroxibutirato)-co- poli(hidroxivalerato)	PHBV	$\left[\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O} \right]_n \left[\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O} \right]_n$
poli(ϵ -caprolactona)	PCL	$\left[(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-\text{O} \right]_n$
poli(ácido láctico)	PLA	$\left[\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O} \right]_n$

Quadro 1 – Estrutura química dos polímeros da classe dos (α-hidroxi-ácidos) (conclusão)

poli(D-ácido láctico)	PDLA	
poli(L-ácido láctico)	PLLA	
poli(DL-ácido láctico)	PDLLA	

Fonte: O autor (2015)

2.1 APLICAÇÕES DOS BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS

Com a demanda crescente da população, e seu envelhecimento, tornou-se necessário atender os requisitos relacionados com os cuidados da saúde (JACOBS, et al., 2012) e unir as diferentes áreas do conhecimento para desenvolver e aprimorar a área de dispositivos médicos (TIAN et al., 2012).

Os biomateriais poliméricos podem ser utilizados em várias aplicações que normalmente exigem bom desempenho mecânico, térmico, elétrico e químico devido suas propriedades mecânicas (módulo de elasticidade, tensão máxima), térmicas, elétricas, estabilidade química, fácil produção e baixo peso. Entre os polímeros utilizados na biomedicina destaca-se o PLLA, uma vez que apresenta todas as propriedades citadas, sendo essas necessárias para determinadas aplicações na área biomédica (SLEPICKA et al., 2012b; MORENT; GEYTER, 2012; YAMAOKA, 2011; CASARANO, 2009).

Os biomateriais são desenvolvidos para estarem em contato com moléculas, células, tecido e fluidos biológicos, em específicas aplicações como suturas, órgãos

sintéticos, próteses, liberação de fármacos, enxertos vasculares, implantes ortopédicos (substituição de articulações, dentes, membrana para regeneração óssea guiada), válvulas cardíacas, *stents*, medicamentos de cirurgia ocular e engenharia de tecido (SLEPICKA et al., 2012b; PIETRO, 2012; FU, 2012; XU et al., 2011).

A regeneração tecidual guiada (RTG) é uma técnica que utiliza membranas para promover a regeneração do ligamento periodontal humano danificado, que é o tecido conjuntivo que faz ligação entre o cimento e o osso alveolar (KIM et al., 2011). A membrana é utilizada para proteger o coágulo sanguíneo formado na região do defeito, este serve de matriz para formação de novos tecidos periodontais, onde os fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos, constituintes do ligamento periodontal promoverão a regeneração do periodonto (WIKESJO et al., 2003).

Os dispositivos ortopédicos fabricados a partir de polímeros biorreabsorvíveis apresentam vantagens sobre os dispositivos produzidos por metais ou materiais não degradáveis. A tensão produzida durante a modelação óssea é transferida ao longo do tempo para o local danificado durante a cura, o que reduz a resistência do implante e acarreta na reabsorção do material, não sendo necessária uma nova intervenção cirúrgica. Muitos dispositivos ortopédicos como pinos, varetas de fixação de fraturas do osso e placas para reparação maxilo-facial são fabricados a partir dos polímeros PLLA e PGA (PELTONIEMI et al., 2002).

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que envolve biologia, medicina e engenharia que visa reparar danos, lesões ou perda de órgãos por meio de um substituto artificial (JACOBS, 2012).

O processo da engenharia de tecido consiste no cultivo da célula em arcabouços para formar um tecido natural, e após essa formação, o tecido é implantado na parte lesionada do corpo. Em alguns casos os arcabouços sem ou com células são implantados no corpo do hospedeiro para o crescimento de novos tecidos. O sucesso do implante no corpo humano depende da biocompatibilidade do material, em alguns casos da porosidade e das propriedades mecânicas para que suportem o crescimento celular (TIAN et al., 2012).

A angioplastia com *stent* é um procedimento utilizado para desobstruir artérias com deficiente fluxo de sangue, esta técnica que vem sendo aplicada nos Estados Unidos (XU et al., 2011) com *stents* biorreabsorvíveis, entretanto no Brasil a ANVISA ainda necessita regulamentar a utilização deste tipo de material (FREIRE, 2013). Os

principais materiais utilizados para fabricação dos *stents* vasculares é o metal, tal como o aço inoxidável e o nitinol (liga NiTi com superelasticidade e memória de forma). Porém, este tipo de material é permanente e a sua remoção é praticamente impossível após o implante na artéria. Além disso, um implante permanente pode gerar inflamações crônicas e ocasionar, por exemplo, trombose (FREIRE, 2013; XU et al., 2011). Devido a estas limitações, estudos estão sendo realizados para utilização de polímeros biodegradáveis como um novo material estrutural para *stents* vasculares. O PLLA é um polímero promissor para uso como *stents* biodegradáveis devido sua alta resistência mecânica associada ao longo período de degradação. No entanto, para esta aplicação a superfície do PLLA deve ser modificada para torná-la hidrofílica e aumentar sua biocompatibilidade (XU et al., 2011).

Desta forma, para estas aplicações, os biomateriais devem ter propriedades superficiais de hidrofiliidade, rugosidade e energia superficial biocompatíveis e que favoreçam a adesão celular, pois são estas propriedades superficiais que irão determinar a interação entre o substrato e os tecidos/fluidos do corpo. Além disso, propriedades como a composição química, estrutura e morfologia superficial, minimizam problemas relacionados com reações inflamatórias no meio implantado (CHU, 2013; YANG, 2012).

Dentre os polímeros biorreabsorvíveis mais pesquisados para implantes biomédicos, lista-se o poli(ácido láctico) (PLA) na composição de PLLA, sendo o PLA um dos polímeros licenciados pela FDA para aplicações *in vivo* (TVERDOKHLEBOV et al., 2015; NAMPOOTHIRI; NAIR; JOHN, 2010; FERREIRA et al., 2008b).

2.2 POLI (L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA)

O monômero de ácido láctico, ácido 2-hidroxipropanóico, pode ser produzido a partir da conversão do açúcar ou amido que é obtido dos recursos renováveis (milho, trigo, arroz) por meio da fermentação bacteriana (SHENG et al., 2015; RASAL et al., 2010) ou através da síntese química. O ácido láctico é utilizado para obtenção do PLA. A obtenção do PLA por fermentação bacteriana é largamente utilizada por ser ambientalmente favorável (RASAL et al., 2010).

O ácido láctico possui um carbono assimétrico, o que garante a existência de isômeros ópticos, o ácido L-láctico e o ácido D-láctico (L – levógiro e D- dextrógiro),

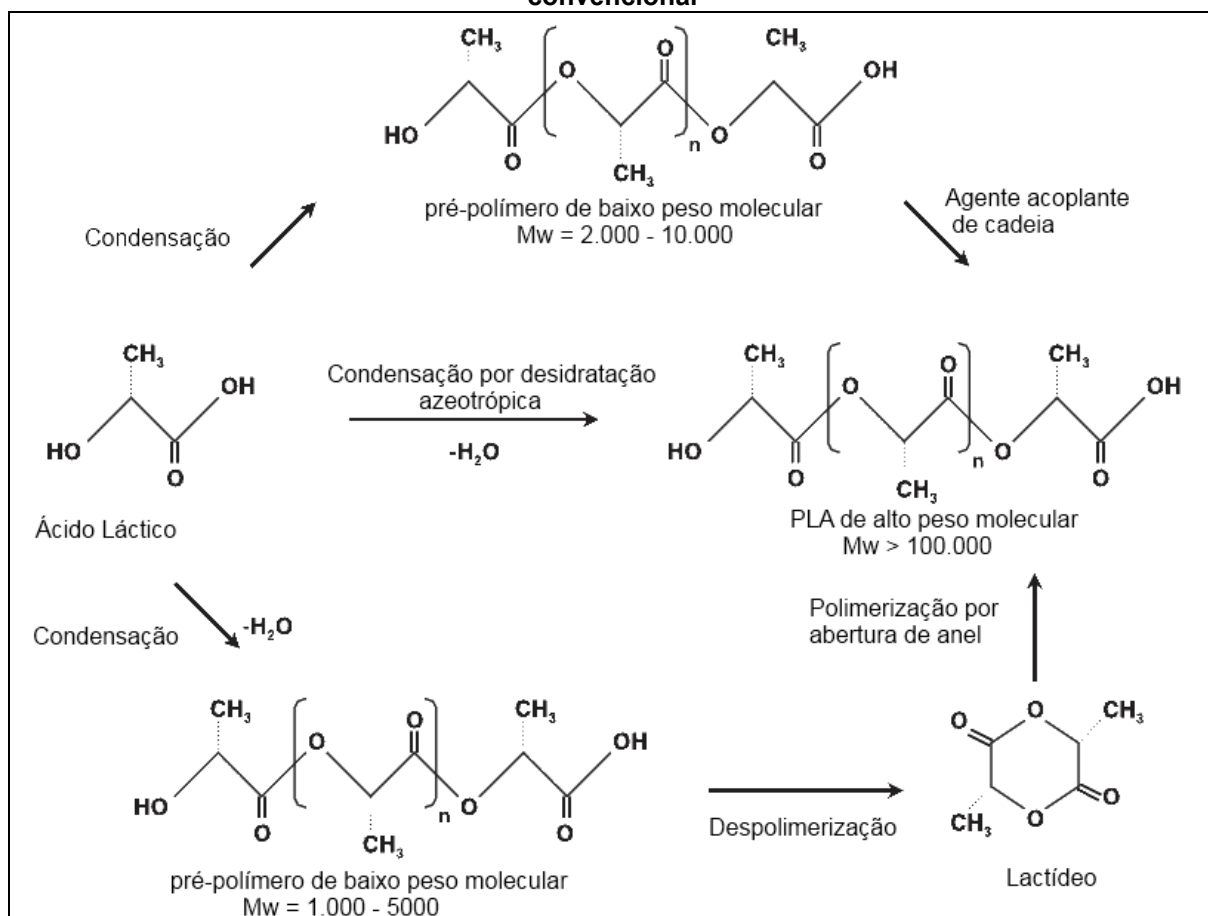
o que os diferencia é o desvio do plano da luz polarizada. Os isômeros “L” são preferencialmente obtidos a partir de fontes biológicas (MORENT et al., 2011).

A polimerização do ácido láctico para obtenção do PLA pode ser alcançada pelo processo de polimerização por policondensação direta, porém esta técnica resulta em polímeros de baixa massa molar, no entanto, podem ser utilizados em sistemas de liberação de fármacos (MORENT et al., 2011).

Uma alternativa a essa técnica é a obtenção do PLA por polimerização de abertura do anel, neste processo o ácido láctico é desidratado, o que gera o oligômero PLA de baixa massa molar, o qual é catalisado pelo sal de estanho e, sofre despolimerização, sendo produzido o dímero cíclico de ácido láctico denominado lactídeo, na sequência ocorre a polimerização por abertura do anel do dímero e, o PLA com alto peso molecular é obtido.

O sal de estanho mais utilizado como catalisador para esta reação é o 2-etil-hexanoato de estanho II, mais conhecido como octanoato de estanho $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, devido a sua completa conversão monômero/catalisador e por ser aprovado pela FDA e ter baixa toxicidade quando comparado aos outros sais de metais pesados (MORENT et al., 2011; RASAL et al., 2010; OIKONOMOU, 2010; CASARANO, 2009). As duas reações de polimerização do PLA estão demonstradas esquematicamente na Figura 1.

Figura 1 – Diagrama representativo das fases utilizadas para a síntese de PLA por rota convencional



Fonte: Adaptado de LUNT (1998, p.147)

A rota convencional para obtenção do PLA é através da polimerização por abertura de anel do monômero lactídeo, pois, este processo permite obter polímeros de alta massa molar, o que atribui ao polímero elevada resistência mecânica. Esta propriedade é necessária para aplicações específicas de polímeros que serão empregados na área biomédica (CHANG et al., 2009).

O PLA requer de 25 a 55% menos energia para sua produção comparada com os polímeros à base de petróleo, o que é vantajoso em relação aos custos de produção (RASAL et al., 2010).

Em virtude da natureza quiral do ácido láctico, enantiômeros de PLA podem existir, como o poli(L-ácido láctico) (PLLA) e poli(D-ácido láctico) PDLA e o Poli(DL-ácido láctico) PDLLA (SHENG et al., 2015; MORENT et al., 2011; CASARANO, 2009) e seus copolímeros poli (L-ácido láctico-co-DL-ácido láctico) (PLDLA) (DUARTE et al., 2013).

Entre os polímeros biodegradáveis da classe dos (α -hidroxi-ácidos), o PLLA tem sido largamente estudado devido suas significativas propriedades mecânicas

(módulo de elasticidade e tensão máxima na faixa de 3,2-5,0 GPa e 50-70 MPa respectivamente) (RAQUEZ et al., 2013; ZHANG et al., 2012), transparência, processabilidade, biocompatibilidade e condição sustentável (SONG et al., 2012; RASAL et al., 2010).

O PLLA é um poliéster alifático semicristalino, que pertence à família dos poli (α -hidroxi-ácidos) (AHAs), caracterizado também como termoplástico biodegradável que pode ser processado por diversos métodos, como extrusão, moldagem por injeção, sopro, filmes de formação, termoformagem, fiação de espumas e fiação de fibras (EMNA et al., 2013; SONG et al., 2012; LIM; AURAS; RUBINO, 2008). A característica mais atrativa do PLLA, em relação a aplicações biomédicas é sua biocompatibilidade, pois não produz efeitos tóxicos no tecido onde está alojado. Devido a estas propriedades, o PLLA pode ser aplicado na engenharia de tecido, na reconstrução de órgãos, devido a sua biocompatibilidade e sua capacidade biorreabsorvível (GUO; CAI; DONG, 2013), em componentes de fixação ortopédica, suturas cirúrgicas, placas e parafuso, dispositivo de distribuição de drogas e guias nervosas, pois sua capacidade biorreabsorvível dispensa uma nova intervenção cirúrgica após a cura do tecido danificado (LIZUNDIA, et al., 2012; YANAGIDA et al., 2011; MORENT et al., 2011).

No corpo humano, este polímero degrada-se através da cisão da cadeia polimérica por hidrólise, formando os oligômeros e por último os monômeros que são eliminados do corpo humano por vias metabólicas do organismo (MORENT et al., 2011).

O componente formado a partir da degradação por hidrólise do PLLA é o ácido láctico, que entra no ciclo de Krebs e, que resulta em água e dióxido de carbono, substâncias atóxicas, que podem ser expelidas pelo sistema respiratório ou através da urina (STANKEVICH et al., 2015; MORENT et al., 2011; BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Embora o PLLA constitua características biorreabsorvível, biocompatível, baixa energia de produção e processabilidade, existem propriedades que limitam o seu uso em determinadas aplicações (RASAL et al., 2010).

Os aspectos que inviabilizam a utilização do PLLA como biomaterial dizem respeito à baixa taxa de degradação que depende da cristalinidade, tamanho da cadeia polimérica e morfologia. Outro fator que diminui sua aplicabilidade é a baixa hidrofilicidade, com ângulo de contato de aproximadamente 80°, o que resulta em

baixa adesão celular e acarreta em doenças inflamatórias no corpo do hospedeiro (TVERDOKHLEBOV et al., 2015; RASAL et al., 2010). A baixa energia superficial também limita sua aplicação, pois impede a proliferação, espalhamento e fixação das células no substrato (EMNA et al., 2013), tendo característica hidrofóbica devido à ausência de grupos funcionais na lateral da cadeia polimérica (TVERDOKHLEBOV et al., 2015; YUE et al., 2015; TERAOKA; NAKAGAWA; HARA, 2006). A baixa permeabilidade também é um fator que dificulta a proliferação celular (JEONG; HOLLISTER, 2010).

Com o surgimento de traumas e desgaste de partes do corpo, muitos biomateriais, tal como o PLLA, foram utilizados ocasionando pouca biocompatibilidade, inflamações, infecção, falha mecânica e formação de coágulos de sangue, pois muitos destes materiais não foram desenvolvidos para serem utilizados na área médica. Os resultados insatisfatórios ocorreram devido à escolha dos materiais, pois quando selecionados, apenas as propriedades intrínsecas do material como resistência mecânica foram avaliadas. As propriedades de superfície não foram consideradas, e como alguns dos materiais possuíam propriedade hidrofóbica, resultaram em efeito deletério, como inflamações dos tecidos (BAZAKA et al., 2011; DESMET et al., 2009).

A partir de técnicas de caracterização de superfície, tornou-se possível evidenciar o que ocorre na interface da superfície do substrato e no tecido do hospedeiro, o que permitiu estabelecer a importância que a superfície do biomaterial tem em relação às respostas do meio biológico para dispositivos temporários ou permanentes, tendo um papel crucial para estabelecer a biocompatibilidade do biomaterial (TVERDOKHLEBOV et al., 2015; BAZAKA et al., 2011; DESMET et al., 2009).

O material em estudo, o PLLA, tem característica hidrofóbica o que afeta a adesão e proliferação celular (LIU et al., 2014; GUO; CAI; DONG, 2013). Esta característica limita a biocompatibilidade do polímero e compromete sua aplicação na área médica. Alguns estudos têm demonstrado que a modificação superficial deste polímero tem apresentado melhora em sua molhabilidade e adesão celular e consequentemente, sua biocompatibilidade, proporcionando a inserção de grupos funcionais, alteração da morfologia e da energia superficial do material tratado (LIU et al., 2014; FU, 2012).

2.3 TIPOS DE TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

Embora muitos biomateriais sintéticos apresentem propriedades físicas similares, ou até mesmo superiores aos apresentados por tecidos naturais do corpo humano, estes frequentemente falham, devido às reações fisiológicas, tais como inflamações e infecções. Tendo em vista a variedade de dispositivos médicos e implantes existentes atualmente, bem como as diferentes células e tecidos no corpo do hospedeiro, não existe uma solução universal para este problema. Desta forma, a adesão e crescimento celular devem ser adaptados a cada necessidade específica. Nesse sentido, a modificação da superfície dos biomateriais apresenta-se como um eficiente método pelo qual a biocompatibilidade e biofuncionalidade dos materiais podem ser obtidas (BAZAKA et al., 2011).

Dentre os tratamentos existentes para a modificação das superfícies, podem-se citar aqueles relacionados com as modificações por ataque químico, utilização de soluções ácidas ou básicas, solventes, tratamento por ultravioleta (UV), radiação gama e tratamento por ozônio. Entretanto, a maioria destas técnicas apresentam como desvantagens a formação de subprodutos, alto custo de produção e degradação do polímero, comprometendo suas propriedades (JACOBS et al., 2012; COSTA, 2008).

Além dos tratamentos citados, é recorrente na literatura, a modificação da superfície de polímeros por plasma, uma vez que este tipo de técnica, não apresenta geração de resíduos, sendo um processo limpo e seco (BAZAKA et al., 2011) que possibilita a produção de mudanças significativas na superfície em relação à morfologia, estrutura e composição química sem alterar as características volumétricas do material (YUE et al., 2015; BAZAKA et al., 2011) alterando, consequentemente, a adesão das células ao substrato (LIU et al., 2014).

2.3.1 Plasma

O plasma, definido como “descarga elétrica em um gás” (ROSSNAGEL; CUOMO; WESTWOOD, 1989) é composto por partículas neutras, como átomos e moléculas, e carregadas, como íons e elétrons livres (FERREIRA et al., 2009a; ROSSNAGEL; CUOMO; WESTWOOD, 1989; CHAPMANN, 1980).

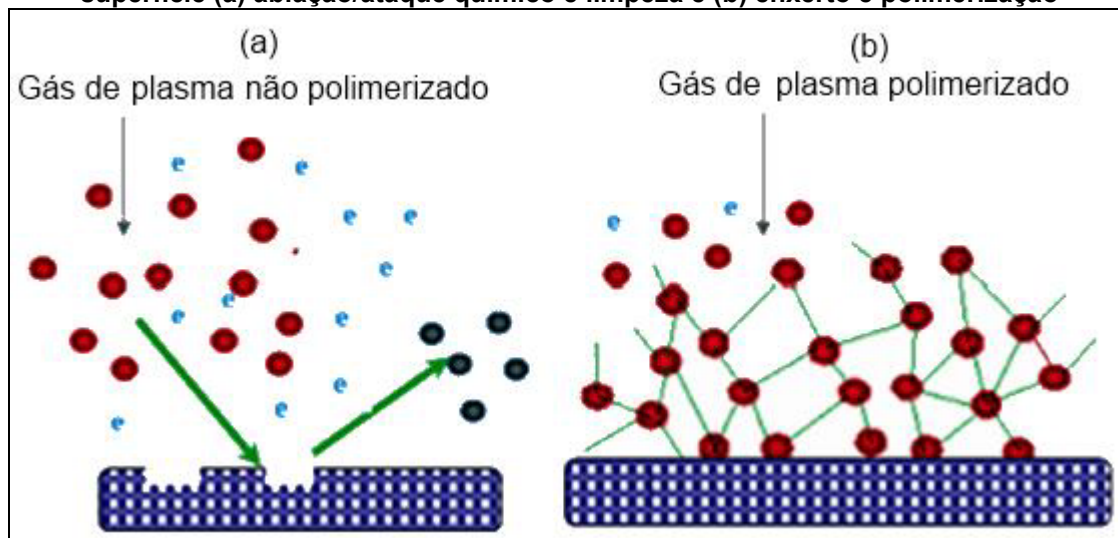
Quando uma diferença de potencial suficientemente grande (centenas de volts) é aplicada entre dois eletrodos imersos em um gás a baixa pressão, ocorre a aceleração de partículas carregadas que dão origem à descarga. Ao aplicar-se esta diferença de potencial, as partículas carregadas, existentes no meio gasoso, são aceleradas pelo campo elétrico entre os eletrodos, colidindo com as partículas de gás presentes na descarga. Esta colisão resulta em importantes fenômenos, dentre os quais pode-se destacar as colisões inelásticas que geram excitação e ionização. As colisões que resultam em excitação, seguidos de relaxações com a emissão de radiação luminosa, são responsáveis pelo nome característico da descarga, comumente chamada de luminescente. O processo de ionização é responsável pela criação de novos elétrons e íons que são novamente acelerados pelo campo elétrico e são responsáveis por novas ionizações e pela manutenção da descarga (SOETHE, 2004).

Os plasmas gasosos podem ser obtidos a partir de descargas de rádio frequência (RF), descarga luminescente de baixa frequência, descarga de barreira dielétrica (DBDs), descarga de micro-ondas e descarga de corrente contínua (DC) (JACOBS et al., 2012; FU, 2012; DEMINA, et al., 2012).

Ao interagir com uma superfície, o plasma pode apresentar basicamente dois tipos de interação:

- a) O primeiro inclui a quebra das ligações químicas desta superfície, promovendo, ablação, ataque químico, limpeza e ativação da superfície. A Figura 2 (a) apresenta de forma esquemática este processo de interação do plasma com a superfície.
- b) O segundo inclui o processo de polimerização induzida por plasma que é obtida por gases ou líquidos como fluorocarbonetos, hidrocarbonetos e silício. Este tipo de processo pode ser observado na Figura 2 (b) (KALIA et al., 2013; JACOBS et al., 2012; KALE; DESAI, 2011).

Figura 2 - a) Representação esquemática dos principais tipos de interação do plasma com a superfície (a) ablação/ataque químico e limpeza e (b) enxerto e polimerização



Fonte: Adaptado de KALE; DESAI (2011, p. 290)

A técnica de polimerização por plasma consiste na deposição de gases ou monômeros líquidos através da descarga de plasma. Os monômeros são convertidos em partículas reativas que reagem com a superfície e formam um revestimento na superfície do substrato (JACOBS et al., 2012).

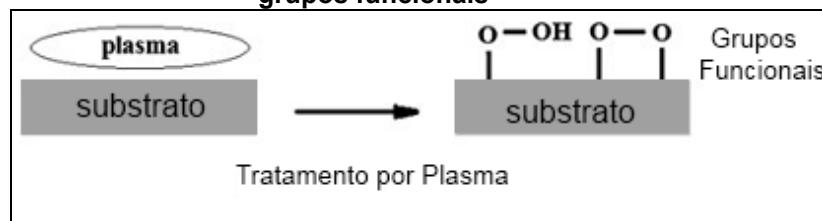
Os monômeros também podem ser enxertados antes do processo de plasma, isto é, o monômero é primeiramente absorvido pelo substrato e posteriormente submetido ao tratamento por plasma, esse processo denominado *syn-irradiação* (DESMET et al., 2009).

O processo de enxerto de monômero pós-irradiação por plasma é aquele em que a superfície é ativada a partir do tratamento de plasma e, na sequência, o substrato é colocado em contato com os gases ou líquidos de monômero para reação de polimerização (JACOBS et al., 2012; DESMET et al., 2009).

Durante a exposição do material ao plasma, as espécies ionizadas atingem a superfície do substrato, podendo formar novos grupos funcionais, este fenômeno ocorre pela quebra da ligação da cadeia molecular onde ocorre substituição ou a recombinação dos átomos que também podem ser produzidos (VILAPLANA et al., 2014). Desta forma grupos funcionais podem ser inseridos na superfície por meio da utilização do plasma de nitrogênio, oxigênio ou gases inertes. A incorporação de grupos funcionais a partir de tratamentos por plasma amplia diversas propriedades superficiais do material, aumentando a rugosidade, a molhabilidade e consequentemente a energia de superfície, sendo este mecanismo conhecido como

plasma *etching* (JACOBS et al., 2012; GEYTER et al., 2007) e pode ser observado esquematicamente na Figura 3.

Figura 3 – Esquema do processo de tratamento de superfície por plasma com a formação de grupos funcionais



Fonte: Adaptado de Jacobs et al. (2012, p. 1043).

A exposição ao plasma também confere a esterilização e modificação superficial, sendo dependente do tipo de plasma, energia e tempo de exposição (JUNKAR, 2011; SLEPICKA et al., 2012b), além de promover a bio-descontaminação dos materiais ou dispositivos utilizados na área médica (WOEDTKE et al., 2013). Outro aspecto relevante dos tratamentos por plasma é a sua condição sustentável, uma vez que não produz substâncias nocivas ao meio ambiente (VILAPLANA et al., 2014; DESMET et al., 2009) e proporciona fácil integração nos processos industriais (VILAPLANA et al., 2014; PIETRO, 2012) pois, pode ser realizado em equipamentos relativamente simples e baratos (SLEPICKA et al., 2013a), além de ser um processo industrial contínuo (VILAPLANA et al., 2014).

Atualmente, verifica-se a utilização de tecnologia de plasma em diversas áreas: modificações de superfície de dispositivos médicos, pré-tratamento de materiais poliméricos como melhoria dos processos de colagem e pintura, manufatura de materiais utilizados em embalagens, gestão de resíduos, microeletrônica, monitores de tela plana, entre outros, como pode ser observado esquematicamente na Figura 4 (WOEDTKE et al., 2013; WELTMANN et al., 2012).

Figura 4 – Emprego da Tecnologia do Plasma em diversas áreas tecnológicas

Fonte: Adaptado de Woedtke et al. (2013).

A utilização de plasma para tratamento de materiais ou dispositivos médicos está sendo intensamente pesquisada, principalmente aquelas relacionadas à modificações de superfície de biomateriais (WOEDTKE et al., 2013).

Estudos mostram que o tratamento por plasma altera a superfície do material, conforme Khorasani et al. (2008) que verificou que o ângulo de contato para o PLLA não tratado é de 85° , e após tratamento por plasma de O_2 por descarga de Rádio Frequência (RF) por 2 minutos, houve uma diminuição no ângulo de contato para aproximadamente 10° . Esta modificação amplia o crescimento e a fixação de células do tecido nervoso B65. Com a técnica de caracterização de Refletância Total Atenuada por Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR) foi possível confirmar a presença de oxigênio, contendo grupos funcionais carboxílicos, hidroxilas e carbonilas. Os diferentes parâmetros utilizados para o

tratamento por plasma das amostras de PLLA e poliéster podem ser observados na Tabela 1, que apresenta uma compilação dos principais parâmetros utilizados em estudos realizados por diferentes autores. Na Tabela 1 é também apresentado os principais parâmetros de tratamento realizados por Ferreira et al. (2009a) e Costa et al. (2008) com um plasma de O₂ para modificação superficial dos substratos poliméricos. Nesta tabela comparativa pode-se avaliar as alterações nos valores de molhabilidade e energia de superfície para as condições de tratamento estudadas.

Ainda, os autores Kasalkova et al. (2013) estudaram a biocompatibilidade de biopolímeros nanoestruturados tratados por plasma de Ar em amostras de PLLA e concluíram que o ângulo de contato é dependente do tempo de exposição da amostra ao plasma. De acordo com os estudos, a obtenção de ângulos de contato menores, características que melhoram a hidrofiliabilidade e adesão celular foram obtidas com tempos que variam de 5 a 75s enquanto que ângulos de contato mais elevados foram obtidos para tempos de tratamentos realizados entre 300 e 400s. Estes estudos corroboraram para a determinação dos parâmetros do atual trabalho, pois é perceptível que o tempo de exposição rege um papel importante na modificação da superfície e que acarreta em modificações morfológicas que contribuem para a adesão celular.

Tabela 1 – Comparação de diferentes parâmetros e resultados encontrados na literatura para o tratamento por plasma sobre substratos de PLLA e poliéster

Polímero	PLLA	PLLA	PLLA	PLLA	PLLA	PLLA	PLLA
Atmosfera	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂
Pressão	4,5x10 ⁻¹ torr	4,5x10 ⁻¹ torr	4,5x10 ⁻¹ torr	1,5x10 ⁻¹ torr	1,5x10 ⁻¹ torr	4,5x10 ⁻¹ torr	4,5x10 ⁻¹ torr
Vazão do Gás	***	***	***	***	***	***	***
Potência	30W	30W	30W	50W	100W	50W	100W
Tempo de exposição	0	2 min	4 min	2 min	10 min	2 min	10 min
Ângulo de contato - sem tratamento	85	85	85	106,2	106,2	106,2	106,2
Ângulo de Contato	10	23,2	26,6	44,5	23,1	50,8	30,2
Energia superficial - sem tratamento mJ/m ²	***	***	***	25,1	25,1	25,1	25,1
Energia Superficial mJ/m ²	***	***	***	60,3	71,7	56,4	65,2
Espessura do filme	300µm	300µm	300µm	***	***	***	***
Referência	(KHORASANI et al., 2008)			(FERREIRA et al., 2009)			
Polímero	PLLA	Poliéster	Poliéster	Poliéster	Poliéster	Poliéster	Poliéster
Atmosfera	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂
Pressão	6,0x10 ⁻¹ torr	1,019 torr	1,019 torr	1,019 torr	1,019 torr	1,019 torr	1,019 torr
Vazão do Gás	***	10cm ³ /min	10cm ³ /min	10cm ³ /min	10cm ³ /min	10cm ³ /min	10cm ³ /min
Potência	100W	0,0344W	0,0344W	0,0344W	0,0344W	0,0344W	0,0344W
Tempo de exposição	10 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Ângulo de contato - sem tratamento	106,2	55,3	55,3	55,3	55,3	55,3	55,3
Ângulo de Contato	32,2	15	16,2	12,5	12,4	12,6	14
Energia superficial - sem tratamento mJ/m ²	25,1	21	21	21	21	21	21
Energia Superficial mJ/m ²	64,3	56	55,3	57,5	57,8	57,8	55,2
Espessura do filme	***	48µm	48µm	48µm	48µm	48µm	48µm
Referência	(FERREIRA et al., 2009)		(COSTA et al., 2008)				

*** Sem definição

Fonte: O autor (2013)

Segundo Slepicka et al. (2012b), o ângulo de contato de 50° é o que apresenta melhor adesão celular, consequentemente melhor hidrofiliabilidade. Portanto os melhores parâmetros do tratamento por plasma alcançados por Ferreira et al. (2009a) foram para as amostras tratadas a potência de 50W, pressão de $1,5 \times 10^{-1}$ torr, e tempo de exposição das amostras ao plasma de O_2 de 2 minutos, em que se obteve como resultado $44,5^\circ$ para o ângulo de contato. Os autores concluíram que a superfície do polímero foi modificada como consequência de um aumento da energia superficial e consequente diminuição no ângulo de contato e mudanças morfológicas na superfície. Estas mudanças são provenientes do tratamento por plasma em função dos seus diferentes parâmetros (pressão, potência e tempo de exposição da amostra ao plasma), indicando que é possível modificar a superfície do PLLA por plasma de oxigênio deixando a superfície polimérica mais hidrofílica, resultado que contribui para adesão celular.

Ferreira et al. (2009a) também tratou as membranas de PLLA com plasma de N_2 e verificou que a utilização deste gás modificou as propriedades de superfície, aumentando a hidrofiliabilidade do material. Os parâmetros de tratamento utilizados neste estudo podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros e resultados do tratamento por plasma em membranas de PLLA utilizando plasma de N_2

Polímero	PLLA	PLLA	PLLA	PLLA	PLLA
Atmosfera	N_2	N_2	N_2	N_2	N_2
Pressão (torr)	$1,5 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$4,5 \times 10^{-1}$	$4,5 \times 10^{-1}$	$6,0 \times 10^{-1}$
Potência	50W	50W	50W	100W	100W
Tempo de exposição	2 min	10 min	2 min	10 min	10 min
Ângulo de contato - sem tratamento	$106,2^\circ$	$106,2^\circ$	$106,2^\circ$	$106,2^\circ$	$106,2^\circ$
Ângulo de Contato	$43,5^\circ$	$37,3^\circ$	$49,4^\circ$	$27,1^\circ$	$22,1^\circ$
Energia superficial - sem tratamento - mJ/m^2	25,1	25,1	25,1	25,1	25,1
Energia Superficial - mJ/m^2	61,7	65,1	57,1	72,9	70,9
Peso Molecular	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2009a)

Slepicka et al. (2012b) utilizou um plasma de Ar (Argônio) para o tratamento da superfície do PLLA, obtendo um ângulo de contato de $\cong 51^\circ$ e $\cong 53^\circ$ para diferentes parâmetros que podem ser observados na Tabela 3. O tratamento amplia a molhabilidade da superfície.

Através da técnica de microscopia de força atômica (MFA) foi constatado o aumento da média da rugosidade da superfície, obtendo melhores resultados para as amostras tratadas a uma potência de 3W, com valores de 6,9 nm para as amostras não tratadas e de 10,6 nm após tratamento, fator que contribui para proliferação e adesão celular, (SLEPICKA et al., 2012b). Os parâmetros utilizados neste estudo podem também ser observados na Tabela 3.

Ainda, foi averiguado por Slepicka et al. (2012b), por meio da espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS), que nas amostras de PLLA o plasma de Ar não contribui para concentração de oxigênio, porém para as amostras de Poli (4-metil-1-penteno) (PMP) houve um aumento da concentração de oxigênio e os grupos funcionais produzidos na superfície contribuíram para a redução do ângulo de contato. Os parâmetros do processo utilizados para este estudo podem ser observados na Tabela 3. Com os resultados obtidos por plasma de argônio sobre a superfície das amostras de PLLA, foi observado um aumento na proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMCs), onde as amostras não tratadas obtiveram cerca de 40 números de células ($\times 10^3/\text{cm}^2$) e as tratadas alcançaram valores próximos a 50 números de células ($\times 10^3/\text{cm}^2$). Estes valores foram alcançados utilizando-se potência de 8W, tempo de exposição da amostra ao plasma de 240s e 7 dias de cultivo. Os resultados de proliferação e adesão para o PMP foram de aproximadamente 10 números de células ($\times 10^3/\text{cm}^2$) para as amostras não tratadas e, após o tratamento os resultados chegaram perto de 60 números de células ($\times 10^3/\text{cm}^2$). Estes valores foram obtidos com especificações de 8W com 7 dias de semeadura e as amostras foram expostas ao plasma por 15s. Pode-se concluir, por meio deste estudo, que a modificação da superfície por plasma, altera as propriedades superficiais do material e contribui para a adesão e proliferação das células (VSMCs).

Tabela 3 – Parâmetros e resultados do tratamento por plasma de Ar em membranas de PLLA e PMP

Polímero	PLLA	PLLA	PMP	PMP
Atmosfera	Ar	Ar	Ar	Ar
Pressão (torr)	$7,5 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-2}$
Vazão do Gás	0,3L/s	0,3L/s	0,3L/s	0,3L/s
Potência	3W	8W	3W	8W
Tempo de exposição – segundos (s)	4 min	4 min	4 min	4 min
Ângulo de contato - sem tratamento	70,5 °	70,5 °	$\cong 105$ °	$\cong 105$ °
Ângulo de Contato	$\cong 53$ °	$\cong 51$ °	$\cong 42$ °	$\cong 31$ °
Energia superficial - sem tratamento mJ/m ²	$\cong 32,5$	$\cong 32,5$	$\cong 22$	$\cong 22$
Energia Superficial - mJ/m ² em 0 dias	$\cong 60$	$\cong 67,5$	$\cong 75$	$\cong 70$
Rugosidade - sem tratamento (nm)	6,9	6,9	27,6	27,6
Rugosidade após tratamento (nm)	10,6	9,4	28,5	26,9
Espessura do filme	50µm	50µm	50µm	50µm
% de átomos de Carbono - sem tratamento	***	66,1	***	99,7
% de átomos de Carbono (10 dias)	***	67,1	***	71,4
% de átomos de Oxigênio- sem tratamento	***	33,9	***	0,3
% de átomos de Oxigênio (10 dias)	***	32,9	***	28,6
Peso Molecular	***	***	***	***

*** sem definição

Fonte: Adaptado de Slepicka et al. (2012b)

Liu et al. (2014) trataram a superfície de nanofibras de PLLA com plasma de O₂, em que o filme de PLLA foi obtido por eletrofiação. Após o tratamento, constatou-se uma melhora na adesão celular das células tronco mesenquimais. Esta melhora ocorreu devido a diminuição do ângulo de contato e aumento dos grupos funcionais contendo oxigênio. Os parâmetros utilizados para este processo estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros e resultados de tratamento por plasma de O₂ em membranas de PLLA

Polímero	PLLA
Atmosfera	O ₂
Pressão (torr)	$9,98 \times 10^{-1}$
Tempo de exposição (s)	1 min
Ângulo de contato - sem tratamento	128,2 °
Ângulo de Contato ($\cong$)	$\cong 48,5$ °

Fonte: Adaptado de Liu et al. (2014)

As membranas tratadas apresentaram uma diminuição na ligação de hidrocarbonetos saturados C-C e um aumento de 1,87% na concentração da ligação C-O e 1,45% nas ligações O=C-O. A diminuição na concentração de carbono e o

aumento de oxigênio contribuíram para inserir na superfície do substrato grupos funcionais contendo oxigênio. Desta forma, a introdução de grupos polares na superfície das membranas contribuiu para diminuição do ângulo de contato, implicando na mudança da hidrofiliabilidade (LIU et al. 2014; JACOBS, 2012; CHEN; SU, 2011). Em decorrência a adesão das células estaminais em nanofibras de PLLA foi significativamente melhorada após o tratamento por plasma de O₂.

Com base no estado da arte, observa-se que o tratamento por plasma tem um papel importante na modificação de superfície dos polímeros. Foi constatado que as modificações químicas, morfológicas e físicas foram alteradas em função da potência e do tempo e de exposição ao plasma.

As propriedades morfológicas e rugosas foram melhoradas, obtendo uma morfologia com maiores contornos, picos mais profundos e ranhuras, que também contribuíram para o aumento da rugosidade. A energia de superfície aumentou em função da introdução de grupos funcionais contendo oxigênio na superfície, consequentemente, diminuindo o ângulo de contato em que este comportamento foi observado para maiores potências e tempo de exposição, contrapondo os resultados de Kasalkova et al. (2013).

Todas as modificações provocadas pelo tratamento por plasma tiveram um papel importante na viabilidade celular, aumentando a adesão e proliferação das células, porém a propriedade que mais influenciou na viabilidade celular foi a hidrofiliabilidade do material.

Embora existam inúmeros trabalhos de modificação superficial por plasma, a utilização do peróxido de hidrogênio não está relatada na literatura.

Devido a estes fatores, a modificação das superfícies poliméricas por plasma está ganhando notoriedade na área de biomateriais.

3 METODOLOGIA

A metodologia empregada no desenvolvimento do presente trabalho está dividida em quatro etapas principais: obtenção das membranas de poli (L-ácido láctico) por evaporação de solvente; tratamento da superfície por plasma de peróxido de hidrogênio; caracterização térmica, física e morfológica das amostras com e sem tratamento e verificação da viabilidade celular em amostras que apresentam características hidrofílicas. As análises de XPS, DSC, MEV, EDX, MFA, TG, ^{13}C e ^1H RMN e ângulo de contato foram realizadas em uma única membrana, porém, para a análise de viabilidade celular foi obtida outra membrana.

3.1 MATERIAIS

O polímero utilizado para obtenção da membrana e posterior modificação da superfície por tratamento por plasma foi o Poli (L-ácido Láctico) (PLLA), sintetizado no laboratório da PUC/Sorocaba, com massa molar ponderal média de $M_w = 278,186 \text{ g.mol}^{-1}$.

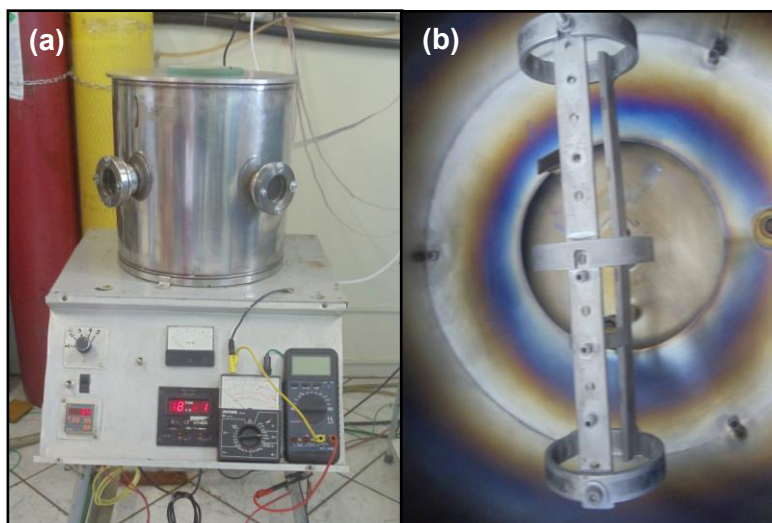
3.2 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas foram obtidas a partir da técnica de evaporação de solvente a temperatura ambiente. O PLLA foi dissolvido em clorofórmio (CHCl_3) (Fmaia) com teor máximo de 99,8% em uma solução de 10% (m/m). Este reagente foi utilizado devido à solubilidade do PLLA no mesmo (DRUMOND; WANG; MOTHÉ, 2004). A solução ficou 24 horas sob agitação na temperatura ambiente até sua completa homogeneização. Em seguida, as soluções foram vertidas em um molde de vidro (80x30x1,5mm) e acondicionadas em uma cuba de vidro em atmosfera contendo clorofórmio, evitando a evaporação rápida deste. As membranas foram mantidas neste sistema por 24 horas e após este período os filmes foram retirados das placas de vidro e colocados em uma estufa a vácuo a temperatura de 40°C por 4 horas para evaporação total do solvente. Depois da secagem, as membranas foram armazenadas em um dessecador em vácuo para posterior tratamento. As membranas apresentaram $200\mu\text{m}$ de espessura.

3.2.1 Tratamento da superfície por plasma

Algumas membranas de PLLA, obtidas por evaporação de solvente, foram tratadas por plasma de peróxido de hidrogênio fazendo uso de um equipamento para geração de plasma em corrente contínua (DC) no Laboratório de Física de Plasmas do Departamento de Física da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. A ilustração do equipamento utilizado para realização do tratamento por plasma é representada na Figura 5(a). A Figura 5(b) apresenta o detalhe do suporte onde as membranas foram fixadas.

Figura 5 - (a) Ilustração do equipamento de plasma utilizado para o tratamento das membranas de PLLA e (b) porta amostras



Fonte: O autor (2013)

As amostras foram tratadas utilizando um sistema que consiste de uma fonte de corrente contínua, sistema de vácuo ($1,5 \times 10^{-1}$ torr) M18 da Edwards, com tensão de saída máxima de 400V acoplada capacitivamente ao reator. O reator consiste de cilindro de aço inox com dois flanges em sua lateral.

Durante o tratamento das membranas de PLLA foram mantidas constantes a pressão do gás de trabalho e a tensão da fonte de potência, sendo modificado o tempo de exposição ao plasma. Basicamente, os parâmetros de tratamento utilizados para o presente estudo estão na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros do processo de plasma utilizado para modificação da superfície do PLLA

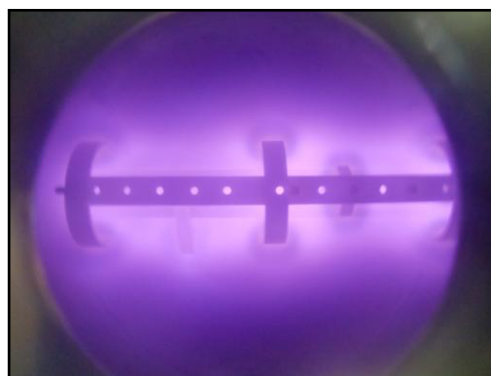
Membranas	Pressão (torr)	Temperatura (°C)	Tensão (V)	Corrente Elétrica (A)	Tempo (min.)
1	$1,5 \times 10^{-1}$	27	400	0,2	1
2	$1,5 \times 10^{-1}$	28	400	0,2	2
3	$1,2 \times 10^{-1}$ a $1,5 \times 10^{-1}$	28	400	0,2	3
4	$1,5 \times 10^{-1}$	27	400	0,2	4
5	$1,2 \times 10^{-1}$	27	400	0,2	5

Fonte: O autor (2013)

A escolha do gás de peróxido de hidrogênio para a realização deste trabalho justifica-se pelo fato de ampliar-se, durante a formação do plasma de H_2O_2 , o número de possíveis grupos funcionais que irão interagir com a superfície. Além disso, este tipo de molécula é amplamente utilizada para a esterilização de materiais e desta forma, por se tratar do estudo de obtenção de um biomaterial, considera-se interessante o estudo da viabilidade da utilização do gás H_2O_2 no tratamento deste tipo de superfície. Ainda, verifica-se na literatura poucos estudos utilizando este tipo de plasma, sendo mais um fator motivacional para o emprego deste gás como plasma para o tratamento das membranas de PLLA.

A descarga luminescente gerada durante o tratamento com plasma de peróxido de hidrogênio está representada na Figura 6.

Figura 6 – Imagem referente a descarga luminescente gerada durante o tratamento da membrana de PLLA por plasma de peróxido de hidrogênio



Fonte: O autor (2013)

As membranas modificadas (MM) superficialmente e as não modificadas (MN) foram caracterizadas por ensaios térmicos, físico-químico e morfológico.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

As técnicas de caracterização foram utilizadas com o intuito de verificar a influência do plasma de peróxido de hidrogênio na modificação das membranas e verificar qual tratamento oferece maior viabilidade celular.

3.3.1 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raio-X (XPS)

A análise de XPS também conhecida como Espectroscopia de Elétrons para Análise Química (ESCA) foi utilizada para averiguar a composição química da camada superficial do material.

As medições de XPS foram realizadas usando um espectrômetro Specs (modelo Phoibos 150 HAS 3500) com ultra vácuo de 10^{-8} torr. Foi usada a linha K_{α} do alumínio ($h\nu = 1486,6$ eV) com potência de radiação de 40 W. Os espectros foram registrados com analisador de energia com passagem de 40 eV e resolução de 0,5 eV. As energias de ligação foram referenciadas para o hidrocarboneto (C-C e / ou C-H) C 1s e O1s com pico fixado em 284,8 eV. As análises foram realizadas na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O intuito desta análise foi verificar se o plasma influencia a temperatura de transição vítrea (T_g) e no grau de cristalinidade do polímero. Este ensaio foi realizado em um equipamento da TA *Instruments* Q20, sendo realizado no laboratório de materiais da UNISOCIESC. Amostras das membranas pesando entre 4 a 8 mg foram condicionadas em placas de alumínio e aquecidas em atmosfera inerte de nitrogênio, de 10°C a 200°C com uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Raio-X por Energia Dispersiva (EDX)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi empregada para verificar se houve modificação morfológica na superfície das membranas após tratamento por plasma.

A análise por EDX foi realizada para identificar os átomos presentes na molécula do material estudado, podendo ser determinado qualitativamente e quantitativamente.

As amostras das superfícies das membranas tratadas e não tratadas foram metalizadas com ouro (SputterCoater BAL-TEC SCD 050) e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA 860) operado a 10kV. A quantificação dos elementos químicos presentes na superfície foi realizada por EDX, com o mesmo microscópio e igual aceleração. O ensaio foi realizado no laboratório da UNICAMP.

3.3.4 Microscopia de Força Atômica (MFA)

A análise de microscopia de força atômica foi realizada para avaliar mudanças na morfologia de superfície e na rugosidade do PLLA causado pelo tratamento por plasma.

As análises de MFA foram realizadas na UDESC utilizando Nanosurf CETR, operando no modo contato em condições ambiente (25°C e umidade relativa de 50%). As imagens foram adquiridas utilizando um cantilever de silício, com constante de mola 0,2N/m, frequência de ressonância 13 kHz, velocidade de varredura de 1s por linha, em uma escala máxima de 10x10µm. A análise de rugosidade e o processamento das imagens foram realizadas utilizando o software Gwyddion.

3.3.5 Termogravimetria (TG)

Esta análise foi realizada para avaliar a influência do plasma na temperatura de início de degradação (T_{onset}) na membrana de PLLA.

As análises termogravimétricas foram feitas em um instrumento da TA Instruments modelo Q50, no laboratório de materiais da UNISOCIESC. A taxa de aquecimento empregada foi de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com temperatura de 25 a 600°C .

3.3.6 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ^1H) e RMN ^{13}C

Esta técnica foi utilizada para verificar se o plasma provocou alterações na microestrutura química das membranas de PLLA.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em um aparelho Bruker 500MHz (Laboratório de Química da UNICAMP), usando clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente. Os deslocamentos químicos foram atribuídos com relação aos prótons de clorofórmio-d (7,26 ppm) e ao ^{13}C (76,5 ppm). Os espectros de RMN foram tratados usando o programa Mestre-C (Magnetic Resonance Companion, NMR Data Processing Program).

3.3.7 Ângulo de Contato

Utilizada para identificar o grau de molhabilidade (hidrofilicidade/hidrofobicidade) da amostra. As análises foram realizadas no Laboratório de Física de Plasmas da UDESC, em que as medidas de ângulo de contato foram obtidas com o goniômetro (Ramé-Hart Instrument) em temperatura ambiente. Os ângulos de contato do lado direito e esquerdo da gota foram calculados automaticamente, por meio de software DROP image Advanced instalado em um computador, acoplado ao equipamento. Uma gota de água ($15\mu\text{L}$) foi inserida na superfície com o auxílio de uma seringa. Medidas do ângulo de contato também foram mensuradas para avaliação da energia de superfície da amostra. As medições foram realizadas medindo-se o ângulo de contato (θ) para o componente polar (água) e um componente menos polar (glicerol) (SLEPICKA et al., 2012b).

3.3.8 Viabilidade Celular

A membrana de PLLA não tratada e as membranas modificadas por plasma e com características de molhabilidade (1 e 2 minutos) adequada para aplicação em

dispositivos médicos foram escolhidas para estudo comparativo de viabilidade celular devido aos valores encontrados na análise de ângulo de contato. A análise da viabilidade celular foi realizada com células osteoblásticas (o responsável pela formação óssea), para verificar a adesão celular. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Biomateriais, do Centro de Ciências Médicas e Biológicas da PUC-SP.

3.3.8.1 Adesão celular em membranas de PLLA modificadas e não tratadas

Para a análise da adesão celular (método de Mosmann (1983)), as membranas foram colocadas no fundo de placas de cultura com 96 poços (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA). Além das membranas poliméricas foram utilizados, respectivamente, discos de teflon e a própria placa de poliestireno como controles negativos e positivos nos ensaios de adesão. Todos os poços receberam 100µl de meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino, sendo incubados durante 24 horas a 37°C em atmosfera saturada de vapor e 5% CO₂. Após a incubação o meio foi retirado e inoculado com 100µl de suspensão celular (105 células/ml), em meio DMEM com 10% de SFB por poço, incubando-se por mais 2 horas nas mesmas condições. Após cultivo, o meio foi retirado e os poços lavados novamente com o meio e em seguida adicionado 100µl de meio cultivo contendo 50 µl de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium (MTT) (5mg/ml) incubando-se nas mesmas condições de cultivo durante 4 horas. Após este tempo, foi adicionado em cada poço 200 µl de DMSO e 25 µl de tampão Glicina/Sorensen. Em seguida, alíquotas de 180 µl das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância nas alíquotas foi medida em um leitor de microplacas Multiskan Bichromatic Version 1.06, utilizando-se comprimento de onda de 570 nm. Como tratamento estatístico foi realizado o teste Análise de Variância (ANOVA) conforme método apresentado por Montgomery; Runger (2003).

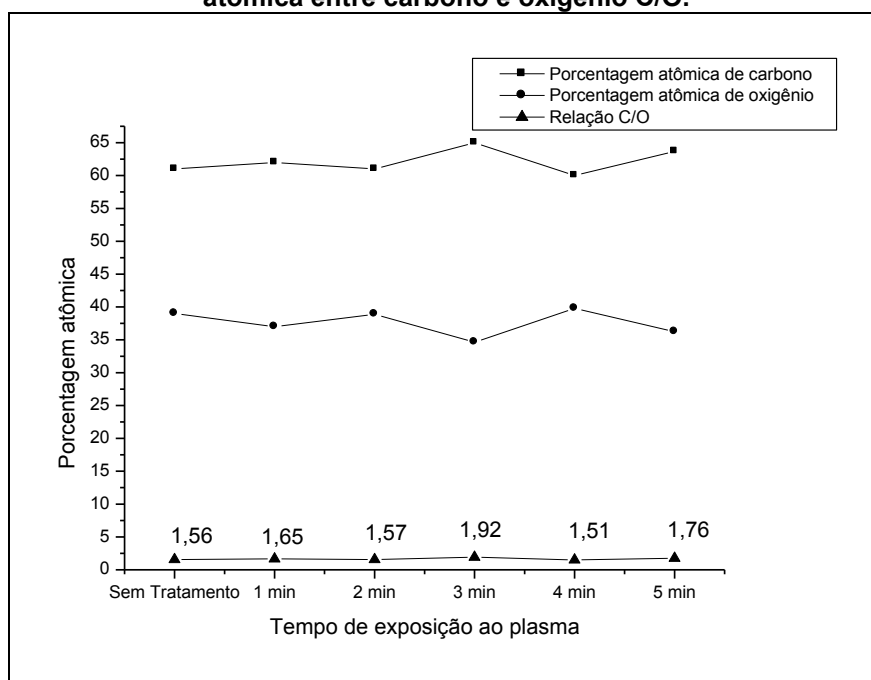
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir das membranas de PLLA não modificada e modificadas por plasma de H_2O_2 . Os principais resultados das análises de XPS, DSC, MEV/EDX, MFA, TG, RMN, ângulo de contato e viabilidade celular realizado sobre as amostras são expostos na sequência.

4.1 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RÁIO-X (XPS)

A análise de XPS foi realizada para examinar as mudanças da estrutura e da composição química das amostras de PLLA após tratamento por plasma de peróxido de hidrogênio em comparação com as membranas não tratadas. A porcentagem atômica de carbono (C) e de oxigênio (O) antes e após a modificação de superfície pode ser observada na Figura 7.

Figura 7 – Porcentagem atômica de carbono C(1s) e oxigênio O(1s) na camada superficial do PLLA não tratado e tratado por plasma em 1, 2, 3, 4, e 5 minutos e relação da concentração atômica entre carbono e oxigênio C/O.



Fonte: O autor (2014)

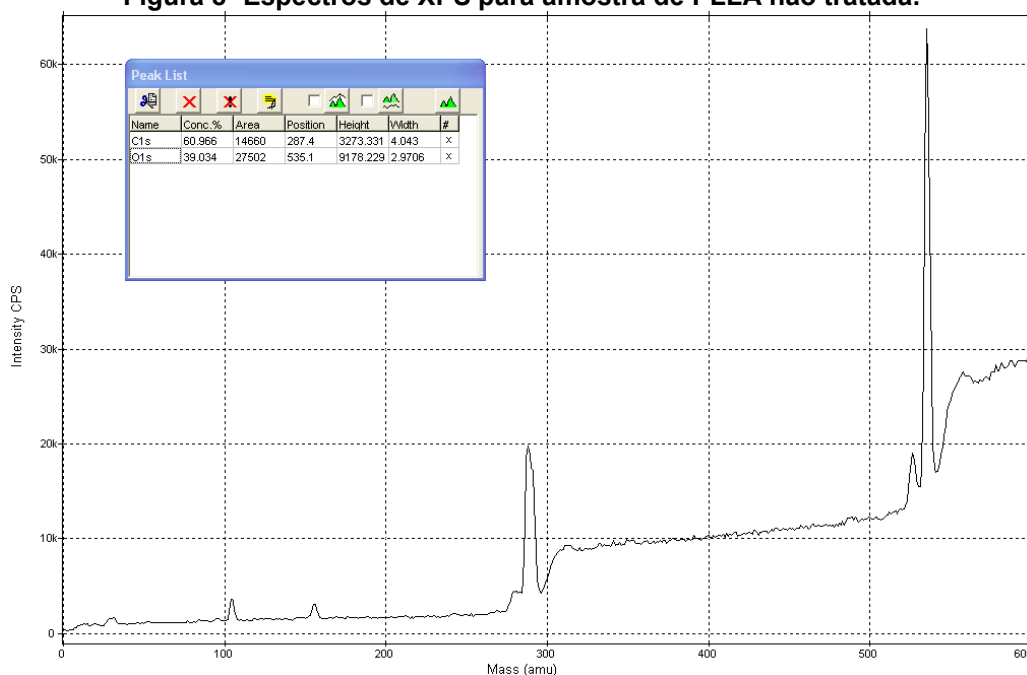
Usualmente, o tratamento de polímeros com plasma contendo oxigênio favoreceria o aumento da concentração deste elemento em sua cadeia polimérica.

No entanto, a cadeia polimérica de PLLA contém o elemento oxigênio em sua estrutura, desta forma, o tratamento por plasma converge para a diminuição da concentração deste elemento na camada superficial (KASALKOVA et al., 2014; RIMPELOVÁ et al., 2014). Isto ocorre devido a clivagem da cadeia polimérica e ablação na superfície do substrato ocasionada pelo tratamento. Simultaneamente a esta modificação, ocorre a formação de centros ativos como, por exemplo, de radicais, que podem reagir com o gás de peróxido de hidrogênio e formar um novo grupo químico (KASALKOVA et al., 2014).

É possível observar na Figura 7 que a concentração de carbono aumenta, bem como a relação C/O, porém, a concentração de oxigênio diminui. Este comportamento está relacionado com a quebra das ligações químicas (C-H, C-C, C-O), com a oxidação e ablação, uma vez que, para tempos menores de exposição ao plasma o efeito que predomina é a degradação, ou seja, quebra das ligações e oxidação e para tempos maiores de exposição a ablação é predominante. Este comportamento ocorre devido à introdução de grupos funcionais na superfície do substrato, como carbonila, carboxila e hidroxila, que são criados na superfície do polímero durante o tratamento por plasma (RIMPELOVÁ et al., 2014; SLEPIKA; MICHALJANIOVÁ; SVORCÍK, 2013c). A reorientação dos grupos polares na superfície da cadeia leva a diminuição da concentração de oxigênio quando comparado com a amostra sem tratamento (SLEPIKA; MICHALJANIOVÁ; SVORCÍK, 2013c).

O espectro da amostra analisada por XPS para a amostra não tratada está representada na Figura 8. Por meio desta figura é possível identificar dois picos para as amostras não modificadas, um correspondente ao pico do C(1s) em 285 eV e O(1s) localizado em 533 eV. Tais picos ocorrem devido a estrutura química do PLLA apresentar o elemento oxigênio em sua cadeia polimérica, sendo que tal feito também foi verificado por Vilaplana et al. (2014).

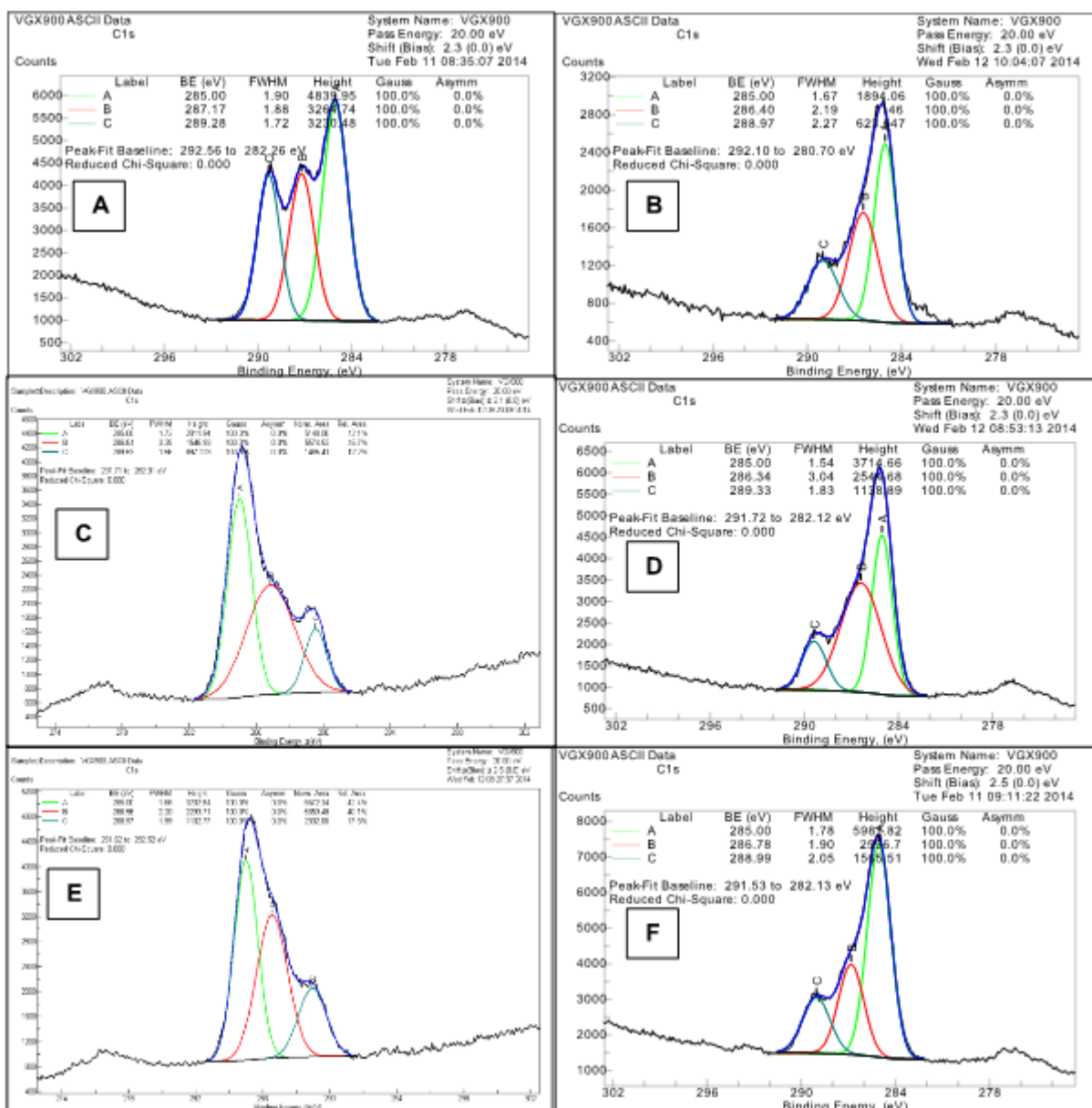
Figura 8- Espectros de XPS para amostra de PLLA não tratada.



Fonte: O autor (2014)

Pode-se visualizar na Figura 9 os espectros do carbono deconvoluídos para amostra sem tratamento Figura 9(a), pico C(1s), em que três diferentes picos foram decompostos, o principal deles está em 285,0 eV correspondendo a ligação (C-C) e (C-H), um pico em 287,17 eV que corresponde a ligação (C-O-C/C-OH) e o terceiro pico em 289,28 eV (C=O/O-C=O), tais informações corroboram com Yue et al. (2015) e Sarapirom et al. (2014), pois os mesmos encontraram os mesmos picos característicos do PLLA.

Figura 9 - Espectro do carbono deconvolvido da amostra de PLLA modificadas e não modificadas (A) PLLA sem tratamento, (B) 1min, (C) 2min , (D) 3min, (E) 4min e (F) PLLA 5min.

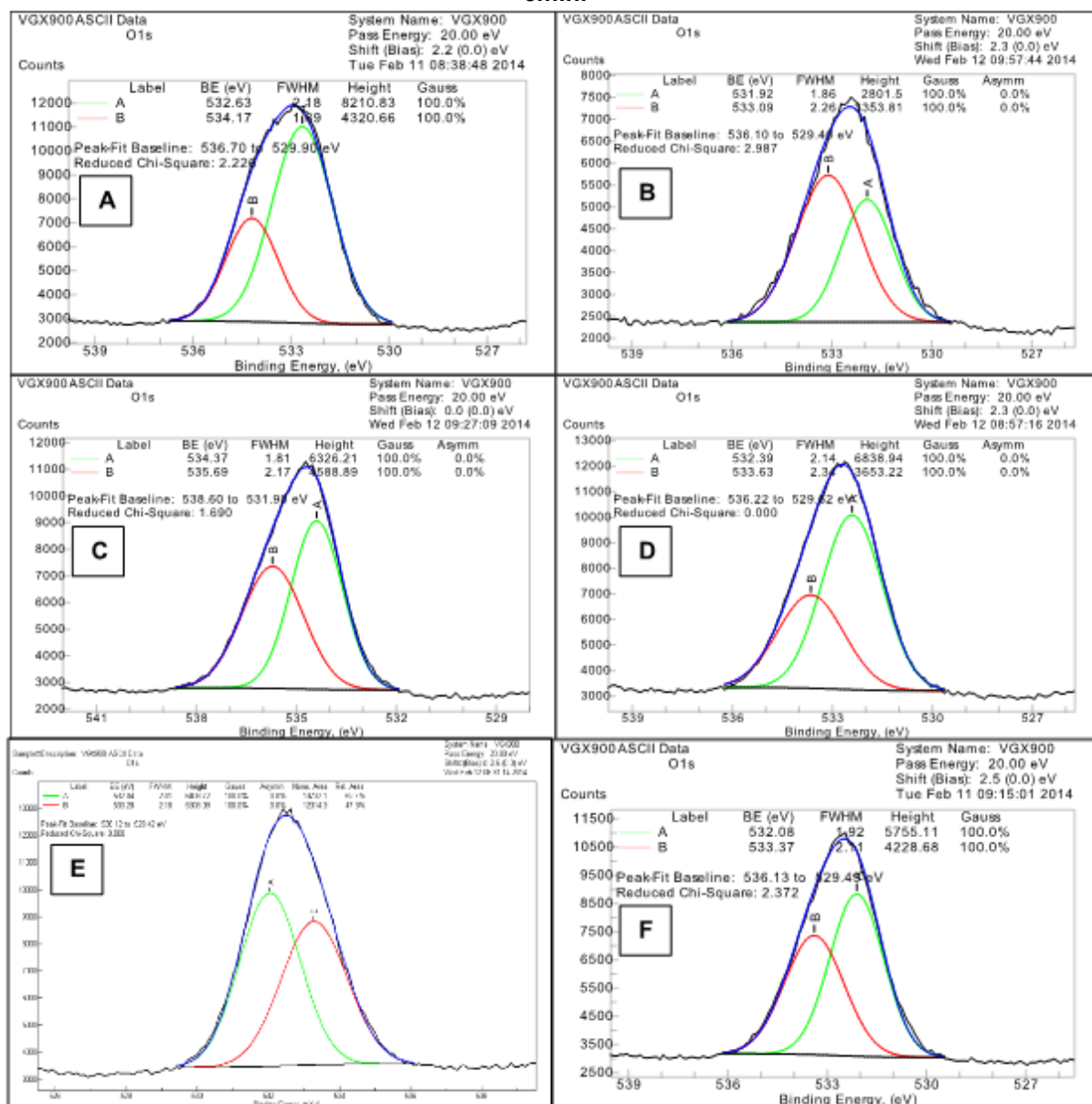


Fonte: O autor (2014)

É possível identificar que para todas as amostras tratadas, o pico em 285,0 eV (C-C e C-H) foi o que apresentou maior intensidade comparado aos outros dois picos, isto indica que os centros ativos criaram preferencialmente ligações saturadas entre carbonos sobre a superfície elevando a relação C/O.

Na Figura 10 são apresentados os espectros do oxigênio deconvolvidos das amostras de PLLA sem tratamento e amostras tratadas por plasma de H_2O_2 .

Figura 10 – Espectros de XPS do oxigênio deconvoluído da amostra de PLLA modificadas e não modificadas (A) PLLA sem tratamento, (B) 1min, (C) 2min , (D) 3min, (E) 4min e (F) PLLA 5min.



Fonte: O autor (2014)

Comparando o espectro da amostra não tratada de PLLA da Figura 10 (A) com os demais espectros das amostras de PLLA tratados por plasma da Figura 10 (B-F) é possível visualizar que a área abaixo das curvas diminui para O (1s), o que também indica uma menor concentração de grupos contendo oxigênio. Este comportamento está de acordo com os relatos de Demina et al. (2012).

KASALKOVA et al. (2014), estudou a análise de XPS em 0° (6-8 camadas atômicas) e 81° (1-2 camadas atômicas), para análise com ângulo de emissão de elétrons de 81° quase paralelo a camada superficial, foi observado que há uma

quantidade muito menor de oxigênio na superfície do que nas camadas mais profundas. Kolska et al. (2014) também estudou membranas poliméricas tratadas por plasma de argônio e enxertado com *cysteamine* e determinou a concentração de elementos na superfície do polímero por XPS com eixos detectores em diferentes ângulos (0° e 81°), e observou que a concentração em átomo de oxigênio foi maior para as amostras analisadas sob o ângulo de 0° (6-8 camadas atômicas).

A partir destes resultados, supõe-se que o tratamento por plasma permitiu a difusão de oxigênio para dentro das cadeias de PLLA e que a superfície é mais oxidada em camadas mais profundas.

4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Esta técnica é caracterizada pela mudança física ou química de um material que sofre alteração da entalpia promovida por uma variação controlada da temperatura. Esta análise permite determinar as propriedades térmicas do material, principalmente as temperaturas de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_f), entalpia de fusão (ΔH_f), temperatura de cristalização (T_c) e entalpia de cristalização (ΔH_c) (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009; CANEVAROLO Jr., 2007; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). As características físicas, como capacidade calorífica, densidade, propriedade mecânica são dependentes das temperaturas de transição, a T_g e T_f são importantes parâmetros físicos que permitem prever o comportamento do polímero (EMNA, 2013).

As curvas de DSC traçadas na Figura 11(A) são referentes ao primeiro aquecimento das membranas tratadas por plasma para os tempos de 1 a 5 minutos e para as membranas não modificadas. Os resultados desta análise estão sintetizados na Tabela 6.

O grau de cristalinidade foi avaliado de acordo com a Equação 1:

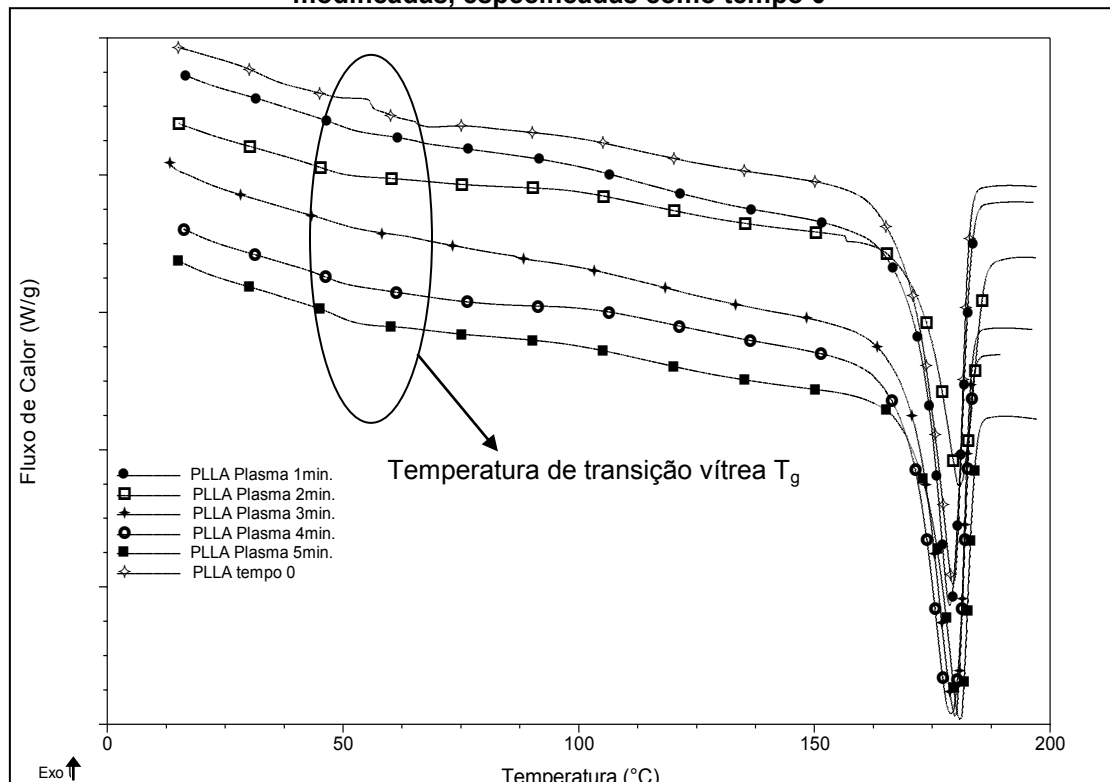
$$X = [\Delta H_f] / [\Delta H_f^0] \times 100 \quad (1)$$

Em que: X = grau de cristalinidade;

ΔH_f = entalpia de fusão;

ΔH_f^0 = entalpia de fusão para o PLLA hipoteticamente 100% cristalino (93,7 J.g⁻¹) (MOTTA; DUEK, 2006).

Figura 11 – Curvas de DSC (temperatura de transição vítrea e fusão) para as membranas de PLLA tratadas por plasma em diferentes tempo de exposição (1 a 5 minutos) e membranas não modificadas, especificadas como tempo 0



Fonte: O autor (2013)

De acordo com as curvas de DSC representadas na Figura 11, não se notam mudanças significativas para a temperatura de fusão (a qual as regiões cristalinas são fundidas).

Na Tabela 6, observa-se que a temperatura de transição vítrea aumentou para a membrana tratada por plasma de 1 minuto, isto indica que foi necessária uma maior energia térmica para que houvesse mobilidade da fase amorfa na cadeia polimérica, a análise de Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raio-X (XPS) nos mostra que a quantidade de oxigênio diminui no primeiro minuto de tratamento por plasma, conforme pode ser visualizado na Figura 7, isto acontece devido aos menores tempos de exposição, onde predomina a quebra das ligações e oxidação.

Portanto, supõe-se que o oxigênio do éster possa ter sido rearranjado, criando ligações cruzadas e reduzindo a mobilidade da cadeia, ou substituído, pois o oxigênio é um elemento que flexibiliza a cadeia polimérica, e neste primeiro momento houve a diminuição de sua concentração, o que provocou a rigidez do material (CANEVAROLO Jr., 2007). O aumento da rigidez influencia no aumento da T_g (SHENG et al., 2015).

Tabela 6 – Resultados encontrados na análise de DSC para as membranas de PLLA MM por plasma e MN.

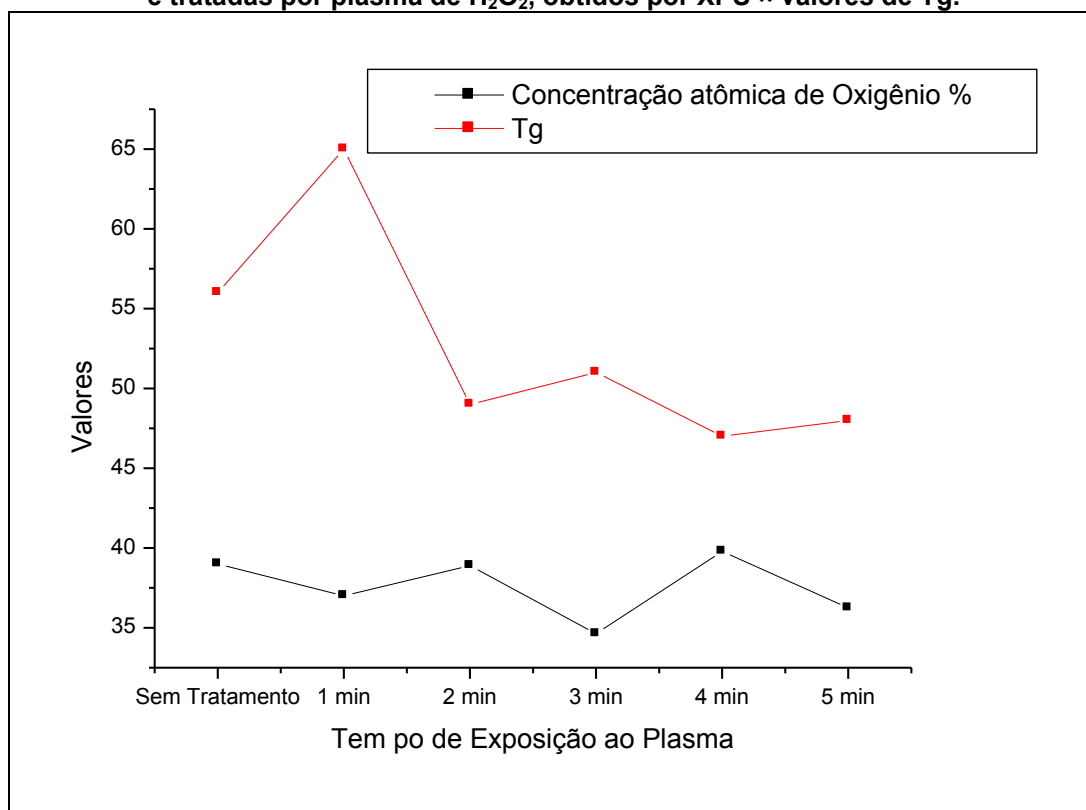
Tempo	T_g (°C)	T_c (°C)	T_f (°C)	ΔH_f (J/g)	%X_c
0 min.	56	96	180	30	32
1 min.	65	97	179	29	31
2 min.	49	97	181	19	20
3 min.	51	97	180	28	30
4 min.	47	98	179	30	32
5 min.	48	96	181	20	21

Fonte: O autor (2013)

Para os demais tempos de tratamento a T_g sofre oscilações, aumentando e diminuindo, a diminuição ocorre devido a passagem do estado vítreo, para o estado mais flexível, menos ordenado (SHENG et al. 2015; CANEVAROLO Jr., 2007), consequentemente o grau de cristalinidade também diminui, indicando o aumento do volume livre e a diminuição da T_g, pois é favorecida a flexão da cadeia polimérica.

Este evento de oscilações nos valores da T_g pode ser confirmado através da análise de XPS, em que ocorre a mesma variação com a concentração de átomos de oxigênio, à medida que se repõe oxigênio na superfície, diminui-se a T_g, e no momento em que a T_g aumenta, a concentração do elemento oxigênio é removido da superfície do PLLA, conforme pode ser observado na Figura 12. A diminuição da T_g para os tempos de tratamento 2 a 5 minutos está associada com a possível difusão do oxigênio na cadeia do PLLA, visto que se tem um maior tempo de tratamento, desta forma, o oxigênio permitiu a flexibilidade da cadeia polimérica (CANEVAROLO Jr., 2007).

Figura 12 – Valores da concentração atômica de Oxigênio (%) para as membranas não tratadas e tratadas por plasma de H_2O_2 , obtidos por XPS × valores de Tg.



Fonte: O autor (2014)

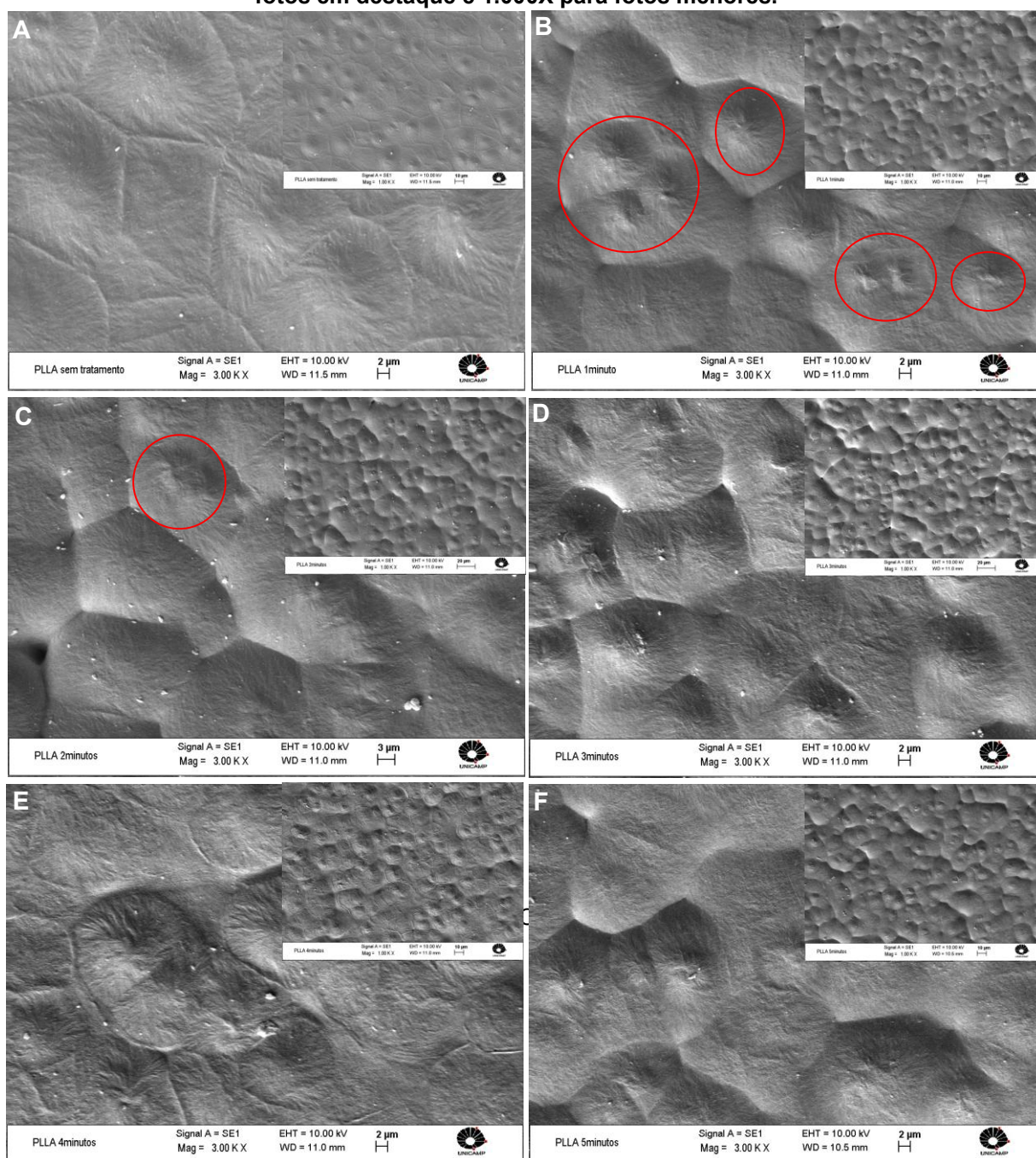
A cristalinidade teve modificações significativas apenas para os tempos de 2 e 5 minutos de tratamento, onde o polímero obteve uma redução de 38% e 34% respectivamente. A interferência do tratamento ocasionou a ablação, quebra de ligações e promoveu o aumento do volume livre, aumentando a desordem do sistema, não favorecendo a formação dos cristais, apresentando uma fase amorfa predominante. Conforme Canevarolo Jr. (2007), outro fator que contribui para a diminuição da cristalinidade é a irregularidade conformacional, que impede o empacotamento regular do material.

A redução da cristalinidade é um ponto negativo em relação às propriedades mecânicas, pois à medida que se diminui a cristalinidade as propriedades mecânicas também diminuem, porém, essa condição é favorável quando se deseja a rápida biorreabsorção do PLLA em aplicações biomédicas específicas (EMNA, 2013).

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROMETRIA DE RAIO-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDX)

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura das membranas não modificadas e após tratamento por plasma podem ser observadas na Figura 13.

Figura 13 – Imagens de MEV das membranas de PLLA não modificada (A) e modificadas por plasma de H_2O_2 por 1min (B), 2min (C), 3min (D), 4min (E) e 5min (F). Magnitude: 3.000X para fotos em destaque e 1.000X para fotos menores.



Fonte: O autor (2013)

Pode-se constatar através da análise de MEV que a membrana de PLLA sem tratamento, Figura 13(A) apresenta uma superfície lisa e homogênea, com pouca saliência, não sendo observada nenhuma descontinuidade na superfície comparada as membranas que foram modificadas por plasma de H_2O_2 .

Nas membranas tratadas por plasma de H_2O_2 com 1 minuto de tratamento, Figura 13(B) é possível verificar a formação de sulcos na superfície com a formação de contornos com uma maior intensidade, sendo observado em alguns gomos a presença de picos, com aparência de pequenos cristalitos, características que não se observam na amostra sem tratamento. Esta estrutura pode ser observada também nas Figuras 13(B e C) que estão destacadas.

Na Figura 13(C) a membrana modificada a partir da exposição ao plasma de H_2O_2 por 2 minutos, observa-se que a superfície da amostra apresenta modificações similares às da amostra exposta ao plasma de 1 minuto, porém, a quantidade de gomos bem como a presença de regiões cristalinas diminui. Este fenômeno pode estar relacionado com o tempo de exposição ao plasma, que não foi suficiente para que ocorresse a ablação da região amorfa, não favorecendo a formação de cristalitos na superfície e diminuindo o grau de cristalinidade.

As membranas com tempo de exposição ao plasma de 3 minutos Figura 13(D) apresentam uma superfície com maior número de gomos e ranhuras mais definidas, isto pode estar relacionado com a remoção de material ocasionada pelo tratamento por plasma, provocando mudanças na rugosidade superficial do polímero, comparada aos tratamentos anteriores.

Além disso, é possível observar uma superfície semelhante a esferulitos. Tal comportamento foi verificado por Kasalkova et al. (2014), que estudou membranas de PLLA e PHB tratadas por plasma de Ar^+ e subsequente tratamento com água e acetona, os autores observaram uma modificação na superfície dos substratos e verificaram que o tratamento por plasma deixou a superfície com aparência de uma estrutura cristalina.

Nota-se na amostra de 4 minutos, Figura 13(E), que a superfície desta membrana aparenta a formação de esferulitos, porém, para este substrato a estrutura esferulítica está mais acentuada que na amostra tratada durante 3 minutos.

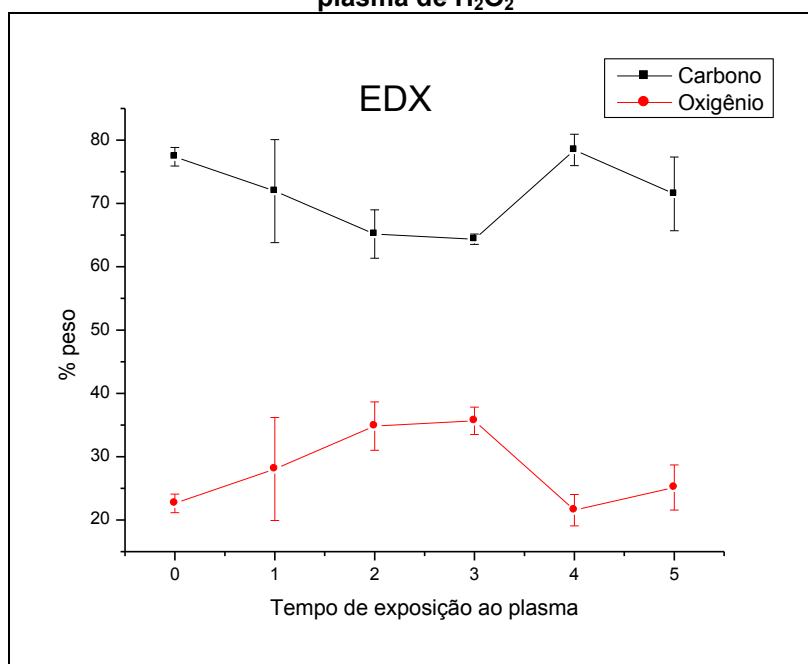
Para as membranas exposta ao plasma de 5 minutos, Figura 13(F), verifica-se uma diminuição dos números de gomos, bem como, uma redução na intensidade dos veios, este efeito pode estar relacionado com o maior tempo de exposição ao

plasma, ataque periódico e repetitivo. O tempo de exposição ao plasma pode organizar e desorganizar a estrutura cristalina.

Conforme estudado por Ferreira et al. (2009a), o tratamento de superfície por plasma altera as membranas e auxilia na adesão e proliferação celular. Após o tratamento por plasma de O_2 e N_2 nas membranas de PLLA, pôde-se observar uma superfície homogênea, porém, mais rugosa, devido ao processo de ablação que o tratamento por plasma ocasiona.

De forma complementar, foram realizadas sobre as membranas estudadas análises de EDX para avaliação quantitativa dos teores de oxigênio e carbono presentes na superfície, de forma a verificar a influência do plasma na alteração química da amostra polimérica. Os valores obtidos pela técnica de EDX estão apresentados na Figura 14 que relaciona o teor de C e O para cada uma das amostras tratadas. Os valores encontrados foram obtidos a partir da média de no mínimo 3 pontos nas amostras de PLLA.

Figura 14 – Teor de Carbono e Oxigênio das membranas de PLLA antes e após tratamento por plasma de H_2O_2



Fonte: O autor (2014)

Através da análise de EDX pode-se comprovar um aumento da quantidade de oxigênio na amostra tratadas por plasma em diferentes tempos (1, 2 e 3 min) sendo este um elemento que encontra-se no plasma circundante ao polímero. Pode-se ainda observar com estas análises um aumento da porcentagem de oxigênio com o

aumento do tempo de exposição, evidenciando que o tempo de tratamento é um parâmetro importante no estudo.

Porém, para os tempos de 4 e 5 minutos, observa-se uma diminuição da concentração percentual do átomo de oxigênio. Este fenômeno está relacionado à cristalinidade que o plasma provocou na superfície da membrana. Pode-se verificar na Figura 13(E) que a membrana com a maior aparência de estrutura cristalina é a membrana exposta ao plasma por 4 minutos, portanto, esta membrana foi a que apresentou uma menor difusão de oxigênio, isso ocorre devido à impermeabilidade dos cristais (EMNA et al., 2013). A membrana exposta ao plasma por 5 minutos demonstrou um leve aumento.

A redução da permeabilidade é influenciada pelo tratamento por plasma. Este fato pode estar relacionado com a permeabilidade do gás na membrana, pois o plasma diminui a permeabilidade do gás devido à formação da estrutura cristalina que é impermeável, o mesmo comportamento foi observado quando Vidaurre et al. (2002) tratou membranas de polisulfona por plasma de argônio a fim de medir a influência do tratamento na propriedade de permeabilidade. O estudo comprovou que houve uma redução na permeabilidade do gás para as membranas tratadas à baixa potência (5W) e tempo de exposição de 20 minutos.

Duan e Thomas (2014) estudaram a influência da cristalinidade nas membranas de Poli(ácido láctico) (PLA) na permeabilidade do vapor de água, e constataram que os valores da permeabilidade do vapor de água diminuíram linearmente com o aumento da cristalinidade.

4.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A análise de microscopia de força atômica foi realizada com o intuito de verificar a rugosidade do material.

A média da rugosidade da superfície para as amostras tratadas por plasma para todos os tempos de exposição aumentou quando comparada a amostra sem tratamento, podendo ser observado na Tabela 7.

Os valores da média da rugosidade da superfície (R_a) obtidos para o PLLA sem tratamento foi de $0,0361\mu\text{m}$, obtendo o valor máximo após tratamento de $0,2535\mu\text{m}$ para a membrana exposta ao plasma de 4 minutos.

Tabela 7 – Valores da rugosidade de superfície obtidas por MFA a partir das membranas de PLLA não tratadas e tratadas por plasma de H_2O_2 – *Ra vertical*.

PLLA	*Rugosidade (μm)
Sem tratamento	0,0361
1 minuto	0,1814
2 minutos	0,0715
3 minutos	0,0927
4 minutos	0,2535
5 minutos	0,0753

* Escala – área de varredura $10 \times 10 (\mu m)^2$

Fonte: O autor (2014)

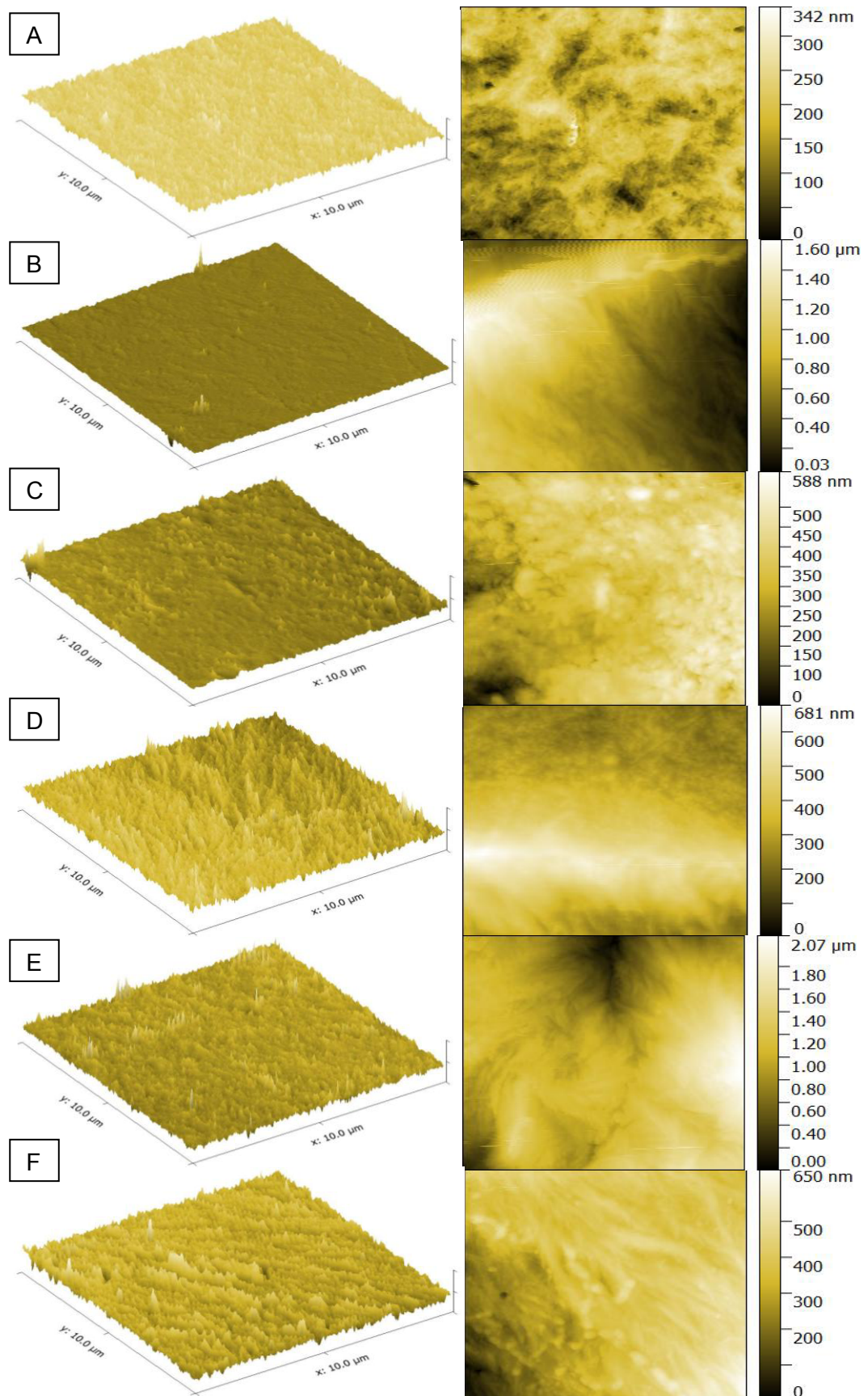
A morfologia da superfície das amostras de PLLA modificadas e não modificada por plasma foi investigada a partir da Figura 15. Pode-se observar que a membrana de PLLA sem tratamento apresenta uma superfície morfológica irregular e com picos uniformes, no entanto, para a membrana exposta ao plasma de 1 minuto a irregularidade da superfície aumenta, mas os picos diminuem, porém, há uma intensificação no valor da rugosidade, tal comportamento também foi observado por Singh et al. (2007).

Foi possível observar que as superfícies de todos os substratos apresentam um aumento na rugosidade, pois os picos tornam-se mais definidos, conforme Figura 15. Tal comportamento também foi verificado por diversos autores (RIMPELOVA et al., 2014; SLEPICKA et al., 2012b e FERREIRA et al. 2009a).

Há dois possíveis processos que interferem na alteração da rugosidade superficial do polímero quando este é exposto ao plasma, caracterizados por fenômenos físicos e químicos. No processo químico, durante a exposição ao plasma, a superfície do PLLA é bombardeada por partículas (H_2O_2 , H_2 , O_2 , H_2O , H^+ , O^{2-} , OH^- , O_2^{2-} entre outros) que interagem com a superfície da membrana e altera preferencialmente a região amorfa, devido sua menor estabilidade se comparada com a região cristalina. Um efeito similar a este foi observado por Tverdokhlebov et al. (2015) e Vilaplana et al. (2014) para tempos menores de exposição ao plasma (TVERDOKHLEBOV et al, 2015).

Outro importante mecanismo que contribui para a formação da rugosidade superficial relaciona-se com interações físicas associadas ao processo de cristalização do PLLA, que leva a formação de cristalitos na superfície do polímero (KASALKOVA et al. 2014; SLEPIKA; MICHALJANIOVÁ; SVORCÍK, 2013c). Na Figura 13(E) é possível observar a formação de cristalitos na superfície da membrana, a predominância da fase cristalina na superfície do substrato ocasionada pela influência do plasma. As partículas de alta energia presentes no plasma interagem com a superfície da membrana, transferindo energia para o polímero, aquecendo-o e possibilitando alteração em seu arranjo cristalino. A região cristalina ocupa um volume menor que a região amorfa, sendo que tal efeito também foi verificado por Tverdokhlebov et al (2015), que constatou que a redução do volume do material provocada pela alteração no arranjo cristalino levou a formação de uma superfície rugosa. Semelhante comportamento foi observado por Tverdokhlebov et al (2015), Rimpelova et al. (2014); Slepicka et al. (2012b) e Ferreira et al. (2009a). No presente trabalho, o aumento da rugosidade em função do grau de cristalinidade pode ser verificado a partir da análise de DSC com os valores da % cristalina na Tabela 8.

Figura 15 – Análise de rugosidade das membranas de PLLA não modificada (A) e modificadas por plasma de H_2O_2 por 1 min (B), 2 min (C), 3 min (D), 4 min (E) e 5 min (F).

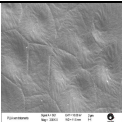
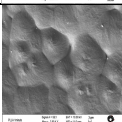
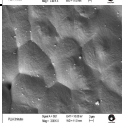
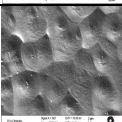
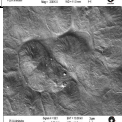
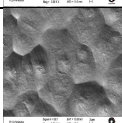


Fonte: O autor (2014)

Outro fenômeno que pode estar associado à alteração da rugosidade da superfície das amostras se refere ao processo de ablação provocado pela exposição ao plasma. Esta ablação também ocorre preferencialmente na fase amorfa e favorece a formação de estruturas globulares. Este processo de ablação pode aumentar ou diminuir a rugosidade, bem como, aumentar ou tornar plana a estrutura globular. Os processos que interferem na alteração da rugosidade superficial são periodicamente repetidos, portanto o aumento ou a diminuição da rugosidade da superfície do PLLA acontece em função do tempo de exposição (RIMPELOVA et al., 2014). Esta superfície de estrutura globular pode ser observada na Figura 12 obtida pela análise de MEV.

A rugosidade da membrana de PLLA tratada por plasma de H_2O_2 foi modificada, e esta modificação está de acordo com os valores encontrados na análise de DSC, mediante os valores da porcentagem cristalina e conforme a análise de MEV, pois à medida que se acentua a aparência de cristalitos na superfície da membrana como pode ser visto na morfologia apresentada na Figura 13, a porcentagem cristalina também aumenta e, conseqüentemente, há o aumento da rugosidade. Estes dados podem ser confirmados na Tabela 8.

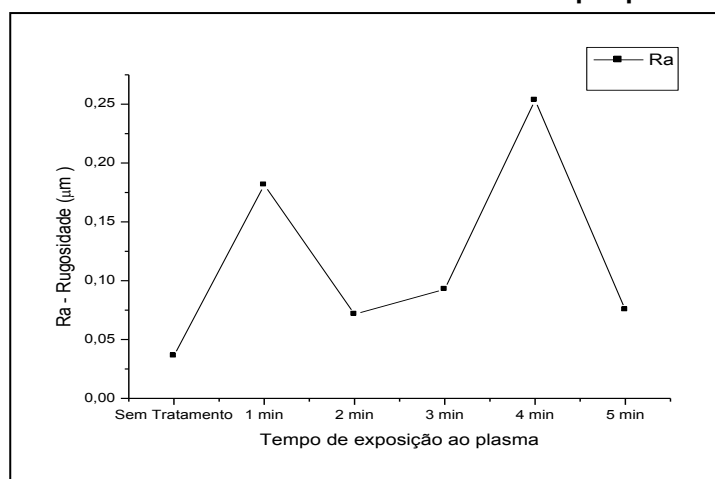
Tabela 8 - Comparativo entre as análises de MEV, DSC e MFA para as amostras de PLLA tratadas e não tratadas por plasma de H_2O_2 .

Membranas de PLLA	MEV (micrografias de 3.000x)	% Cristalina	Rugosidade
Sem tratamento		32	0,0361 μm
1 minuto		31	0,1814 μm
2 minutos		20	0,0715 μm
3 minutos		30	0,0927 μm
4 minutos		32	0,2535 μm
5 minutos		21	0,0753 μm

Fonte: O autor (2015)

Para os tempos de exposição ao tratamento por plasma de 2, 3 e 5 minutos a rugosidade diminuiu, quando comparada à amostra exposta ao plasma de 1 minuto, conforme pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 - Valores da rugosidade de superfície obtidas por MFA *versus* o tempo de exposição a partir das membranas de PLLA não tratadas e tratadas por plasma de H_2O_2 –Ra vertical



Fonte: O autor (2014)

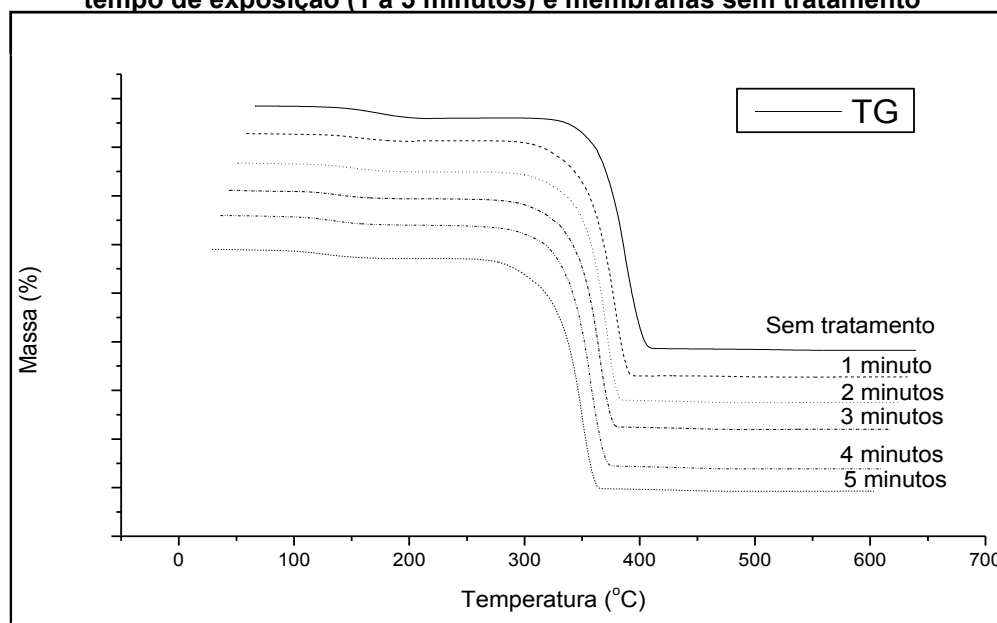
A diminuição da rugosidade apresentada por estas amostras está relacionada ao tempo de exposição ao plasma, fator primordial na modificação da rugosidade superficial da membrana como descrito anteriormente.

4.5 TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A termogravimetria é uma análise térmica que nos permite medir a variação da massa (perda ou ganho) de um material associado à degradação e estabilidade térmica em função da temperatura e/ou tempo em que se pode observar o início do estágio da perda de massa, além disso, é possível obter através da derivação da curva da TG o ponto em que a taxa de variação de massa é máxima (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009; CANEVAROLO Jr. et al., 2007; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

O comportamento das membranas de PLLA sem tratamento e tratadas por plasma foram avaliadas por TG para verificar a estabilidade térmica do material. A partir desta análise foi obtida a temperatura que corresponde ao início de decomposição (T_{onset}) e a temperatura onde a derivada da curva é máxima que corresponde a taxa máxima de perda de massa (T_p). A temperatura de degradação das amostras é apresentada na Figura 17.

Figura 17 - Curvas de TG para as membranas de PLLA tratadas por plasma em diferentes tempo de exposição (1 a 5 minutos) e membranas sem tratamento



Fonte: O autor (2015)

Os valores para as temperaturas do início de degradação do PLLA podem ser observados na Tabela 9. Nota-se que as membranas não tiveram mudanças significativas após o tratamento por plasma, tendo uma alteração máxima de 2% para o início da perda de massa na membrana exposta ao plasma de 1 minuto.

Tabela 9 – Dados da TG para as membranas de PLLA tratadas por plasma e membranas sem tratamento.

Membranas de PLLA	T_{onset}	T_p
Sem tratamento	324,16	356,13
1 minuto	318,18	350,92
2 minutos	322,98	350,65
3 minutos	322,78	352,25
4 minutos	322,78	353,23
5 minutos	320,60	353,96

Fonte: O autor (2015)

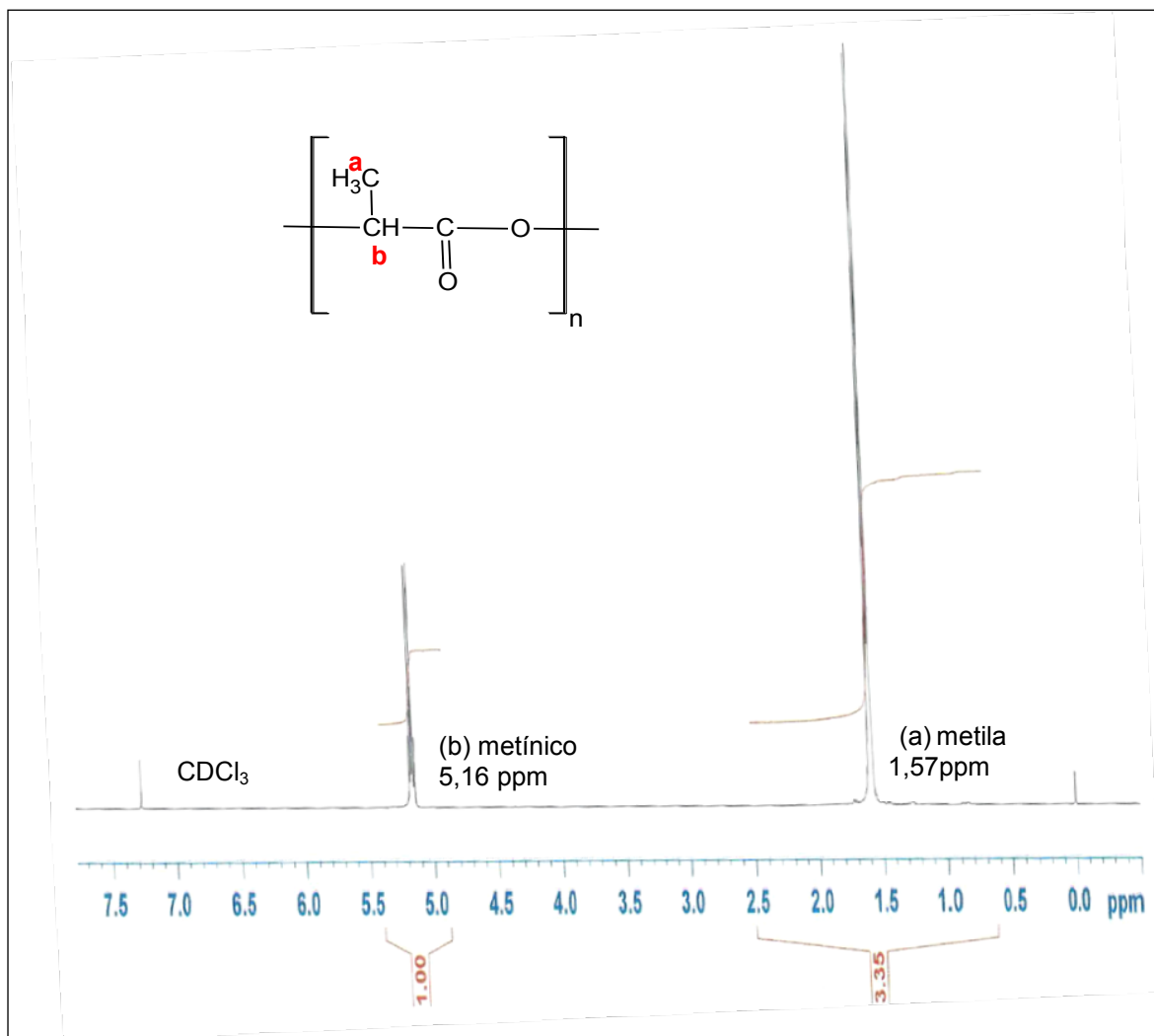
Os resultados apresentados na Tabela 9 evidenciam que o tratamento por plasma de H₂O₂ não afeta significativamente o grau de degradação da membrana. Este fato pode estar relacionado ao tratamento por plasma, que remove espécies químicas da superfície do polímero, permitindo a formação de radicais livres que podem se ligar a outras espécies químicas favorecendo a ligação cruzada. Este fenômeno faz com que a estabilidade térmica seja mantida (SINGH et al., 2007). Outra propriedade térmica importante é a temperatura onde a perda de massa é máxima (T_p) que é definida pelo pico da primeira derivada da curva da TG. Os valores desta temperatura estão sumarizados na Tabela 9, os mesmos não apresentam mudanças significativas, com um decréscimo de no máximo 1,5% para T_p.

4.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN ¹H) e RMN de ¹³C.

Os deslocamentos químicos dos picos de ressonância observados no espectro de RMN de ¹H do PLLA sem tratamento apresentados na Figura 18 estão de acordo com aqueles reportados por Demina et al. (2012) e Loo et al. (2006). O deslocamento químico de 1,57ppm corresponde aos prótons da metila (CH₃) – (a) e

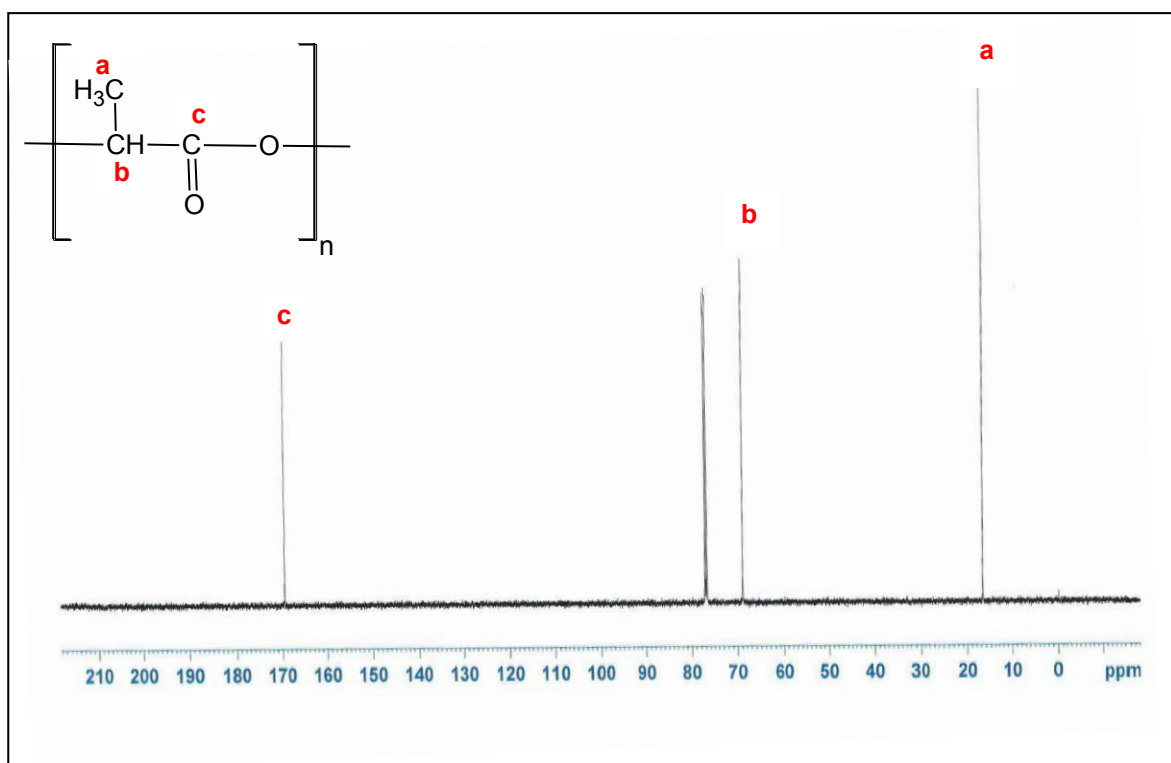
o espectro em 5,16 ppm referente ao próton metínico (CH) – (b) da cadeia polimérica principal. O sinal 7,27 é característico do solvente CDCl_3 . O pico em 0,0ppm é relativo ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como referência.

Figura 18 – Espectros de ^1H RMN para o PLLA sem tratamento



Fonte: O autor (2015)

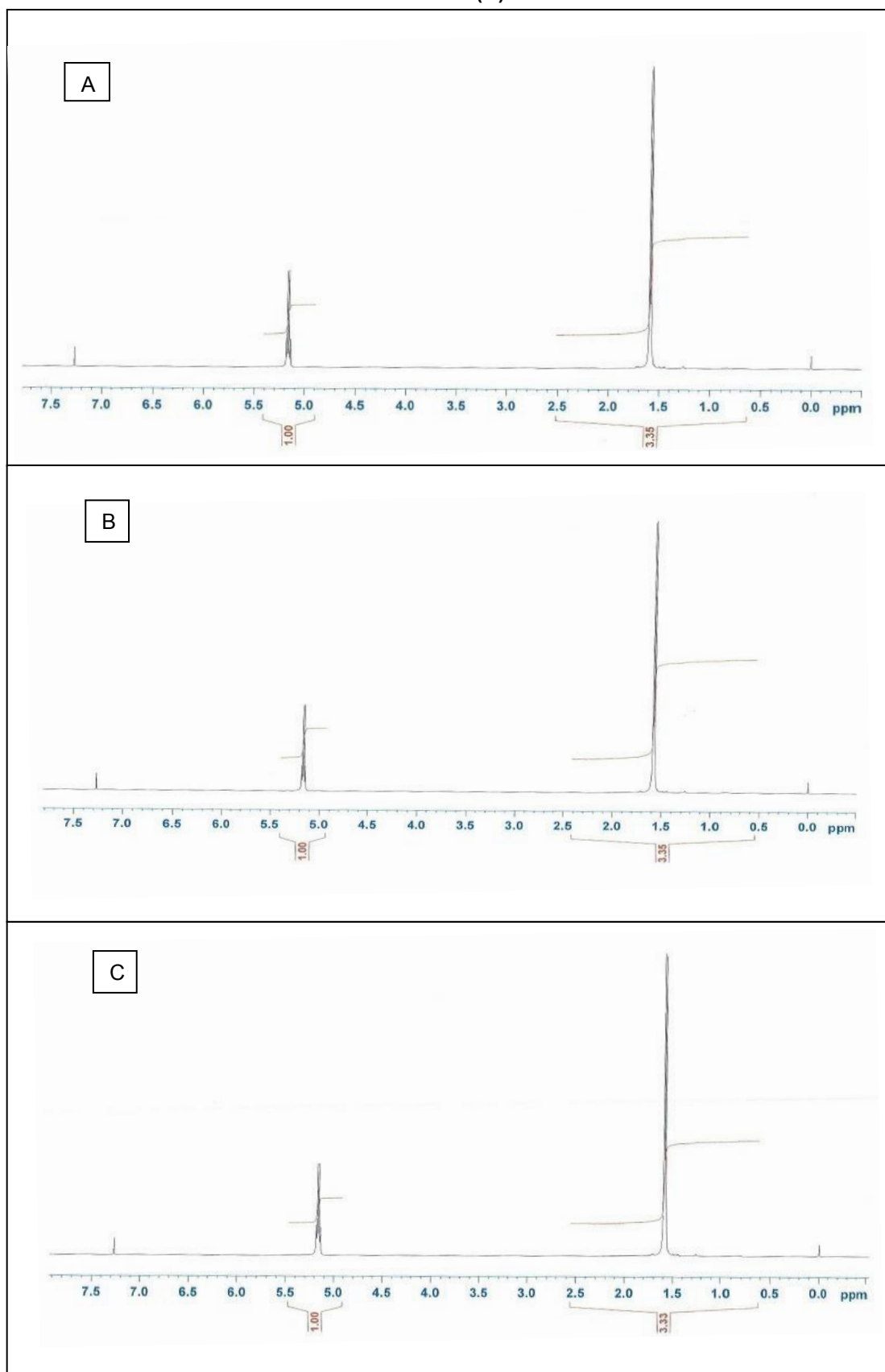
Com relação ao espectro do RMN ^{13}C Figura 19, pode-se observar um pico com desvio químico de 16,6 ppm referente ao carbono da metila (CH_3) e um sinal em 69 ppm é característico do carbono metínico e o último pico 169,9 ppm é correspondente ao carbono da carbonila. O sinal 77 ppm é característico do solvente CDCl_3 .

Figura 19 – Espectros de ^{13}C RMN para o PLLA sem tratamento

Fonte: O autor (2015)

Na Figura 20 pode ser observado os espectros dos prótons das membranas de PLLA sem tratamento e tratadas por plasma para os tempos de 1 e 2 minutos. Optou-se por fazer as análises de RMN para estes tempos devido o comportamento das membranas quando expostas ao plasma, pois ao que se pode verificar nas análises anteriores, o plasma tem oscilações repetidas periodicamente.

Figura 20 - Espectros de ^1H RMN para o PLLA sem tratamento (A), amostras tratadas 1 min (B) e 2 min (C)



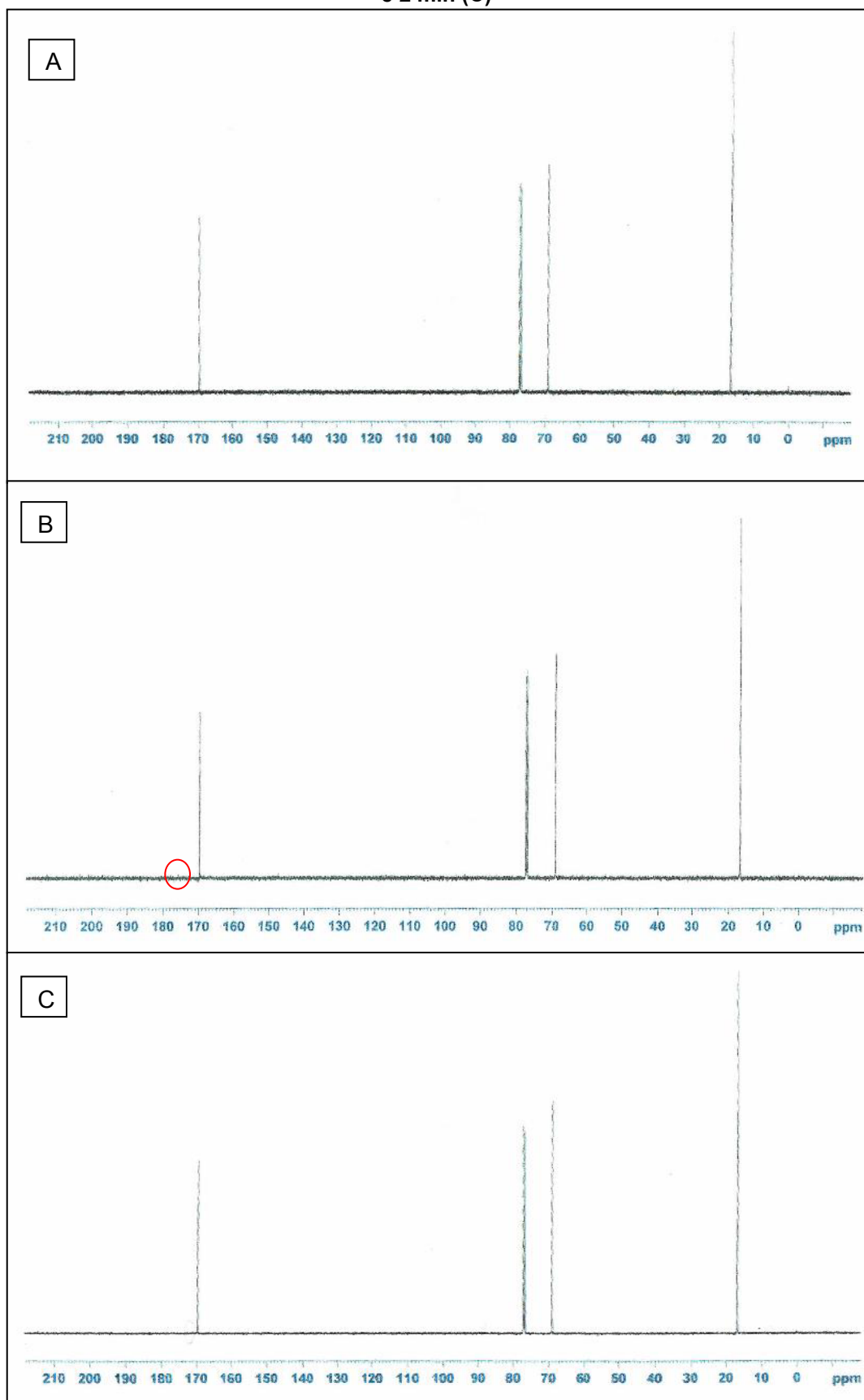
Fonte: O autor (2015)

Os resultados de ^1H RMN das amostras tratadas por plasma foram idênticas as da membrana não tratada, sugerindo que não houve modificação na estrutura química do polímero.

Deve-se, porém, salientar que o grupo funcional hidroxila, um possível grupo funcional que diminui a hidrofobicidade e aumenta a energia superficial do componente polar não é detectado por esta análise. Pois esta técnica detecta átomos de hidrogênio (H) ligados a átomos de carbono (C) (BRUICE, 2006).

A Figura 21 é referente aos espectros do ^{13}C RMN sem tratamento e para as amostras tratadas.

Figura 21 - Espectros de ^{13}C RMN para o PLLA sem tratamento (A), amostras tratadas 1 min (B) e 2 min (C)



Fonte: O autor (2015)

Nota-se na amostra tratada por plasma de 1 minuto um pequeno pico, com desvio químico de 176ppm que é referente ao componente orgânico ácido e amina, como pode ser observado no Anexo 1 na página 90 do presente documento. Entretanto, para os espectros de ^{13}C , onde os núcleos de carbono não estão ligados ao hidrogênio, tem-se o pico de menor intensidade. Isto ocorre devido ao maior tempo de relaxação existente para os carbonos não ligados ao hidrogênio, o que leva a sinais fracos.

Desta forma, deve-se utilizar um número suficientemente grande de pulsos e intervalos para compensar o longo tempo de relaxação para que esses sinais não se percam no ruído da linha base (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

4.7 ÂNGULO DE CONTATO

A busca por dispositivos médicos com reduzidos processos de rejeição é o objetivo principal nos estudos relacionados à biomedicina. Consequentemente, a hidrofiliidade moderada da superfície do PLLA é uma das principais propriedades de superfície que auxiliam no aumento da proliferação e crescimento celular (BÉLARD et al., 2013, LIZUNDIA et al., 2012). Substratos hidrofóbicos inibem a interação célula/implante, o que dificulta o processo de regeneração do tecido (VALENCE et al., 2013).

A molhabilidade é controlada pela composição química e pela estrutura geométrica da superfície do polímero (LIZUNDIA et al., 2012). Os valores do ângulo de contato e energia de superfície obtida pela análise das amostras tratadas por plasma podem ser observados na Tabela 10. Os valores foram obtidos com o auxílio do software DROP Image Advanced, utilizando o Método Harmônico, por se tratar de uma técnica que é adequada ao estudo da superfície de polímeros. As medições foram realizadas medindo-se o ângulo de contato (θ) para o componente polar (água). Para as medições da energia de superfície foram utilizados os valores do ângulo de contato da água e de um componente menos polar (glicerol).

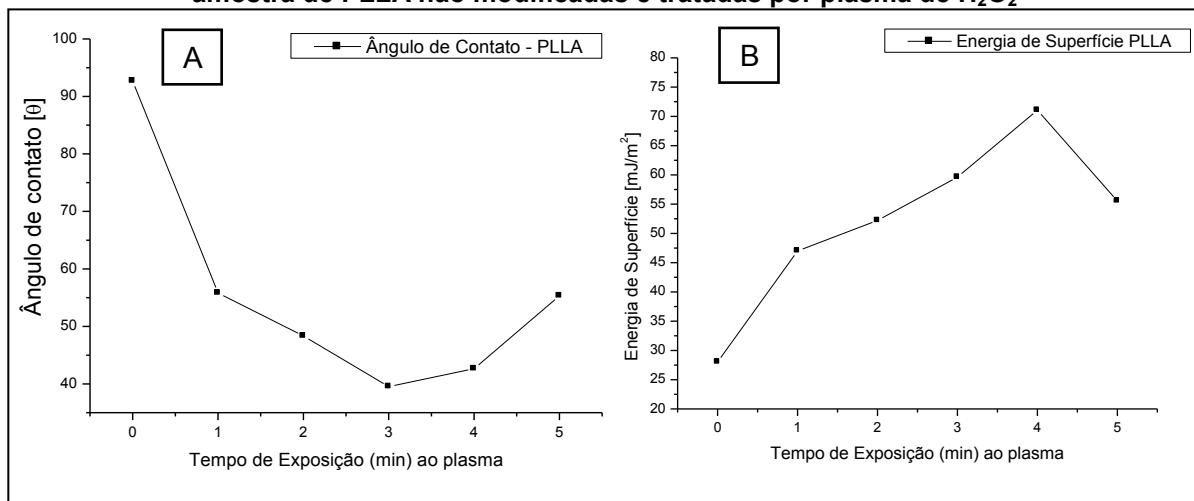
Tabela 10 - Efeito do tratamento por plasma de H_2O_2 no ângulo de contato e na energia de superfície do PLLA

Amostra	Ângulo de Contato (θ)		Energia de Superfície (mJ/m^2)		
	θ_{H_2O}	$\theta_{C_3H_5(OH)_3}$	γ_s	γ_s^p	γ_s^d
PLLA 0	92,69	79,00	28,01	7,99	20,01
PLLA 1min	55,83	48,30	47,00	29,79	17,21
PLLA 2min	48,34	48,26	52,21	39,36	12,84
PLLA 3min	39,53	45,20	59,62	48,43	11,20
PLLA 4min	42,65	61,45	71,07	68,41	2,66
PLLA 5min	55,31	30,65	55,54	21,93	33,62

γ_s =energia de superfície, γ_s^p =componente polar, γ_s^d =componente dispersiva, $C_3H_5(OH)_3$ = Glicerol
Fonte: O autor (2013)

Para melhor visualização dos resultados apresentados na Tabela 10 plotou-se o gráfico com os valores do ângulo de contato e energia de superfície das membranas de PLLA tratadas por plasma de H_2O_2 em função do tempo de tratamento, como pode ser observado na Figura 22.

Figura 22-(A) Valores da análise do ângulo de contato e (B) energia de superfície para as amostra de PLLA não modificadas e tratadas por plasma de H_2O_2



Fonte: O autor (2014)

Em virtude dos diferentes parâmetros que determinam o limite entre hidrofóbico/hidrofílico, determinou-se que o ângulo de contato de 50° é o que apresenta melhor adesão celular, portanto, melhor hidrofilicidade, sendo assim, assumiu-se este valor como limite (SLEPICKA et al., 2012b).

Superfícies com ângulo de contato baixo, ou seja, inferior ou igual a 50° são considerados hidrofílicos (alta energia de superfície) e superfícies com ângulo de contato superior a 50° são denominados hidrofóbicos (baixa energia de superfície) (SLEPICKA et al., 2012b; DUARTE, 2009).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10 e na Figura 22(A), pode-se afirmar que o tratamento por plasma de peróxido de hidrogênio altera as propriedades superficiais de molhabilidade da membrana, deixando-as mais hidrofílicas. Membranas sem tratamento apresentaram um valor de $92,69^\circ$ e após tratamento por plasma esse valor diminui, atingindo patamares de $39,53^\circ$. Isto representa 57% na diminuição no ângulo de contato. Do mesmo modo, pode-se observar que o tratamento também corroborou para o aumento da energia de superfície, como pode ser observado na Figura 22(B). O componente polar tem um papel significativo no aumento da energia de superfície, pois como pode ser observado na Tabela 10, o componente polar para amostra sem tratamento apresenta o valor de 7,99. Após tratamento este valor atinge o valor máximo de 68,41, tendo um aumento 8 vezes maior quando comparado com a amostra sem tratamento.

Em contrapartida, o componente dispersivo não apresenta alterações tão significativas quando comparado com o componente polar, desta forma, pode-se supor que o componente polar tem uma influencia maior na energia de superfície (γ_s) (VILAPLANA et al., 2014), contribuindo para o aumento do mesmo e da molhabilidade, pois o componente polar está relacionado com a afinidade do substrato pela água, o que indica a inserção de grupos funcionais polares através do plasma de H_2O_2 .

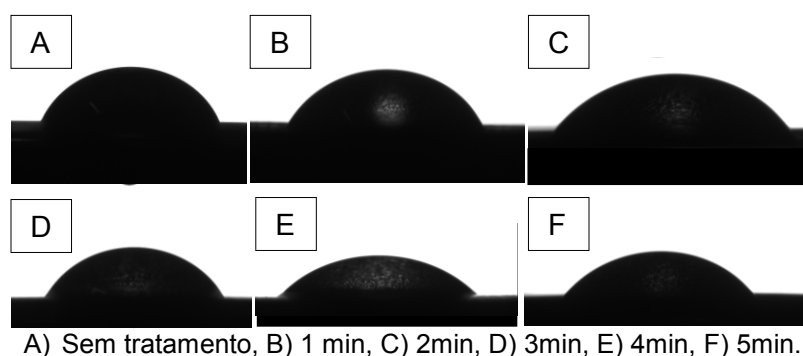
A diminuição do ângulo de contato e o aumento da energia de superfície para as membranas expostas ao plasma de H_2O_2 são dependentes do tempo de exposição ao plasma. Para as membranas expostas aos tempos de 1, 2 e 3 minutos, nota-se a diminuição dos valores do ângulo de contato que pode estar relacionado ao aumento da concentração de grupos funcionais inseridos na superfície do substrato por meio do plasma, o que contribui para tornar a membrana mais hidrofílica (CHANG et al., 2009). Pois o tratamento por plasma age de forma intensa sobre a cadeia polimérica, provocando a quebra das ligações (C-C e C-H), consequentemente gerando ligações duplas e criando grupos contendo oxigênio na

superfície do material. Este processo produz uma superfície de nanoestrutura capaz de suportar o crescimento e a adesão celular (SLEPICKA et al., 2015d).

No entanto, com o aumento da exposição ao plasma, membranas tratadas em 4 e 5 minutos tiveram um acréscimo no ângulo de contato, este fenômeno está associado as mudanças morfológicas mais intensas provocadas pelo aumento do tempo de exposição. Devido o aumento do tempo de exposição, o processo de ablação se torna mais pronunciado, alterando significativamente a superfície química. Desta forma, sugere-se que o aumento do ângulo de contato pode estar associado a diversos fatores envolvendo a rugosidade de superfície, como a estabilidade da superfície tratada, relacionada com a capacidade do rearranjo da cadeia molecular bem como a quantidade de material polimérico que sofreu ablação (SLEPIKA; MICHALJANIOVÁ; SVORCÍK, 2013c). Além disso, o aumento da rugosidade pode promover deformações na superfície do substrato impedindo que a água se espalhe, o que é também consistente com relatos prévios de Bélard et al. (2013).

Pode-se observar na Figura 23 uma imagem obtida pela análise de ângulo de contato evidenciando a molhabilidade da superfície das membranas de PLLA com água deionizada, onde se observa a diminuição do ângulo de contato em função dos tratamentos realizados em diferentes tempos.

Figura 23 – Imagem da gota de água sobre a superfície das membranas de PLLA em diferentes tempos de exposição ao plasma de H_2O_2 (0 a 5 minutos) obtido por meio de equipamento de ângulo de contato



A) Sem tratamento, B) 1 min, C) 2min, D) 3min, E) 4min, F) 5min.

Fonte: O autor (2013)

As propriedades de molhabilidade, composição química e energia de superfície, são fatores que contribuem para a adesão, crescimento e proliferação celular (CHU, 2013; YANG, 2012; MATTIOLI; KENNY; ARMENTANO, 2012; LIM, 2004).

Zhang et al. (2013) estudou filmes de quitosana modificados por tratamento de plasma a frio de N_2/H_2 . Os autores verificaram que o filme de quitosana não tratado foi de 101° após o tratamento por plasma N_2/H_2 o valor chegou a 34° . Os autores atribuem à diminuição do ângulo de contato principalmente aos parâmetros de mistura dos gases e tempo de tratamento. A energia de superfície para a quitosana foi de $30,5 \text{ mJ/m}^2$, após tratamento obteve-se um aumento de seis vezes ($175,3 \text{ mJ/m}^2$). Os autores concluem que a modificação da superfície por plasma melhora a molhabilidade devido ao aumento de componentes polares inseridos na superfície após o tratamento.

4.8 VIABILIDADE CELULAR

O estudo da viabilidade celular traz informações sobre a adesão celular das células osteoblásticas cultivadas na membrana de PLLA. Este estudo fornece resultados sobre a interação das células com o substrato, sendo que, somente células que se aderem à superfície da membrana têm a capacidade de proliferarem sobre a mesma. Foram utilizadas as membranas sem tratamento e as membranas expostas ao plasma de 1 e 2 minutos para este estudo.

4.8.1 Adesão celular em membranas de PLLA modificadas e não tratadas

Neste trabalho, a resposta das células de osteoblastos quanto a adesão celular foi estudada *in vitro* nas amostras de PLLA sem tratamento e para as amostras expostas ao plasma de 1 e 2 minutos comparadas com o substrato padrão de poliestireno (PS), usado como controle.

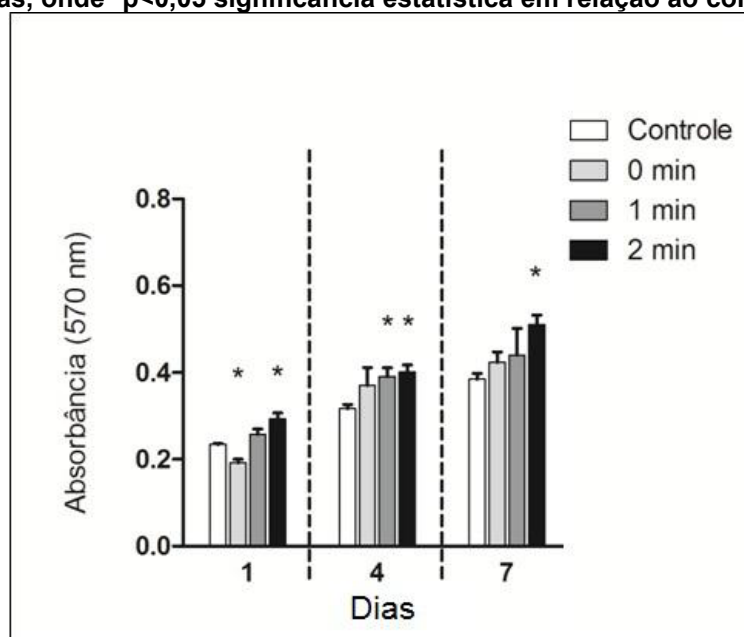
A adesão representa a primeira fase da interação das células com o substrato. Esta fase influencia na capacidade da célula proliferar-se. Após a fase de adesão celular, um novo estágio acontece. Este estágio dura de 24 a 48 horas, após a semeadura. Nesta fase acontece o processo de adaptação da célula no novo ambiente, se as células permanecerem vivas neste período, o processo de proliferação ocorre (SLEPIČKA et al., 2012b).

Desta forma, a partir da Figura 24, pode-se afirmar que houve a adesão celular no primeiro dia para as amostras tratadas nos tempos de 1 e 2 minutos em relação ao controle. Após o período de 48h, as células começaram a proliferar-se,

com maior absorbância para as amostras cultivadas em 7 dias, indicando a sobrevivência celular.

O significativo aumento da adesão celular nas membranas de PLLA modificados foram evidentes após 4 dias de cultivo, conforme observado na Figura 23. Para 7 dias de cultivo, a membrana exposta ao plasma por 2 minutos teve um aumento significativo na viabilidade celular comparada com as demais amostras, além de apontar a presença de células viáveis em maior quantidade. Esta membrana é estatisticamente diferente da amostra sem tratamento e do grupo controle, pois por meio do teste ANOVA foi possível verificar uma diferença significativa ($p < 0,05$). As membranas expostas ao plasma por 2 minutos mostraram índices de absorbância melhores que o próprio controle ($p < 0,05$).

Figura 24 - Crescimento celular de osteoblastos cultivados sobre as amostras não tratadas e tratadas por plasma de 1 e 2 minutos, em que o controle é a placa de poliestireno ao longo de 7 dias, onde $*p < 0,05$ significância estatística em relação ao controle.



Fonte: O autor (2014)

Este aumento é proporcional ao tempo de cultura. Isto indica que o tratamento por plasma de H_2O_2 promove um ambiente biocompatível para o crescimento e proliferação das células osteoblásticas devido suas propriedades superficiais.

Não só a superfície química do material tem um efeito na resposta biológica, mas também a estrutura superficial de diferentes morfologias pode ser construída para guiar uma resposta biológica desejável. A matriz polimérica também é responsável pela adesão celular, pois esta deve assegurar os esforços mecânicos

que as células provocam ao se aderirem e proliferarem nos substratos (SLEPICKA, 2015d), e devem possuir permeabilidade adequada para permitirem o acesso das células. No entanto, poliésteres têm baixa permeabilidade (BIKIARIS, 2013), e quando expostos ao plasma, algumas membranas apresentam uma maior tendência à cristalinidade, o que dificulta a permeabilidade.

Entretanto, membranas tratadas por plasma por 2 minutos apresentaram uma superfície menos cristalina quando comparada aos demais tempos de tratamentos e em específico ao tratamento de 1 minuto o qual foi realizada a análise de viabilidade. Isto explica a preferência e a maior adesão celular para a amostra tratada por 2 minutos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se a influência do plasma de H_2O_2 na modificação da superfície das membranas de PLLA, uma vez que promoveu alterações nas propriedades físicas, químicas, morfológicas e biológicas do material mantendo preservada a estrutura química do PLLA. Características de molhabilidade (hidrofilicidade /hidrofobicidade), rugosidade, morfologia, composição química, e propriedades térmicas foram alteradas pelo tratamento por plasma de H_2O_2 . Estas propriedades são essenciais para a biocompatibilidade do polímero com o corpo humano.

É possível admitir a hipótese de que a diminuição da cristalinidade, como apresentado na análise de DSC, atua de forma significativa para o aumento da biocompatibilidade.

As análises de MEV e MFA evidenciaram que a mudança na superfície morfológica e o aumento da rugosidade foram causados pelo processo de cristalização do PLLA gerado pela ablação provocado pelo tratamento por plasma na fase amorfa, devido sua menor estabilidade quando comparado com a fase cristalina. Este tratamento provocou a formação de uma estrutura globular e cristalina.

Este estudo também confirmou que a membrana de PLLA teve suas concentrações de oxigênio e carbono alteradas pelo tratamento por plasma e que houve difusão do átomo de oxigênio na matriz polimérica, o que provocou a inserção de grupos funcionais no polímero, aumentando a energia de superfície do componente polar e consequentemente a hidrofilicidade da membrana. Entretanto, a estabilidade térmica do material manteve-se inalterada, sugerindo à criação de ligações cruzadas provocada pelo tratamento por plasma.

As modificações ocasionadas pelo tratamento por plasma de H_2O_2 levou a comprovação da adesão celular, indicando que o tratamento por plasma não causa uma resposta celular negativa/adversa o que pode ser observado na análise de viabilidade celular, que mostra uma melhor adesão para a membrana exposta ao plasma tratado durante 2 minutos.

Frente aos resultados expostos conclui-se que o grau de cristalinidade tem influência sobre a adesão celular, pois conforme os dados obtidos o maior crescimento celular foi apresentado para as membranas na qual o menor grau de

cristalinidade foi detectado, porém esta membrana também apresentou hidrofiliabilidade e rugosidade compatível para que a adesão e proliferação celular acontecessem.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a influencia do plasma na cristalinidade do PLLA.
- Tratar membranas por plasma de peróxido de hidrogênio e alterar parâmetros de potência, a fim de avaliar a influencia deste parâmetro na membrana.
- Estudar a influência de outros gases de plasma nas membranas de PLLA.

REFERÊNCIAS

- BARBANTI, H. Samuel; ZAVAGLIA, C. A. Cecília; DUEK, R. A. Eliana. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, nº1, p. 13-21, 2005.
- BAZAKA, Kateryna et al.. Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. **Acta Biomaterialia**, v.7, p.2015-2028, 2011.
- BÉLARD, Laurent et al.. Plasma-polymer coatings onto different biodegradable polyesters surfaces. **European Polymer Journal**, v.49, p. 882-892, 2013.
- BIKIARIS, Dimitrios N. Nanocomposites of aliphatic polyesters: An overview of the effect of different nanofillers on enzymatic hydrolysis and biodegradation of polyesters. **Polymer Degradation and Stability**, v. 98, p. 1908 – 1928, 2013.
- BOCCAFOSCHI, F. et al.. The Biological Response of Poly(l-lactide) Films Modified by Different Biomolecules: Role of the Coating strategy. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v.100A, p. 2373-2381, 2012.
- BORELLI, Vanessa. **Pesquisa e Desenvolvimento: Estudo das Inter-Relações Científicas e Tecnológicas e Normativas**. 2011. 96p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear-Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2011.
- BRUICE, Paula Yurkanis. **Química Orgânica**. 4. Ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.
- CANEVAROLO Jr., Sebastião V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2007.
- CASADEI, Ana Paula Marzagão. **Arcabouço de PLLA/Hap sinterizado com potencial de utilização em regeneração de Tecido Ósseo**. 2009.51p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- CASARANO, Romeu. **Copolímeros Biodegradáveis com Potencial uso como Biomateriais**. 2009. 280p. Tese (Doutorado em Química – Química Orgânica) – Instituto de Química – USP, São Paulo, 2009.

CHANG, H.Y. et al.. Novel Polymeric Thin Films from Labile Lactic Acid by a Dry Process. **Plasma Processes and Polymers**, p. 45-57, 2009.

CHAPMANN, B. **Glow Discharge Processes**. Sputtering and plasma etching, New York: John Wiley & Sons Inc, 1980.

CHEN, Hong et al.. Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 1059-1087, 2008.

CHEN, Jyh-Ping; SU, Chien-Hao. Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.7, p.234-243, 2011.

CHEN, Qizhi, THOUAS, George A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering R**, v. 87, p. 1-57, 2015.

CHEUNG, Yan-Hoi et al.. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B: Engineering**. v.38, p. 291-300, 2007.

CHU, P.K. et al.. Plasma-surface modification of biomaterials. **Material Science and Engineering R**, v.36, p.143-206, 2002.

CHU, K. Paul. Surface Engineering and Modification of Biomaterials. **Thin Solid Films**, p. 93-105, 2013.

CIAMBELLI, Giuliano Serafino et al.. Characterization of Poly (L-co-D,L Lactic Acid) and a Study of Polymer-tissue Interaction in Subcutaneous Implants in Wistar Rats. **Materials Research**, v. 16, p. 28-37, 2013.

COSTA, T.H.C. et al.. Caracterização de filmes de poliéster modificados por plasma de O₂ a baixa pressão. **Revista Matéria**, v. 13, n. 1, p. 65-76, 2008.

DEMINA, Tatiana et al.. DC discharge plasma modification of chitosan/gelatin/PLLA films: Surface properties, chemical structure and cell affinity. **Surface & Coatings Technology**, p. 508-516, 2012.

DESMET, T. Tim et al.. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 2351-2378, 2009.

DRUMOND, Walker S.; WANG, Shu Hui; MOTHÉ, Cheila G. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (Ácido Lático-B-Glicol Etilênico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, nº 2, p. 74-79, 2004.

DUAN, Z.; THOMAS, N.L. Water vapour permeability of poly(lactic acid): crystallinity and the tortuous path model. **Journal of Applied Physics**, v. 115, p. 1-9, 2014.

DUARTE, M. A. T. et al.. The Influence of the PCL-T Concentration in PLDLA membrane. **Materials Science Forum**, v. 730-732, p. 50-55, 2013.

DUARTE, Márcia Adriana Tomaz. **Influência das concentrações do PCL-T em membranas de PLDLA. Estudo in vitro e in vivo**. Campinas: UNICAMP, 2009. 116 p. Tese (Doutorado – Comissão de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

EMNA, Chichti et al.. Effects of Ar–N₂–O₂ Microwave Plasma on Poly-L-Lactic Acid Thin Films Designed for Tissue Engineering. **Plasma Processes and Polymers**, v. 10, p. 535-543, 2013.

EPAILLARD, Poncin Fabienne; SHAVDINA, Olga; DEBARNOT, Dominique. Elaboration and surface modification of structured poly(L-lactic acid) thin film on various substrates. **Materials Science and engineering C**, v.33, nº 5, p. 2526-2533, 2013.

FERREIRA, B.M.P. et al.. Plasma Surface Treatments of Poly (L-lactic acid) (PLLA) and Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV). **Materials Science and engineering C**, p. 806-813, 2009a.

FERREIRA, Betina M. P. et al.. Haste Intramedular Polimérica Bioreabsorvível (PLLA/PHBV) para Uso na Recuperação de Fraturas Ósseas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, nº 4, p. 312-319, 2008b.

FREIRE, Raphael. Stents Bioreabsorvíveis, **Boa Vida**, nº 16, p. 1-56, 2013.

FU, Xin. **Active Screen Plasma Surface Modification of Polymeric Materials for Biomedical Applications**. 2012. 217p. Thesis (Degree of Doctor of Philosophy) -

University of Birmingham, School of Metallurgy and Materials; College of Engineering and Physical Sciences, Birmingham, 2012.

GIL, S. Pascual et al.. Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials. **Journal of Controlled Release**, v. 203, p. 23-38, 2015.

GEYTER, De N. et al..Treatment of polymer films with a dielectric barrier discharge in air, helium and argon at medium pressure. **Surface and Coatings Technology**, v.201, p. 7066-7075, 2007.

GUO, Chao; CAI, Ning; DONG, Yinsheng. Duplex surface modification of porous poly(lactic acid) scaffold. **Materials Letters**, p.11-14, 2013.

HAO, L, Lawrence J, Li L. The Wettability Modification Of Bio-Grade Stainless Steel In Contact With Simulated Physiological Liquids By The Means Of Laser Irradiation. **Apply Surface Science**, p.247-453, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sala de Imprensa. Notícias – **Em 2011, esperança de vida ao nascer era de 74,08 anos**. Comunicação Social, 29 nov. 2012. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2271>. Acesso em: 01 maio 2013.

JACOBS, Tinneke et al.. Plasma Surface Modification of Biomedical Polymers: Influence on Cell-Material Interaction. **Plasma Chemistry and Plasma Process**, v. 32, p. 1039-1073, 2012.

JAHNO, Vanusca Dalosto. **Síntese e Caracterização do Poli(L-ácido Láctico) para Uso como Biomaterial**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 70 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JEONG, Claire G.; HOLLISTER, Scott J. A comparison of the influence of material on in vitro cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffold architecture seeded with chondrocytes. **Biomaterials**, v. 31, p. 4304-4312, 2010.

JIAO, Yanpeng; et al.. Protein Adsorption and Cytocompatibility of Poly(L-lactic acid) Surfaces Modified with Biomacromolecules. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, p. E501–E510, 2012.

JUNKAR, Ita; CVELBAR, Uros; LEHOCKY, Marian. Plasma Treatment of Biomedical Materials. **Materials and technology**, p. 221-226, 2011.

KALE, H. K.; DESAI, N. A. Atmospheric pressure plasma treatment of textiles using non polymerizing gases: review. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v. 36, p. 289-299, 2011.

KALIA, Susheel et al.. Surface modification of plant fibers using environment friendly methods for their application in polymer composites, textile industry and antimicrobial activities: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p.16, 2013.

KASALKOVA, Slepickova N. et al.. Biocompatibility of plasma nanostructured biopolymers. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 307, p.642-646, 2013.

KASALKOVA, Slepickova N. et al.. Surface changes of biopolymers PHB and PLLA induced by Ar+ plasma treatment and wet etching. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v.332, p. 63-67, 2014.

KEEN, I. et al.. Introducing amine functionalities on a poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxivalerate) surface: Compring the use of ammonia plasma treatment and ethylenediamine aminolysis. **Biomacromolecules**, v.7, p.427-434, 2006.

KHORASANI, T.M; MIRZADEH, H.;IRANI, S. Plasma Surface Modification of Poly (L-lactic acid) and Poly (lactic-co-glycolic acid) Films for Improvement of Nerve Cells Adhesion. **Radiation Physics and Chemistry**, p. 280-287, 2008.

KOLSKÁ, Zde_nka et al.. Plasma activated polymers grafted with cysteamine improving surfaces cytocompatibility. **Polymer Degradation and Stability**, v.101, p. 1-9, 2014.

KIM, G. Sahng et al.. Engineering of a periodontal ligament construct: cell and fibre alignment induced by shear stress. **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, p. 1130-1136, 2011.

LASPRILLA, Astrid Juliana Rincón. **Síntese do Poli-Ácido Láctico a partir do Ácido Láctico para Aplicação Biomédica**. 2011.138p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Unicamp – Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2011.

LIM, Jung. Yul. et al.. Systematic Variation In Osteoblast Adhesion and Phenotype With Substratum Surface Characteristics. **Journal Biomed Matter Res A**, v. 68, p. 504-512, 2004.

LIM, T. L.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly (lactic acid). **Progress in Polymer Science**, v. 33. p. 820-852, 2008.

LIN, Yuan. et al.. Surface modification of poly(L-lactic acid) to improve its cytocompatibility via assembly of polyelectrolytes and gelatin, **Acta Biomaterialia** 2, p.155–164, 2006.

LIU, Wei et al.. Effects of plasma treatment to nanofibers on initial cell adhesion and cell morphology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p.101-106, 2014.

LIZUNDIA, Erlantz et al.. Biocompatible Poly(L-lactide)/MWCNT-Nanocomposites: Morphological, Characterization, Electrical Properties, and Stem Cell Interaction. **Macromolecular Bioscience**, v.12, p. 870-881, 2012.

LOO, Say Chye Joachim et al.. Hydrolytic degradation of electron beam irradiated high molecular weight and non- irradiated moderate molecular weight PLLA. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 287-296, 2006.

LUCAS, Elizabete F.; SOARES, Bluma G.; MONTEIRO, Elisabeth E. C. **Caracterização de Polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. 1 ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

LUNT, J. Large scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 145-152, 1998.

MATTIOLI, S; KENNY, M.J.; ARMENTANO, I. Plasma Surface Modification of Porous PLLA Films: Analysis of Surface Properties and In Vitro Hydrolytic Degradation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, p. E239-E247, 2012.

MONTGOMERY, Douglas C.; RUNGER, George C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. 2 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003.

MORENT, Rino; GEYTER, De Nathalie. Non-Thermal Plasma Surface Modification of Biodegradable Polymers. **Biomedical Science, Engineering and Technology**, p. 225-246, 2012.

MORENT, Rino et al.. Plasma Surface Modification of Biodegradable Polymers: A Review. **Plasma Processes and Polymers**, p. 171-190, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, nº. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R.; **Síntese, caracterização e degradação *in vitro* do poli(L-ácido láctico)**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.16, p. 26-32, 2006.

MOTHÉ, Cheila Gonçalves; AZEVEDO, Aline Damico de. **Análise Térmica de Materiais**. 1 ed. São Paulo: Artliber, 2009.

NAIR, Lakshmi S.; LAURENCIN, Cato T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762-798, 2007.

NAMPOOTHIRI, K. Madhavan; NAIR, Nimisha Rajendran; JOHN, Rojan PAppy. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101,nº22, p. 8493-8501, 2010.

OIKONOMOU, Antonios. **Composite micromechanics of flax fibres and poly(L-lactic acid) microdroplets**. 2010. 86p. Thesis (Master of Philosophy in the Faculty of Engineering and Physical Sciences) - The University of Manchester, Manchester, 2010.

OLIVEIRA, Freitas Andrade de Soares Luciana et al.. Biomateriais com Aplicação na Regeneração Óssea – Método de Análise e Perspectivas Futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, p.37-44, 2010.

ORÉFICE, Rodrigo Lambert; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; MANSUR, Herman Sander. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PELTONIEMI, Hilka et al.. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.94, p. 5-14, 2002.

PIETRO, Favia. Plasma Deposited Coatings for Biomedical Materials and Devices: Fluorocarbon and PEO-like Coatings. **Surface & Coatings Technology**, p. 7, 2012.

RAQUEZ, Jean-Marie et al.. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v.38, p.1504-1542, 2013.

RASAL, M. Rahul et al.. Poly (lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**, v.35, p. 338-356, 2010.

RECUM, Von F. Andreas. **Handbook of biomaterials Evaluation: Scientific, Technical and Clinical Testing Implant Materials**. 2ed. London, UK: Taylor & Francis; 1999. p. 1-21.

RIMPELOVÁ, Silvie et al.. Surface Modification of Biodegradable Poly(L-Lactic Acid) by Argon Plasma: Fibroblasts and Keratinocytes in the Spotlight. **Plasma Processes and Polymers**, v.11, p. 1057-1067, 2014.

ROSSNAGEL, Stephen M.; CUOMO, Jerome J.; WESTWOOD, William D. **Handbook of Plasma Processing Technology** - Fundamentals, Etching, Deposition and Surface Interactions. New Jersey, Noyes, 1989. 523p.

SANTOS Jr., Arnaldo R.; WADA, F. Lucia Maria. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.17, nº 4, p. 308-317, 2007.

SARAPIROM, S. et al.. Effect of surface modification of poly(lactic acid) by low-pressure ammonia plasma on adsorption of human serum albumin. **Applied Surface Science**, v.310, p.42-50, 2014.

SATHISKUMAR , P. S.; MADRAS, Giridhar. Synthesis, characterization, degradation of biodegradable castor oil based polyesters. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 1695-1704, 2011.

SHENG, S.J. et al.. Mechanical and thermal property characterization of poly-L-lactide (PLLA) scaffold developed using pressure-controllable green foaming technology. **Materials Science and Engineering**, v. 49, p. 612-622, 2015.

SILVA, Fabiana Medeiros da. **Desenvolvimento, Caracterização e Estudo Pré-Clinico de Dispositivos Implantáveis Biocompatíveis Baseados no Polímero Poli(ϵ -Caprolactona)**. 2011. 139p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2011.

SINGH, N.L. et al.. Surface modification of polymeric blends by nitrogen plasma implantation. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 8278 – 8281, 2007.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SLEPIČKA, P. et al.. Poly-L-lactic acid modified by etching and grafting with gold Nanoparticles. **Journal Material Science**, p.9, 2013a.

SLEPIČKA, Petr. et al.. Surface Modification of Biopolymers by Argon Plasma and Thermal Treatment. **Plasma Processes and Polymers**, p.197-206, 2012b.

SLEPIČKA, P.; MICHALJANIOVÁ, I.; SVORCÍK, V. Controlled biopolymer roughness induced by plasma and excimer laser treatment. **Express Polymer Letters**, v. 7, n. 11, p. 950-958, 2013c.

SLEPIČKA, Petr et al.. Nano-structured and functionalized surfaces for cytocompatibility improvement and bactericidal action. **Biotechnology Advances**, p. 1-10, 2015d.

SOARES, Almeida de Dulce Glória et al.. **Materiais Avançados no Brasil 2010-2022**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

SOETHE, Viviane Lilian. **Deposição de filmes metálicos sobre poli (tereftalato de etileno) via triodo-magnetron-sputtering: influência da corrente e da voltagem nas propriedades dos filmes**. UDESC, 2004. 122p. Dissertação (Pós- Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais – PGCEM) - Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Santa Catarina, 2004.

SONG, Ping et al.. Rapid crystallization of poly(L-lactic acid) induced by a nanoscaled zinc citrate complex as nucleating agent. **Polymer**, v. 53, p. 4300-4309, 2012.

STANKEVICH, Ksenia S. et al.. Surface modification of biomaterials based on high-molecular polylactic acid and their effect on inflammatory reactions of primary human monocyte-derived macrophages: Perspective for personalized therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 51, p. 117-126, 2015.

TERAOKA, Fumio; NAKAGAWA, Masafumi; HARA, Masashi. Surface Modification of Poly (L-lactide) by Atmospheric Pressure Plasma Treatment and Cell Response. **Dental Materials Journal**, v. 25, n°3, p. 560-565, 2006.

TIAN, Huayu et al.. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**, v.37, p.237-280, 2012.

TVERDOKHLEBOV, S. I. et al.. Modification of polylactic acid surface using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target for increased biocompatibility. **Applied Surface Science**, v. 329, p. 32-39, 2015.

VALENCE, Sarra de et al.. Plasma treatment for improving cell biocompatibility of a biodegradable polymer scaffold for vascular graft applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.85, p. 78-86, 2013.

VILAPLANA, A. Jordá- et al.. Surface modification of polylactic acid (PLA) by air atmospheric plasma treatment. **European Polymer Journal**, v.58, p. 23-33, 2014.

VIDAURRE, E.F.C.; et al.. Surface modification of polymeric materials by plasma treatment. **Materials Research**, v. 5, n°1, p. 37- 41, 2002.

WELTMANN, K. –D et al.. Plasma Processes and Plasma Sources in Medicine. **Contributions to Plasma Physics**, v. 52, n°7, p. 664-654, 2012.

WIKESJO, E. M. Ulf et al.. Periodontal Repair in Dogs: Evaluation of a Bioabsorbable Space-Providing Macro-Porous Membrane with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 5, p. 635-647, 2003.

WILLIAMS, F. David. On the nature of biomaterials. Leading Opinion. **Biomaterials**, v. 30, p.5897-5909, 2009.

WOEDTKE, TH. Von et al.. Plasmas for medicine. **Physics Reports**, v. 530, n° 4, p. 291-320, 2013.

XU, Hao et al.. Enhanced Endothelialization on Surface Modified Poly (L-Lactic Acid) Substrate. **Tissue engineering: Part A**, v. 17, no 5 and 6, p. 865 – 876, 2011.

YAMAOKA, Tetsuji. et al.. Surface Modification of Poly(L-lactic acid) Nanofiber with Oligo(D-lactic acid) Bioactive-Peptide Conjugates for Peripheral Nerve Regeneration. **Polymers**, p.820-832, 2011.

YANAGIDA, Hiroshi et al.. Preparation and in vitro/in vivo evaluations of dimpled poly(L-lactic acid) fibers mixed/coated with hydroxyapatite nanocrystals. **Artificial Organs**, v.14, p. 331-341, 2011.

YANG, Guang. et al.. Poly (lactic acid) – Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. **Biomedical Science, Engineering and Technology**, p.247-282, 2012.

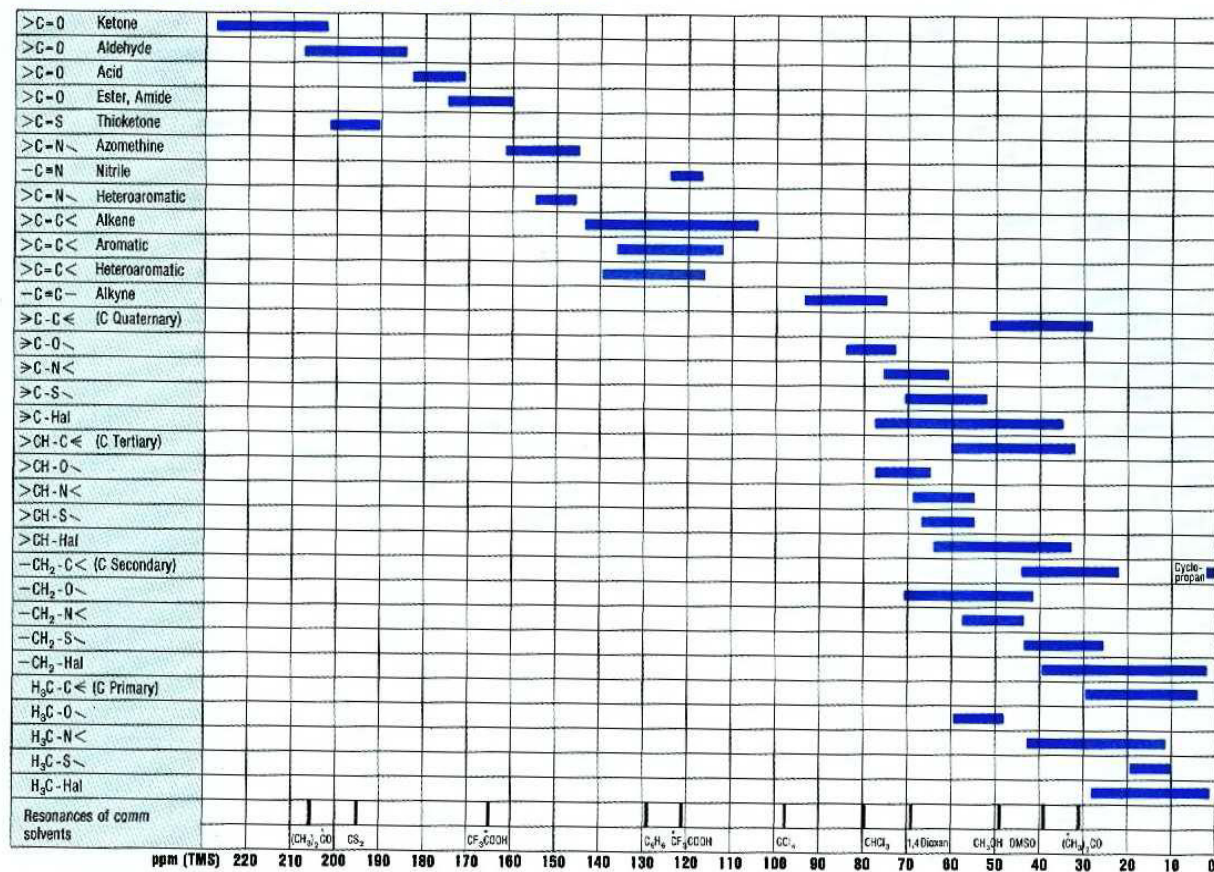
YUE, Mengyao et al.. Switchable hydrophobic/hydrophilic surface of electrospun poly(l-lactide) membranes obtained by CF₄ microwave plasma treatment. **Applied Surface Science**, v. 327, p. 93-99, 2015.

ZHANG, H. Y. et al.. Effects of Ar–H₂–N₂ microwave plasma on chitosan and its nanoliposomes blend thin films designed for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 93,p. 401- 411, 2013.

ZHANG, Qingwei et al. Mechanical properties and biomineralization of multifunctional nanodiamond-PLLA composites for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.33, p. 5067-5075, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1

¹³C Chemical Shifts in Organic Compounds*

* Relative to internal tetramethylsilane.