

Sílvia Miranda Ferreira

WRINKLED SURFACES: SERÃO AS RUGAS A MELHOR SUPERFÍCIE?

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Biomédica, especialidade Biomateriais e Instrumentação, orientada pela Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade e apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Wrinkled Surfaces: Serão as Rugas a Melhor Superfície?

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia
Biomédica*

Autor

Sílvia Miranda Ferreira

Orientadora

Ana Paula da Fonseca Piedade

Coimbra, 2017

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:

Centro de Engenharia Mecânica Materiais e Processos da Universidade de Coimbra



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

“The greatest glory in living lies not in never falling
but in rising every time we fall.”

Nelson Mandela

Aos meus pais.

Agradecimentos

Um especial agradecimento à Professora Doutora Ana Paula Piedade, pela orientação, por todos os conhecimentos transmitidos, pela ajuda e simpatia constantes ao longo deste ano. Foi sem dúvida uma honra ter terminado esta etapa ao seu lado.

À Professora Doutora Teresa Vieira, pela simpatia com que me recebeu no grupo de Materiais e Engenharia de Superfícies e pela disponibilização dos recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doutor Mamhoud Tavakoli do Instituto de Sistemas e Robótica da Universidade de Coimbra pela disponibilização do polímero utilizado neste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Jorge Duarte e ao Doutor Ivan Lalanda do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade em efetuar os testes *in vitro* com as células neuronais.

À Doutora Paula Morais e à Doutora Rita Branco do Laboratório de Microbiologia pela disponibilização de recursos e pela ajuda para efetuar os testes *in vitro* com as células procariotas.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio e pelo amor que nunca me faltou e por terem estado sempre lá a dizer “Tu vais conseguir!”. Não há nada que pague o amor e o orgulho que sinto por vocês.

Ao Mário, pelo amor e amizade constantes ao longo destes anos, pelo apoio incondicional, pela paciência e pela força que me deu para continuar a lutar.

Às minhas amigas de Barcelos, pela amizade, apoio e por estarem sempre presentes independentemente dos quilómetros que nos separam.

Às minhas amigas de Coimbra, pela amizade, apoio e incentivo constantes. Tornaram estes cinco anos inesquecíveis!

A todos vocês, o meu MUITO OBRIGADA!

Resumo

As superfícies rugosas surgiram como uma forma de alterar a superfície dos biomateriais e de aproximá-los mais do que é a verdadeira mimetização do ambiente biológico das células. Esta topografia aliada a uma química favorável à célula faz com que a probabilidade de sucesso do biomaterial seja maior. Neste contexto surgiu o tema desta dissertação que teve como principal objetivo desenvolver superfícies com diferentes topografias e estudar a sua influência no comportamento celular.

A pulverização catódica r.f. magnetron, foi a técnica utilizada para depositar filmes finos de carbono e poliamida 6,6 sobre PDMS e silício e conseqüentemente desenvolver topografias diferentes. Através da utilização do poli(dimetil siloxano) (PDMS) como substrato foi possível desenvolver superfícies com rugas a uma escala nanométrica e micrométrica, com um comprimento de onda entre 10 e 16 μm . Com a utilização do silício, a topografia formada foi apenas à escala nanométrica. O objetivo, ao desenvolver superfícies quimicamente iguais, mas com topografias diferentes, era a possibilidade de poder inferir sobre qual das características tem maior influência no comportamento da célula.

As superfícies foram caracterizadas e posteriormente testadas *in vitro* como suporte para cultura de células do córtex de embrião de rato. Após 14 dias de contacto não se observou adesão celular nas superfícies com microrrugidade uma vez que os comprimentos de onda testados eram inferiores ao tamanho do corpo celular dos neurónios. Nas superfícies com nanorrugosidade ocorreu adesão celular e esta foi mais favorável nos filmes finos de carbono uma vez que estes apresentavam um potencial zeta menos negativo.

Uma vez que o impedimento principal para a adesão das células à superfície com microrrugosidade foi o tamanho do corpo celular dos neurónios, não foi possível avaliar a orientação dos axónios. Com esse objetivo, a superfície com microrrugosidade foi colocada em contacto com uma rede neuronal já desenvolvida e ao fim de 14 dias observou-se que alguns axónios migraram para a superfície e continuaram a formar a rede neuronal. Este resultado vem mostrar que a superfície com microrrugosidade, apesar de não permitir a adesão inicial das células, apresenta uma química e uma topografia favorável para a posterior

adesão de axónios. Com este trabalho deram-se os primeiros passos para a otimização de tubos guia que permitam a regeneração de axónios danificados do sistema nervoso periférico

Palavras-chave: Superfícies rugosas; pulverização catódica r.f. magnetron; filmes finos; carbono amorfo; poliamida 6,6; células neuronais

Abstract

Wrinkled surfaces have emerged as a way of modifying the surface of biomaterials and bringing them closer to the mimicking of the biological environment of cells. This topography, combined with a cell-friendly chemistry, makes the biomaterial's probability of success higher. It is in this context that the current dissertation was developed and its main objective was to produce wrinkled surfaces with different topographies and evaluate its influence on cell behavior.

Sputtering r.f. magnetron was the technique used for the deposition of carbon and polyamide 6,6 thin films on polydimethylsiloxane (PDMS) and silicon surfaces and consequently develop different topographies. Though the use of PDMS as substrate, it was possible to develop surfaces with wrinkles at the nano- and micrometric scale, with a wavelength between 10 and 16 μm . With the use of silicon as substrate, the topography presented roughness only at the nanometric scale. The goal, by developing surfaces with the same chemistry but with different topographies, was to evaluate which of these two characteristic had the greatest influence on the cell behavior.

The surfaces were characterized and then they were tested *in vitro* as support for rat embryo cortex cells. After 14 days of contact, no cell adhesion was observed on surfaces with microroughness, since their wavelength was smaller than the body size of the neurons. On the surfaces with nanoroughness, cell adhesion occurred and it was more favorable in the carbon thin films because the zeta potential on its surfaces was less negative.

Since the main hindrance for cell adhesion to microroughness surfaces was the size of neurons' cell body, it was not possible to evaluate the orientation of the axons through the topography. With this purpose, the wrinkled surface was placed in contact with an already developed neural network and, after 14 days of contact, it was observed that some axons migrate to the surface and continued to develop a neural network. This result shows that the surface with wrinkles at micrometric scale does not allow the initial cell adhesion, but presents a favorable chemistry and topography for the subsequent adhesion and growth of the neural network. With this work, the first steps were taken to optimize guide tubes for the regeneration of damaged axons of the peripheral nervous system.

Keywords Wrinkled surfaces, r.f. Magnetron Sputtering, Thin Films, Amorphous carbon, Polyamide 6.6, neural cells.

Índice

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Simbologia e Siglas	xv
Simbologia.....	xv
Siglas	xvi
Introdução.....	1
1. Revisão Bibliográfica	3
1.1. Relação Biomaterial/Célula	3
1.1.1. Influência da Química da Superfície	5
1.1.2. Influência da Topografia da Superfície	7
1.2. Formação de Superfícies Rugosas	11
1.2.1. Formação de Rugas a partir da Pulverização Catódica	16
2. Materiais e Métodos	21
2.1. Pulverização Catódica.....	21
2.2. Análise Morfológica/Topográfica.....	22
2.2.1. Microscopia de Focagem Infinita.....	22
2.2.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	23
2.2.3. Microscopia de Força Atómica.....	23
2.3. Análise Estrutural	24
2.4. Análise Química	25
2.4.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	25
2.4.2. Espectroscopia de Fotoeletrão X.....	25
2.4.3. Espectroscopia de Raman.....	26
2.5. Molhabilidade	27
2.6. Potencial de Corrente.....	29
2.7. Testes in vitro.....	30
2.7.1. Células Procariotas	30
2.7.2. Células Eucariotas	32
3. Resultados e Discussão.....	35
3.1. Estudo Preliminar	35
3.2. Caracterização Morfológica/ Topográfica	41
3.3. Caracterização Estrutural	46
3.4. Caracterização Química.....	47
3.4.1. FTIR	47
3.4.2. XPS.....	50
3.4.3. Espectroscopia de Raman.....	53
3.5. Molhabilidade	54
3.5.1. Ângulo de Contacto Estático	54
3.5.2. Energia Superficial	56

3.6. Potencial de Corrente.....	58
3.7. Testes in vitro	59
3.7.1. Células Procariotas	59
3.7.2. Células Eucariotas	63
Conclusões	69
Referências Bibliográficas	71
Apêndice A.....	79
Apêndice B.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema representativo da ligação da célula com o biomaterial. Adaptado de [5].	4
Figura 1.2 Esquema representativo da conformação da proteína e o seu efeito na ligação com as células em superfícies hidrófilas (esquerda) e hidrófobas (direita). Adaptado de [13].	6
Figura 1.3 Padrões utilizados para o alinhamento de células. (A) Sulcos lineares e ondulados; (B) Pilares; (C) Poços; (D) Rugas e (E) Scaffold fibroso. Adaptado de [4].	9
Figura 1.4 Sistemas poliméricos capazes de formar superfícies rugosas. Adaptado de [24].	13
Figura 1.5 Microscopia ótica da superfície do poliestireno revestido com titânio quando imerso em vapores de tolueno. Adaptado de [29].	14
Figura 1.6 Esquema representativo do processo de formação de rugas por aplicação de uma força mecânica. Adaptado de [30].	15
Figura 1.7 Esquema representativo do processo de formação de rugas através de tratamentos térmicos. Adaptado de [33].	16
Figura 2.1 Esquema representativo da medição do ângulo de contacto e as tensões interfaciais existentes. Adaptado de [39].	27
Figura 2.2 Esquema representativo dos modelos de Wenzel (a) e Cassie-Baxter (b).	29
Figura 2.3 Representação esquemática do modelo da dupla camada elétrica. Adaptado de [40].	29
Figura 3.1 Microscopia ótica dos substratos antes da limpeza (a, b), após a limpeza (c, d) e após deposição de um filme de carbono com as condições W7 (e, f).	36
Figura 3.2 Micrografia da superfície do substrato de silicone sujeito ao processo de limpeza por plasma com uma potência de 250 W.	37
Figura 3.3 Esquema representativo do processo de formação de rugas. (a) expansão do substrato durante o processo de limpeza; (b) expansão contínua do substrato aquando da deposição do filme e (c) arrefecimento do substrato e posterior formação de rugas na superfície. Adaptado de [44].	38
Figura 3.4 Microscopia de focagem infinita do filme N1 depositado sobre PDMS (a) e respetivo perfil da rugosidade assinalada pela linha vermelha (b).	39
Figura 3.5 Micrografias da superfície e da seção transversal do filme W4 (a, b), do filme W6 (c, d) e do filme N1 (e, f) depositados sobre PDMS.	42
Figura 3.6 Micrografia da seção transversal do filme N1 depositado sobre silício.	43
Figura 3.7 Imagem topográfica (a) e de amplitude (b) do filme N1 depositado sobre PDMS.	44

Figura 3.8 Imagem topográfica e de amplitude do filme W4 (a, b) e do filme W6 (c, d) depositados sobre silício, respetivamente.	45
Figura 3.9 Difractograma do filme fino W4 depositado sobre PDMS.....	46
Figura 3.10 Espetro de FTIR do filme de carbono W4(azul) e do filme de carbono W6 (laranja) depositados sobre silício.....	48
Figura 3.11 Espetro de FTIR do filme N1 depositado sobre silício (azul) e do alvo de poliamida 6,6 (laranja).	49
Figura 3.12 Desconvolução do pico de carbono do filme W4 (a), W6 (b), e N1 (c) e desconvolução do pico de azoto do filme N1 (d).....	51
Figura 3.13 Espetros de Raman do filme W4 (a) e W6 (b).....	53
Figura 3.14 Variação do ângulo de contacto de uma gota de formamida colocada na superfície do filme de carbono depositado sobre PDMS em função do tempo. ...	56
Figura 3.15 Variação do ângulo de contacto de uma gota de água colocada na superfície do filme N1 depositado sobre PDMS em função do tempo. A linha a tracejado corresponde ao ângulo medido no filme depositado sobre vidro.....	56
Figura 3.16 Filme W4 em contacto com a <i>B. subtilis</i> (a, b) e <i>S. aureus</i> (c, d).....	60
Figura 3.17 Filme W4 em contacto com <i>E. coli</i> (a, b) e <i>P. aeruginosa</i> (c, d).	61
Figura 3.18 Microscopia ótica da <i>B. subtilis</i> em contacto com o filme W4 (a, b), <i>P. aeruginosa</i> em contacto com o filme W6 (c, d) e <i>S. aureus</i> em contacto com filme W4 (e, f).	62
Figura 3.19 Microscopia ótica dos neurónios desenvolvidos no filme W4 (a, b), no filme W6 (c, d) e no filme N1 (e, f).	64
Figura 3.20 Esquema representativo da abordagem adotada para testar a interação entre os neurónios e a superfície rugosa.	65
Figura 3.21 Microscopia ótica (a) e micrografia (b) das células que aderiram à lamela de vidro revestida com poli-L-lisina e micrografias de partes da rede neuronal que se desenvolveram no filme W4 depositado sobre PDMS (c, d).....	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Designação e parâmetros de deposição utilizados no processo de limpeza e deposição.....	22
Tabela 3.1 Comprimento de onda, amplitude e parâmetros de rugosidade dos filmes depositados sobre PDMS.....	40
Tabela 3.2 Espessura dos filmes W4, W6 e N1.....	44
Tabela 3.3 Parâmetros de rugosidade dos filmes W4, W6 e N1 depositados sobre silício. 45	
Tabela 3.4 Identificação das bandas nos espectros de FITR dos filmes de carbono W4 e W6.	48
Tabela 3.5 Identificação das bandas nos espectros de FTIR do filme N1 e do alvo de poliamida 6,6.....	50
Tabela 3.6 Quantificação, por XPS, da composição química dos filmes W4, W6 e N1.....	51
Tabela 3.7 Ângulos de contacto médios dos filmes depositados sobre vidro e sobre PDMS.	54
Tabela 3.8 Tensões superficiais dos filmes e respetivas componentes dispersiva e polar. .	57
Tabela 3.9 Valores do potencial zeta dos filmes W4, W6 e N1.....	58

SIMBOLOGIA E SIGLAS

Simbologia

f_0 - frequência de ressonância.

λ - comprimento de onda

A – amplitude.

k - constante de força.

d - distância interplanar.

θ - ângulo de incidência dos raios X.

n - número inteiro.

λ - comprimento de onda da radiação incidente.

E_K - energia cinética do fotoelétrão.

E_b - energia de ligação do elétron.

$h\nu$ - energia do fóton.

W_s - função de trabalho.

γ_{LV} - tensão na interface líquido – vapor.

γ_{SV} - tensão na interface sólido – vapor.

γ_{SL} - tensão na interface sólido-liquido.

θ - ângulo de contacto de Young.

θ' - ângulo na superfície isenta de rugosidade.

r - fator de rugosidade.

θ_e - ângulo de contacto experimental.

f - fração da superfície do sólido em contacto com o líquido.

ζ - potencial zeta

α – coeficiente de dilatação linear.

γ_s - tensão superficial do filme.

γ_s^d e γ_s^p - componente dispersiva e polar da tensão superficial do filme.

γ_L - tensão superficial do liquido.

γ_L^d e γ_L^p - componente dispersiva e polar da tensão superficial do liquido.

Siglas

ECM – Matriz Extracelular.

PDMS - poli(dimetil siloxano).

PS- poliestireno.

PDA-polidopamina.

PVD – Deposição Física em estado de Vapor.

PMMA - poli(metacrilato de metilo).

IFM – Microscopia de Focagem Infinita.

SEM – Microscopia Eletrónica de Varrimento.

AFM – Microscopia de Força Atómica.

XDR – Difração de raios X.

FTIR – Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.

ATR – Reflectância Total Atenuada.

XPS – Espetroscopia do Fotelectrão X.

PBS – Solução salina com tampão fosfato.

HBSS - Solução balanceada de Hank.

INTRODUÇÃO

A pesquisa para desenvolver melhores biomateriais tem sido tema de investigação desde há várias décadas. No caso particular dos biomateriais cuja finalidade é a interação com células, estes têm sofrido uma otimização contínua de forma a torna-los cada vez menos um objeto estranho e cada vez mais uma parte integrante de todo um sistema complexo. Esta otimização passou inicialmente por tentar desenvolver superfícies cuja componente química fosse o mais semelhante possível com o ambiente biológico das células. Contudo, com o avanço da ciência também a topografia da superfície começou a revelar-se importante e atualmente sabe-se que estas duas características em conjunto desempenham um papel fundamental para o sucesso do biomaterial.

As superfícies rugosas, por apresentarem uma topografia mais natural e consequentemente mais semelhante com aquela a que as células estariam naturalmente em contacto, têm recebido grande destaque uma vez que apresentam capacidade para melhorar a adesão e a orientação celular quando comparadas com outras topografias. Este enquadramento, de estudar a formação de superfícies rugosas e o seu efeito no comportamento celular, é o que está na génese desta dissertação.

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi, a partir da pulverização catódica, desenvolver superfícies com topografias distintas, mas com a mesma composição química. Para tal, filmes finos obtidos pela pulverização de alvos de carbono e poliamida 6,6 foram depositados sobre substratos polimérico (poli(dimetil siloxano) – PDMS) e sobre silício. Devido à diferente natureza dos substratos é intenção de obter topografias distintas, com a mesma composição química, e deste modo avaliar a influência separada dos dois parâmetros no comportamento celular. Após a otimização dos parâmetros de deposição e da formação das rugas foram selecionadas as melhores superfícies para serem testadas *in vitro*. Estas foram utilizadas como suporte para a cultura de células, neste trabalho em particular, células do córtex de embrião de rato. Posteriormente, as superfícies foram analisadas para observar se ocorreu adesão celular e se as diferentes topografias induziram nas células comportamentos diferentes. Um breve estudo sobre a interação das superfícies desenvolvidas com células procaríotas foi também efetuado.

A presente dissertação está dividida em 3 capítulos em que no primeiro é apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre a interação das células com os biomateriais e em particular a influência das superfícies rugosas, bem como as técnicas utilizadas para as obter. No segundo capítulo são apresentadas as condições e técnicas de caracterização utilizadas e por fim, no terceiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Relação Biomaterial/Célula

O desempenho da interface entre um biomaterial e a célula é, sem dúvida, de vital importância para o sucesso do biomaterial. Assim, o desenvolvimento do mesmo deve ser acompanhado por uma compreensão previa e detalhada dos fenômenos que naturalmente ocorrem nessa interface. Processos como a adesão, proliferação diferenciação e migração celular são necessário de se conhecer, bem como os fatores externos envolvidos.

Esta tarefa de desvendar o que suporta a integração de um biomaterial tem sido, e continua a ser, um assunto ao qual é dedicado muita da investigação efetuada. Com efeito, as células são entidades complexas que se desenvolvem num ambiente também ele bastante complexo, a matriz extracelular (ECM – do inglês *extracellular matrix*), que influencia o seu comportamento. Este complexo fibroso tridimensional, constituído por um agregado insolúvel muito organizado de cadeias proteicas de elevado peso molecular – os glicosaminoglicanos (GAGs) entre outras biomacromoléculas, fornece às células um suporte mecânico, mas sobretudo fornece informação sobre a natureza química e física do ambiente que as rodeia [1, 2].

As células reagem consoante os estímulos/pistas que recebem do ambiente, nomeadamente do contacto com a matriz extracelular e as restantes células, conseguindo interpretar estas informações e posteriormente formular uma resposta fisiológica. É esta interação dinâmica e bidirecional que determina o comportamento da célula, nomeadamente os fenômenos de adesão, diferenciação, proliferação, migração e apoptose celulares [1, 3]. Este conhecimento sobre o comportamento da célula foi automaticamente transposto para a otimização do desenvolvimento de biomateriais, de forma a torná-los o mais semelhante possível com o ambiente biológico das células. Esta otimização da superfície dos biomateriais leva consequentemente a avanços em áreas como engenharia de tecidos, medicina regenerativa e a cultura de células [2, 4].

O processo de adesão celular a um biomaterial é uma das fases mais importantes para avaliar o sucesso do mesmo. Um ponto importante a considerar é que a célula nunca

interage diretamente com a superfície do material. Assim, numa primeira fase, quando o biomaterial entra em contacto com os fluidos biológicos, as proteínas presentes adsorvem de forma imediata à superfície. Estas proteínas (albumina, fibronectina, vitronectina, fibrinogénio) traduzem a estrutura e composição da superfície do biomaterial para uma linguagem biológica para as células. Esta fase é extremamente importante pois vai definir se o biomaterial foi aceite ou não pelo organismo.

A adsorção das proteínas à superfície do biomaterial vai então regular uma segunda fase, caracterizada pelo processo de adesão propriamente dito em que a célula contacta a superfície. Durante esta fase as células interagem com locais específicos das proteínas (**Figura 1.1**), tais como a sequência RGD (arginina, glicina e aspartato), despoletando uma expressão acentuada de proteínas do citoesqueleto da célula e de integrinas. Estas últimas são proteínas de adesão, situadas na membrana da célula, e que se ligam à sequência RGD das proteínas. Por este motivo, são assim responsáveis pela ligação célula-biomaterial e permitem ainda a passagem bidirecional de informação entre o material biótico e abiótico.

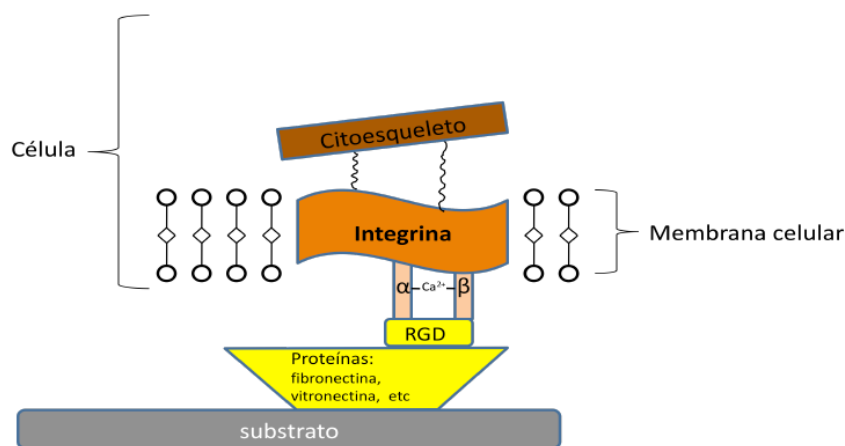


Figura 1.1 Esquema representativo da ligação da célula com o biomaterial. Adaptado de [5].

Numa terceira fase ocorre um aumento da área de contacto entre a célula e o substrato e é onde se dá a verdadeira troca de informação entre a superfície do biomaterial e a célula. Nesta fase os recetores de integrinas agregam-se, há uma reorganização do citoesqueleto e um espalhamento das células pela superfície do biomaterial. Por fim, as

células começam a sintetizar proteínas da matriz extracelular na interface com o biomaterial, formando uma interface célula/matriz/superfície do biomaterial [6, 7].

Para que ocorra este processo de adesão é importante que a superfície do biomaterial seja o mais semelhante possível com o ambiente biológico das células e, numa primeira instância, que seja favorável para a adsorção de proteínas. Assim as características da superfície do biomaterial devem ser conhecidas e se necessário modificadas para garantir o sucesso do biomaterial. Inicialmente, acreditava-se que mimetizando a química do meio biológico das células o sucesso do biomaterial era garantido. Contudo, para além das pistas químicas, foi observado que as células também respondem às pistas topográficas da superfície do biomaterial. Tal ocorre porque a matriz extracelular não é uma estrutura lisa, mas sim constituída por fibras e proteínas, que tornam a sua topografia bastante complexa. Assim, pode afirmar-se que são as pistas química e topográfica em conjunto que vão definir o comportamento da célula e, consequentemente, do sucesso do biomaterial [2, 4, 6, 8].

Em seguida vão ser apresentadas algumas considerações gerais sobre as designadas pistas química e topográfica, algumas estratégias utilizadas para mimetizar essas mesmas pistas e a sua influência no comportamento celular.

1.1.1. Influência da Química da Superfície

A química da superfície de um biomaterial foi o primeiro fator que se revelou determinante para o comportamento da célula, nomeadamente para o processo de adesão, proliferação e migração. Atualmente, o exemplo mais evidente da importância da química nestes processos é a necessidade de modificar a superfície das placas multipoços de poliestireno por tratamento de plasma para serem utilizadas como suporte para culturas de células [8, 9].

Os grupos funcionais presentes na superfície do biomaterial e, consequentemente, a sua molhabilidade e carga são os fatores principais a ter em conta aquando da modificação química de uma superfície [4, 10]. Como já referido anteriormente, numa primeira fase, o biomaterial é revestido com proteínas, assim, a correta conformação dessas biomoléculas está dependente das características físico-químicas da superfície. Por sua vez, as células ligam-se às proteínas em locais específicos, pelo que, se o local de ligação for comprometido também a adesão da célula será comprometida.

Deste modo, é necessário um conhecimento profundo sobre a constituição do meio de cultura/ fluidos biológicos com os quais o biomaterial vai interagir, bem como o tipo de célula com que se pretende fazer interagir esse mesmo material. Isto porque sabendo o tipo, a concentração e a conformação das proteínas que adsorvem á superfície é possível determinar a resposta das células [9].

a) Molhabilidade da Superfície

Atualmente, a molhabilidade, usualmente traduzida pela medição do ângulo de contacto estático, é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a interação dos biomateriais. Apesar de ser usualmente associada à química da superfície, depende também da sua rugosidade [2]. Os estudos desenvolvidos até hoje demonstraram que as células e as proteínas comportam-se de maneira diferente para superfícies com a mesma molhabilidade:

- as células, como fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais e neuronais aderem a superfícies hidrófilas, ou moderadamente hidrófilas e demonstraram um boa adesão, proliferação e diferenciação celular [6, 11, 9, 10];

- as proteínas tendem a adsorver mais em superfícies hidrófobas devido ao grande número de grupos não polares das proteínas [10, 12].

Esta diferença de comportamentos não é favorável para o sucesso do biomaterial pois a sua ligação a superfícies hidrófobas altera a sua conformação e as sequências de ligação com as células ficam comprometidas (**Figura 1.2**).

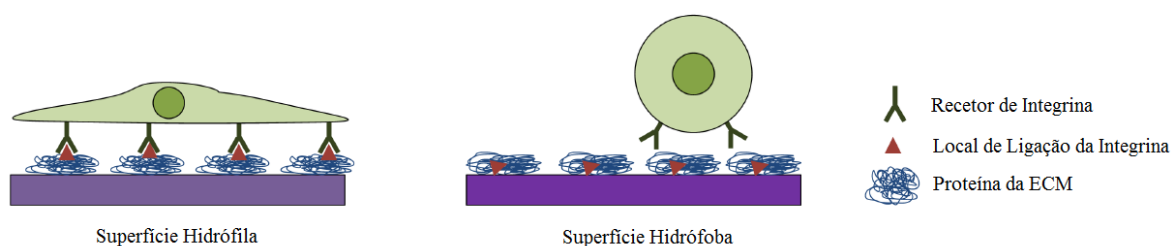


Figura 1.2 Esquema representativo da conformação da proteína e o seu efeito na ligação com as células em superfícies hidrófilas (esquerda) e hidrófobas (direita). Adaptado de [13].

Assim, é necessário utilizar materiais que minimizem esta oposição de comportamentos ou então recorrer a modificações da química da superfície. A utilização de grupos funcionais como $-CH_3$, $-OH$, $-COOH$, e $-NH_2$, com molhabilidade e carga bem definidas têm sido bastante utilizados para esse efeito [11, 14]. Um exemplo prático da sua aplicação foi a modificação de uma superfície com concentrações variáveis de grupos OH

(hidrófilos) e grupos $-CH_3$ (hidrófobos) realizada por Barrias e colaboradores [15]. Estes investigadores observaram que apesar de proteínas como a fibronectina ou a vetronectina aderirem preferencialmente a superfícies hidrófobas, à medida que a concentração de grupos $-OH$ aumentou, apesar de a adsorção de proteínas ter diminuído, a disponibilidade de locais de ligação com as células aumentou e conseqüentemente o número de células que aderiu à superfície também aumentou. Desta forma, a combinação de grupos funcionais com diferentes propriedades pode ser uma solução para modelar o comportamento das células na superfície dos biomateriais.

b) Carga da Superfície

É intuitivo que cargas opostas se atraem mutuamente, assim, o mesmo se passa quando a superfície de um material entra em contacto com o meio de cultura ou os fluidos biológicos constituídos por inúmeras cargas. As células, por apresentarem uma carga negativa na sua membrana, têm tendência a interagir com as cargas positivas presentes na superfície de um material [11, 14]. Esta interação foi confirmada com vários tipos de células, nomeadamente osteoblastos, fibroblastos e células neuronais onde se verificou uma boa adesão e proliferação [10, 11].

A utilização, mais uma vez, de grupos funcionais com características bem definidas promove a interação da superfície dos biomateriais com as células. Dos grupos mencionados anteriormente destaca-se o grupo amina – NH_2 que, por apresentar carga positiva, tem mostrado maior compatibilidade com as células. Grupos como $-OH$ ou $-COOH$, apesar de serem hidrófilos apresentam uma carga neutra e negativa, respetivamente, o que não promove a adesão celular.

1.1.2. Influência da Topografia da Superfície

A topografia pode ser definida como a distribuição espacial e estrutural das características de uma superfície, nomeadamente a arquitetura, a geométrica, as dimensões, as descontinuidades e os contornos [16].

Nos últimos anos, a influência das pistas topográficas nas decisões comportamentais da célula, tem vindo a ganhar relevância e, atualmente, são considerados como um dos principais fatores que influenciam o comportamento celular. Tal deve-se ao facto de as células apresentarem a capacidade de adaptar a sua forma e a sua orientação

consoante a topografia da superfície onde estão colocadas. Este fenómeno foi estudado pela primeira vez por Weiss, que lhe deu o nome de orientação por contacto (*contact guidance*) [17, 18, 19]. Esta orientação celular é explicada através de ciclos de mecanodeteção, mecanotransdução e mecanoresposta que ocorrem na célula e que lhes permite avaliar a topografia da superfície e definir uma resposta consoante a sua interpretação [1]. Este fenómeno tem sido observado em vários tipos de células como, neurónios, fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e neutrófilos. Para além da influência na forma e orientação das células, este fenómeno influencia os processos de adesão e diferenciação celular bem como os processos de síntese de proteínas [4].

Assim, diversos estudos têm vindo a ser realizados com o objetivo de investigar qual a topografia mais favorável para o desenvolvimento de determinado tipo de células. Os estudos realizados têm como foco o estudo da influência de quatro parâmetros, a saber: a rugosidade, a geometria, a distribuição espacial e as dimensões. No que concerne a rugosidade esta pode apresentar uma escala macrométrica (100µm-mm), micrométrica (100 nm aos 100 µm) ou nanométrica (menos de 100 nm) [11]. Quanto aos padrões, os mais testados são os sulcos (*grooves*), os poços (*pits*), os pilares/ilhas, os *scaffolds* fibrosos e as rugas (*wrinkles*) (**Figura 1.3**). A distribuição espacial pode ser anisotrópica, em que a topografia é caracterizada por apresentar uma direção preferencial ou isotrópica onde a topografia é igual independentemente da direção [4, 18, 20].

As dimensões da topografia em particular, nomeadamente a escala da rugosidade e as dimensões dos padrões (largura, profundidade e espaçamento), têm-se revelado cruciais na modelação do comportamento celular. Uma das principais conclusões a que se chegou foi que cada escala dimensional (nanométrica ou micrométrica) tem mais ou menos influência consoante a fase em que a célula esteja. As dimensões da topografia a uma escala nanométrica tem influência no comportamento celular de uma forma mais fundamental, nomeadamente na organização dos recetores que promovem a adesão das células, as integrinas. Já a escala micrométrica, normalmente com valor semelhante ao do tamanho da célula, tem mais influência nas características celulares e supra celulares como a morfologia da célula, os processos de migração e a organização dos tecidos [6, 18, 19].

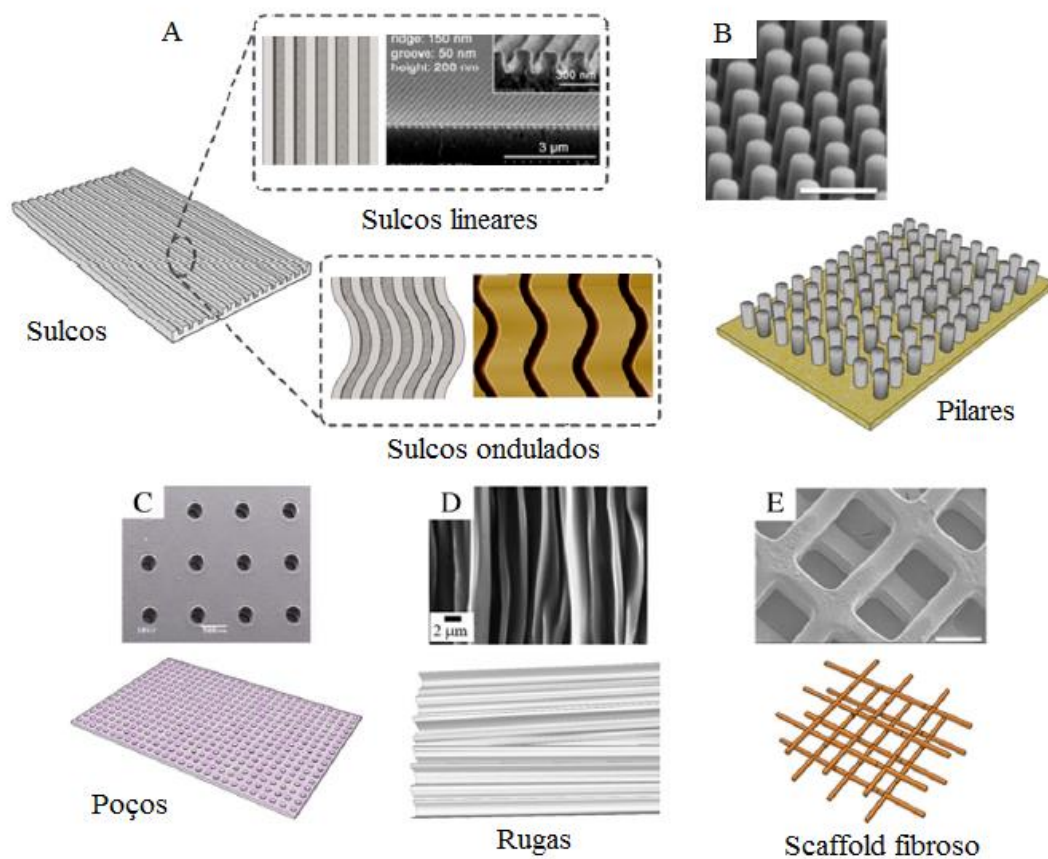


Figura 1.3 Padrões utilizados para o alinhamento de células. (A) Sulcos lineares e ondulados; (B) Pilares; (C) Poços; (D) Rugas e (E) *Scaffold* fibroso. Adaptado de [4].

A adesão celular é uma das fases mais importantes no processo de interação com um biomaterial, pelo que as dimensões topográficas refletem logo o seu efeito. Estudos realizados mostram que o processo de adesão está intimamente dependente tanto da escala nanométrica como da escala micrométrica. Ou seja, a nanotopografia influencia a aglomeração das integrinas, contudo o arranjo e a maturação da adesão focal (junções que permitem a ligação célula/substrato) é influenciado pela microtopografia [18]. Assim, uma topografia com combinação das duas escalas é mais favorável do que a utilização de cada uma em separado.

Esta combinação mostrou-se particularmente importante, por exemplo, na adesão de células de um sarcoma ósseo humano (MG63) a uma superfície de titânio padronizada com cavidades. Ao fazer variar o diâmetro das cavidades (10, 30 e 100 μm) os investigadores observaram que as células aderiam preferencialmente às superfícies com cavidades de 30 μm de diâmetro, tamanho semelhante ao da célula. Foi ainda possível

observar que a densidade de células aumentou, comparativamente com as superfícies com cavidades lisas, quando se induziu nas cavidades nanoporosidade, criando assim uma nanotopografia [21].

Depois das células aderirem à superfície do biomaterial começam a adotar a configuração da topografia do ambiente que as rodeia, baseadas nas conformações focais estáveis que formaram com a superfície. Por sua vez, esta configuração pode levar a alterações na morfologia, tamanho, alinhamento e eventualmente diferenciação da célula. Assim, nesta fase, também as dimensões da topografia, têm influência na resposta da célula [18]. De realçar que principalmente as dimensões dos padrões utilizado, como o espaçamento, a largura, o diâmetro ou a altura, mostraram ter grande influência no alinhamento e orientação das células [6, 11, 16]. Fu e colaboradores [22] demonstraram que uma superfície de poli(dimetil siloxano) (PDMS) padronizada com micro sulcos com dimensões bem definidas conseguem induzir o alinhamento e orientação de células de um sarcoma ósseo humano (HOS – do inglês *human osteo-sarcoma*). Dependendo do espaçamento entre os sulcos a orientação das células é diferente. Para espaçamentos menores do que 50 μm observou-se um grande alinhamento das células, contudo para espaçamentos superiores a 60 μm o alinhamento preferencial não foi conseguido e as células adotaram uma morfologia mais arredondada como se estivessem numa superfície lisa.

Para além das dimensões, a distribuição espacial e a geometria da topografia também mostraram ter influência no comportamento da célula, quer na adesão à superfície de um biomaterial, bem como no posterior alinhamento e migração.

No caso da distribuição espacial a sua influência não é consensual, contudo pensa-se que uma topografia anisotrópica tem mais influência nas variações morfológicas da célula, do citoesqueleto e na adesão focal. Estas por sua vez induzem variações na expressão génica e na diferenciação celular. Já uma topografia isotrópica não mostra ter influência no comportamento individual da célula mas sim no seu controlo coletivo [20].

Em relação à geometria da topografia existe um conjunto de padrões, mencionados anteriormente, muito utilizados para estudar o comportamento das células. Na literatura, os sulcos, os pilares e os poços são talvez os padrões mais mencionados e quando dimensionados em concordância com o tamanho da célula mostram ter mais influência na adesão, no alinhamento e migração de vários tipos de células do que as superfícies não

padronizadas. Contudo, a sua arquitetura quando comparada com a da matriz extracelular natural das células, que é bastante fibrosa, não é de todo a mais semelhante [4].

O enrugamento de superfícies surgiu assim como uma forma nova, de obter superfícies padronizadas a qualquer escala. A topografia caracteriza-se por ser ondulada e estão-lhe associados valores de amplitude e comprimento de onda. Deste modo esta topografia pode ser vista como uma rugosidade induzida uma vez que não se trata de um padrão típico como os sulcos ou os pilares. Dependendo da técnica utilizada é possível obter superfícies rugosas com uma direção definida ou com uma distribuição aleatória. Quando aplicadas a culturas *in vitro* as rugas têm mostrado induzir o alinhamento de vários tipos de células e melhorar a adesão e a organização dos recetores do citoesqueleto [4, 6]. Acresce o facto de a superfície do material se apresentar ondulada e a ausência de arestas mostrou ser favorável para a adesão e espalhamento das células. Esta conclusão foi de Hu e colaboradores [23] quando compararam o comportamento de células endoteliais em superfícies não padronizadas, superfícies com sulcos e superfícies rugosas. Apesar de observarem um alinhamento preferencial nas topografias padronizadas, de entre estas a topografia rugosa apresentou uma maior taxa de adesão inicial e uma menor taxa de morte celular.

Assim, a modelação da química e da topografia da superfície é necessária para garantir o sucesso do biomaterial e apesar dos dois parâmetros terem sido abordados separadamente é a sua influência em conjunto que garante um resultado satisfatório. Além das características da superfície é necessário ter em conta que o tipo de célula com que se pretende fazer interagir o material. Deste modo não existe uma superfície ótima para todos os tipos de células, mas sim uma superfície ótima para cada tipo de célula e para cada fase da célula.

1.2. Formação de Superfícies Rugosas

Atualmente existem técnicas sofisticadas que permitem criar na superfície dos biomateriais rugas a uma escala micrométrica e nanométrica. Algumas dessas técnicas são a moldagem, a nano/microimpressão, a ablação por laser, e a fotolitografia [24]. Contudo, devido à especificidade dos materiais poliméricos, foram criadas estratégias que tiram partido das instabilidades induzidas nos próprios polímeros. Devido às suas propriedades e

técnicas de processamento, os polímeros apresentam maior facilidade em serem modificados, o que se torna vantajoso quando utilizados como biomateriais [2]. Dentro das classes de polímeros destacam-se os elastómeros como mais vantajosos para a formação de rugas superficiais devido ao seu baixo módulo de elasticidade e, conseqüentemente, maior suscetibilidade à deformações induzida por estímulos externos [25].

Na **Figura 1.4** estão representadas três abordagens para obter uma superfície rugosa em polímeros, a saber:

1) polímeros homogêneos

Neste grupo incluem-se os polímeros viscoelásticos ou os géis reticulados em que as rugas se formam através de uma fase de transição de volume. Neste caso a origem do padrão é atribuída à instabilidade mecânica devido à variação abrupta de volume. Ou seja, o polímero na presença de um solvente específico incha, contudo como está sobre um substrato rígido forma-se uma pressão osmótica anisotrópica ao longo da espessura do polímero que leva à geração de uma tensão de compressão. Para diminuir esta tensão o polímero adota uma conformação ondulada na superfície o que dá origem a uma superfície rugosa [26, 27].

2) polímeros com variação gradual das propriedades mecânicas desde o interior até à superfície

Esta estratégia faz uso de processos de cura através de radiação UV ou por temperatura, infusão de um componente (p.e. silano) num polímero pré formado [28] ou polimerização seletiva da superfície. Todas estas técnicas levam à reticulação gradual do filme desde a superfície até ao interior. Como a superfície do polímero é reticulada primeiro torna-se mais rígida do que o interior dando origem a uma tensão compressiva que leva ao encolhimento da superfície o que forma a superfície rugosa.

3) múltiplas camadas poliméricas

Materiais como o PDMS, a poliuretana e o poliestireno, entre outros, cuja superfície é exposta a tratamentos físicos de forma a alterar as suas propriedades mecânicas ou revestem-na com um filme de outro material (polimérico ou metálico). A formação de rugas na superfície ocorre devido à aplicação de vários tipos de força: mecânica, por inchaço ou térmica [24]

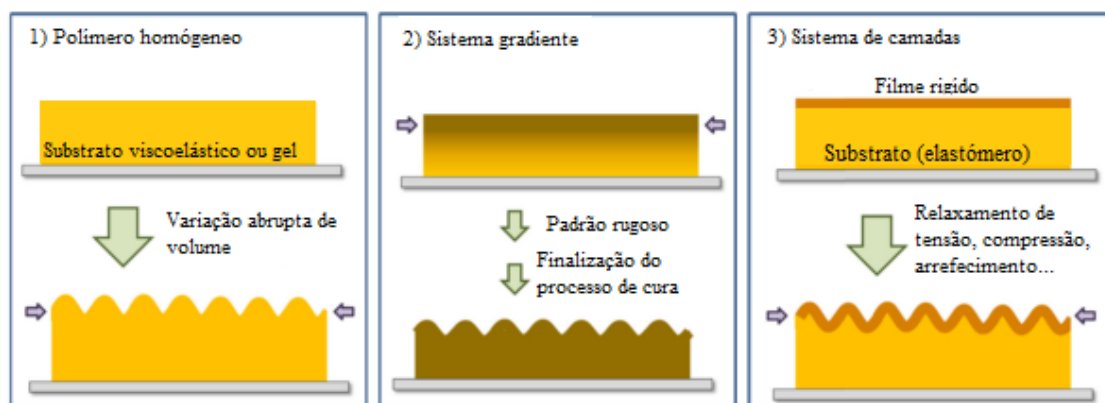


Figura 1.4 Sistemas poliméricos capazes de formar superfícies rugosas. Adaptado de [24].

Uma vez que nesta dissertação vai ser utilizada a abordagem da deposição de um filme fino, irá ser abordado de forma mais detalhada a formação de rugas em sistemas com multicamadas.

Este modelo utiliza um elastómero como substrato que tem a sua superfície modificada quer através de um tratamento físico ou pela deposição de um outro material. A formação de rugas ocorre devido às diferentes propriedades dos dois materiais, nomeadamente o módulo de elasticidade ou o coeficiente de expansão térmica. Assim, quando o elastómero sofre uma variação dimensional devido a fenómenos de inchaço (*swelling*), aplicação de forças mecânicas ou fenómenos térmicos formam-se tensões que para serem aliviadas levam à formação de rugas [24].

a) **Rugas induzidas por fenómenos de inchaço**

Um exemplo prático deste fenómeno foi o trabalho desenvolvido por Vandeparre e colaboradores [29]. No trabalho desenvolvido por este grupo foi utilizado o poliestireno (PS) revestido com um filme fino de titânio; o conjunto foi posteriormente imerso em vapores de tolueno à temperatura ambiente. O tolueno é um solvente do PS pelo que, em contacto com o polímero leva a que este inche. A difusão do tolueno acontece de forma linear pelas laterais do polímero ou de forma radial pelos defeitos estruturais no filme de titânio como se pode ver pela **Figura 1.5**. À medida que o volume do PS aumenta o filme de titânio fica sujeito a uma tensão compressiva que, quando ultrapassa determinado valor, leva o filme a formar rugas. Essas propagam-se consoante a difusão do solvente pelo que, no final as rugas têm uma distribuição linear ou radial.

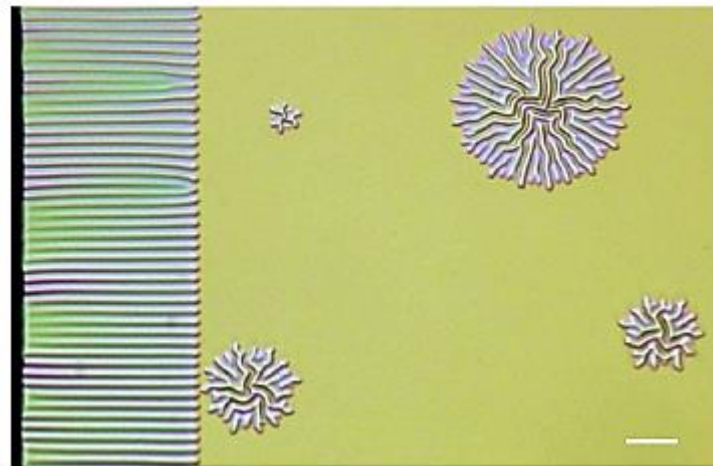


Figura 1.5 Microscopia ótica da superfície do poliestireno revestido com titânio quando imerso em vapores de tolueno. Adaptado de [29].

b) Rugas induzidas por aplicação de forças mecânicas

A aplicação de forças mecânicas é das técnicas mais abordadas na literatura para obter superfícies rugosas. Esta técnica consiste na aplicação de tensões, numa ou mais direções, concomitantemente com a modificação da superfície do elastómero. É assim uma técnica vantajosa pois permite controlar de forma precisa as dimensões e orientação das rugas através da direção de aplicação das tensões[24].

A modificação da superfície do elastómero é conseguida através da utilização de partículas muito energéticas que reagem com a superfície do polímero, o que leva a quebra de ligações e posterior rearranjo. O exemplo mais conhecido desta abordagem é a utilização do PDMS sujeito a tratamento de ultravioleta/ozono (UV/O) [30] ou plasma de oxigénio [31]. Deste modo há a formação de uma camada de sílica na sua superfície devido à quebra da ligação $-CH_3Si-$. Os radicais de oxigénio, derivados da dissociação do ozono ou presentes no plasma, reagem com o silício livre e formam grupos SiO_x . Assim, quando a tensão aplicada ao PDMS, durante a modificação da sua superfície, é libertada, a camada rígida de sílica tem tendência a formar um padrão rugoso uma vez que apresenta um módulo de elasticidade diferente do PDMS que a suporta (**Figura 1.6**) [30].

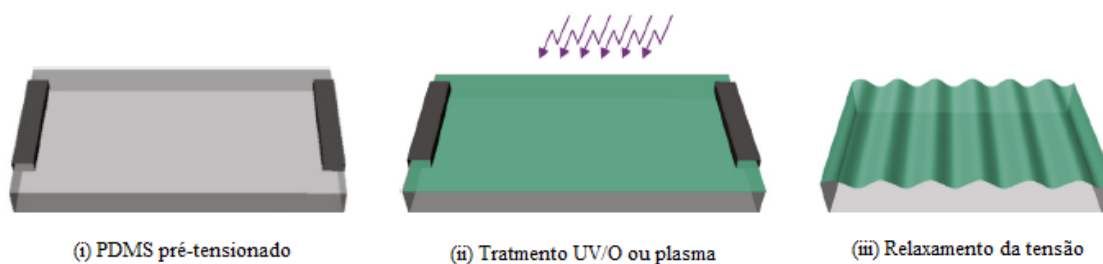


Figura 1.6 Esquema representativo do processo de formação de rugas por aplicação de uma força mecânica. Adaptado de [30].

A aplicação de tensões mecânicas aquando da deposição de um material, polimérico ou metálico, é outra forma de obter superfícies com este tipo de topografia. Dependendo da técnica aplicada para depositar o novo material, também podem estar envolvidos fenómenos térmicos para além das tensões mecânicas. Huang e colaboradores [32] obtiveram uma topografia rugosa através da aplicação de uma tensão durante a deposição de um filme de silício sobre a superfície do PDMS, utilizando a técnica de evaporação. A esta técnica está associada um aumento da temperatura o que induziu no PDMS, já anteriormente tensionado, uma maior variação dimensional devido à expansão térmica. Após retirar a solicitação mecânica, simultaneamente com a diminuição da temperatura, o PDMS voltou ao tamanho inicial acompanhado pelo filme de silício que enrugou. Devido à influencia destas duas forças o filme fica sujeito a uma força compressiva. as rugas formam-se devido à diferença entre os coeficientes de dilatação linear do silício e do PDMS e aos diferentes módulos de elasticidade.

c) Rugas induzidas por variações térmicas

Esta técnica não necessita da aplicação de tensões mecânicas nem utiliza solventes, apenas faz uso da variação dimensional que determinados polímeros sofrem devido às variações térmicas.

A forma de obtenção de superfícies rugosas é muito semelhante à de aplicação de forças mecânicas pois quando ocorre a expansão do polímero, devido ao aumento de temperatura, é possível alterar a sua superfície através de tratamentos físicos ou por deposição de um filme de outro material. Como os dois materiais apresentam coeficientes de dilatação linear diferentes, quando o polímero arrefece o filme vai enrugar devido á força compressiva exercida pelo polímero.

Wang e colaboradores [33] depositaram sobre poliestireno (PS) um filme de polidopamina (PDA) através da polimerização espontânea da dopamina. Posteriormente esta dupla camada foi sujeita a um recozimento (*annealing*) a 120° durante 10 minutos. Após o arrefecimento a superfície do PS revestido apresentava rugas com padrão desordenado e à escala micrométrica. A explicação para a formação de superfícies rugosas a partir deste método é atribuída aos diferentes coeficientes de expansão do PS e da PDA. Este último polímero apresenta um coeficiente de dilatação linear menor quando comparado com o PS.

Assim com o aumento de temperatura há a formação tensões na interface dos dois materiais e o PS experimenta forças de compressão enquanto que a PDA experimenta forças de tração, como o esquema da **Figura 1.7**. Após atingir uma temperatura superior à temperatura de transição vítrea do PS forma-se a superfície rugosa de modo a libertar as tensões entre ambos os polímeros. Mais uma vez, é dividido as diferentes propriedades das duas camadas, neste caso o coeficiente de dilatação linear que leva à formação das rugas.

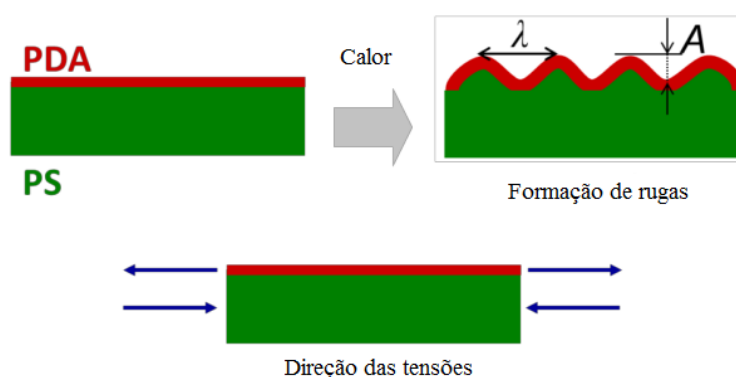


Figura 1.7 Esquema representativo do processo de formação de rugas através de tratamentos térmicos. Adaptado de [33].

1.2.1. Formação de Rugas a partir da Pulverização Catódica

A técnica de pulverização catódica (*sputtering*) magnetão por rádio frequência (r.f.) é uma das técnicas classificadas como deposição física em vapor (PVD – do inglês *Physical Vapor Deposition*). Esta técnica é realizada dentro de uma câmara com atmosfera rarefeita onde é introduzido um gás inerte, normalmente o argônio (Ar). Quando aplicado um potencial dentro da câmara os átomos de argônio ionizam dando origem ao plasma. Os iões de argônio são depois acelerados em direção ao alvo colocado sobre o cátodo e provocam a ejeção de átomos ou grupos de átomos do alvo. Estes por sua vez vão viajar até ao substrato

colocado no ânodo, denominando-se durante este percurso por adátomos, até condensarem na superfície. A sucessiva condensação de adátomos na superfície dá origem a um revestimento fino do substrato, cuja espessura depende do tempo de deposição. De forma a otimizar o processo de ejeção de material do alvo é colocado um conjunto de magnetrões na parte de trás do alvo para aumentar a quantidade de elétrons no alvo e desta forma atrair mais íons de argon. As vantagens desta técnica é que por operar em modo r.f. permite depositar materiais não condutores como por exemplo, polímeros. Outra vantagem é ainda o facto de não atingir temperaturas muito elevadas que permite a utilização de uma vasta gama de materiais como substrato, nomeadamente polímeros [34]. No caso desta classe de materiais é necessário que o polímero apresente um elevado grau de cristalinidade para que possa ser utilizado como alvo.

A pulverização catódica é assim uma das técnicas que permite depositar sobre um substrato um filme fino de outro material. Desta forma, e de acordo com o referido anteriormente, pode ser utilizada para fabricar sistemas poliméricos designados por multímacadas. Na literatura consultada, a formação de rugas como consequência da utilização da pulverização catódica não foi muito estudada sendo que os estudos relacionados com deposição de um filme e consequente modificação topográfica utilizaram outras técnicas de deposição como a evaporação (estudo do Huang e colaboradores [32]). Contudo, nesta revisão serão apresentados dois estudos que, apesar de obterem uma superfície rugosa a partir da pulverização catódica não justificam a formação das rugas como a diferença entre os coeficientes de expansão térmica. Esta razão é a mais utilizada quando se submete um sistema polimérico a variações de temperatura.

Serrano e colaboradores [35] utilizaram a pulverização catódica magnetrão em modo r.f. para depositar sobre um substrato de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) um filme fino de óxido de silício. A deposição foi realizada com o substrato em movimento a uma velocidade de 15-30 rpm (rotações por minutos), a potência aplicada foi de 200 W e foram estudadas duas pressões de argon, 0,3 e 0,7 Pa com taxas de deposição de 1,2 e 0,7 nm.min⁻¹ respetivamente.

O que este grupo de investigadores observou foi que para uma espessura do filme até 10 nm, quando este se torna contínuo, o parâmetro de rugosidade (rms) aumentava, contudo para espessuras acima desse valor a rugosidade era constante. Ou seja, as rugas não se formaram no fim da deposição, mas sim no início, razão pela qual não apontarem a

diferença de coeficientes térmicos como justificção para a formaço de rugas. O grupo observou que a espessura do substrato tem influência nas dimensões da rugosidade, pois para uma espessura menor o valor de rms é muito mais baixo do que o medido quando as espessuras apresentam valores maiores.

Caster e colaboradores [36] com o intuito de perceber qual a verdadeira razão da formaço de superfícies rugosas aquando da deposição de um filme utilizaram a deposição catódica magnetão modo r.f. para depositar um filme de óxido de índio dopado com estanho (ITO) sobre um substrato de PDMS. Os parâmetros de deposição utilizados foram: deposição durante 8 minutos, potência de 30 W, pressão de $2,7 \times 10^{-6}$ Pa taxa de deposição de 5 nm.min⁻¹ e temperatura ambiente. Estas condições deram origem a um filme de 40 nm de espessura com uma topografia ondulada. A partir da visualização em tempo real do processo de deposição os investigadores observaram que a formaço da superfície rugosa acontecia 5 a 10 segundo depois do início do processo. Neste intervalo de tempo a espessura do material depositado era de 0,4 a 0,8 nm pelo que o filme ainda não tinha coalescido o que levou o grupo a concluir que o filme não era interveniente no processo de formaço de rugas.

Os investigadores registaram que a temperatura, inicialmente à temperatura ambiente, subiu ligeiramente e não o contrário, pelo que não atribuíram a formaço de rugas a uma diferença de expansão térmica entre o filme e o substrato, mas sim a alguma modificação química que ocorreu no substrato durante os primeiros segundos do processo de deposição. Para confirmar a hipótese de que as rugas se formam nos momentos iniciais da deposição catódica o filme de ITO foi removido e verificou-se que a topografia rugosa se manteve. O grupo testou ainda várias espessuras de filme para verificar se influenciavam o comprimento de onda inicial das rugas e concluíram que filmes com várias espessuras apresentavam um comprimento de onda igual ao comprimento de onda inicial.

Assim, este grupo propôs que, nos instantes iniciais da deposição, o PDMS sofre uma modificação química na sua superfície onde se forma uma camada de sílica, já mencionada nesta revisão. Esta por sua vez fica sujeita a uma força de compressão que para ser minimizada leva a superfície a formar rugas. O restante material depositado na superfície apenas aumenta a espessura do filme, mas não altera a topografia inicialmente formada.

Uma vez que a presente dissertação tem como objetivo a deposição, sobre um substrato de PDMS, de filmes finos de carbono e poliamida 6,6 queremos investigar como

ocorre a formação das superfícies rugosas uma vez que as justificações apresentadas na literatura não são consensuais.

Wrinkled Surfaces: serão as rugas a melhor superfície?

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Pulverização Catódica

Os filmes finos foram depositados através da técnica de deposição catódica com recurso ao equipamento Edwards Coating System E306A. Este equipamento opera em modo rádio frequência de 13,56 MHz e é constituído por dois cátodos, o que permite a deposição simultânea a partir de dois alvos.

Neste trabalho foram depositados filmes finos de carbono e filmes finos de poliamida 6,6 (PA 6,6). A deposição de carbono foi realizada a partir de um alvo de grafite (Testbourne Ltd., UK- 99,99% de pureza) com 100 mm de diâmetro e 5 mm de espessura e o gás de descarga utilizado foi o árgon (Ar) com pureza de 99,999%. A deposição de poliamida 6,6 foi efetuada a partir de um alvo de poliamida 6,6 (Goodfellow – 99,99% de pureza), com 100 mm de diâmetro e 5 mm de espessura e o gás de descarga utilizado foi o azoto (N₂) com 99,999 % de pureza. Os substratos utilizados foram o silicone, o poli(dimetil siloxano) (PDMS), o silício e lamelas de vidro. A utilização de diferentes materiais foi devida às exigências associadas a alguns tipos de caracterização, bem como com o objetivo de obter a mesma química superficial após a deposição do filme fino, mas com diferentes tipos de topografia.

Antes de serem colocados na câmara de deposição, todos os substratos foram limpos com detergente e posteriormente imersos em álcool e sujeitos a uma limpeza em banho de ultrassons durante 10 minutos. Em seguida foram secos com recurso a um jato de ar quente e afixados no porta-substratos, no caso do silício e das lamelas vidro com cola de prata e no caso dos polímeros com clips nas extremidades. Após a colocação do porta-substratos na câmara de deposição esta foi evacuada até uma pressão de 10⁻³ Pa. Antes de se iniciar a deposição dos filmes finos a superfície dos substratos foi sujeita a uma limpeza por plasma durante 10 minutos a uma pressão 0,7 Pa. Na **Tabela 2.1** estão sumariados os parâmetros utilizados para a limpeza dos substratos e para a deposição dos filmes de carbono e de poliamida 6,6.

Com o objetivo de perceber a verdadeira origem da formação das superfícies rugosas alguns substratos foram apenas sujeitos ao processo de limpeza por plasma sem se efetuar nenhuma deposição sobre o substrato.

Tabela 2.1 Designação e parâmetros de deposição utilizados no processo de limpeza e deposição.

Filme Depositado	Designação	Parâmetros Fixos	Tempo de Deposição (s)	Potência (W)	
				Limpeza	Deposição
Carbono	W1	Pressão: 0,7 Pa	1800	200	200
	W2		1800	250	200
	W3		900	150	200
	W4	T. Inicial: 21±1°C	1800	150	200
	W5		1800	150	150
	W6		1800	150	100
	W7		1800	200	100
Poliamida 6,6	N1	Taxa de Arrefecimento = 1°C.min ⁻¹ (em vácuo)	3600	150	60
	N2		3600	200	60
	N3		3600	250	60

2.2. Análise Morfológica/Topográfica

2.2.1. Microscopia de Focagem Infinita

A microscopia de focagem infinita (IFM - do inglês *Infinite Focus Microscopy*) permite avaliar a topografia de uma superfície a uma escala macrométrica/ micrométrica. A técnica combina a baixa profundidade de campo de um microscópio ótico com um varrimento da superfície da amostra através de um laser. Para além de permitir obter imagens topográficas de elevada resolução e profundidade de campo num grande campo de visão permite avaliar quantitativamente as características da superfície nomeadamente os parâmetros de rugosidade [37].

O microscópio utilizado foi o Infinite Focus da marca Alicona que permitiu obter não só os parâmetros de rugosidade das superfícies, como também o perfil das rugas, o que

possibilitou a medição do comprimento de onda (λ) e da amplitude (A) em zonas distintas da superfície.

2.2.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM – do inglês *Scanning Electron Microscopy*) permite avaliar a morfologia da superfície de um material com grande resolução. Esta técnica utiliza um feixe de eletrões colimado que, ao interagir com a superfície do material num determinado volume vai provocar vários fenómenos nomeadamente transmissão e emissão de eletrões. O SEM utiliza os eletrões secundários e os eletrões retro difundidos que são emitidos da superfície do material. Os eletrões secundários provêm da camada mais superficial do material com uma espessura entre 10 a 30 nm e que, após deteção, permitem observar a morfologia da superfície. Os eletrões retro difundidos provêm de uma camada mais interna do material e permitem observar a distribuição heterogénea da composição química do material que é traduzida na imagem por diferentes tonalidades de cinzento.

Neste trabalho foram utilizados 3 equipamentos no qual um deles utiliza filamento de tungsténio para gerar o feixe de eletrões, da marca Philips e modelo XL30. Os restantes utilizam um canhão de emissão de campo (FEG – do inglês *Field Emission Gun*) e são da marca FEI Quanta, modelo 400FEG ESEM e da marca ZEISS Merlin, modelo GeminiSEM, respetivamente.

Uma vez que as superfícies não são eletricamente condutoras foi necessário o seu revestimento com um filme fino de ouro.

2.2.3. Microscopia de Força Atómica

A microscopia de força atómica (AFM – do inglês *Atomic Force Microscopy*) é uma técnica que permite avaliar a topografia de uma superfície. As imagens da topografia da superfície são obtidas através das deflexões de um braço em balanço (*cantelivier*) cuja extremidade apresenta uma ponta que interage com a superfície em estudo. As deflexões do braço em balanço são detetadas a partir de um laser que é refletido na parte superior do braço e cuja reflexão é detetada por um fotodíodo. A variação no ângulo de reflexão do laser permite obter a informação topográfica da superfície do material.

A interação da ponta com a superfície pode ocorrer em três modos: em modo contacto, em modo não contacto ou em modo de contacto intermitente (*tapping*). No modo de contacto, a ponta está em contacto permanente com a superfície e as variações da superfície são medidas através de um sinal de feedback para manter a posição do braço em balanço constante. No modo de contacto intermitente o braço em balanço vibra com uma frequência próxima da sua frequência de ressonância e as variações da topografia da superfície são traduzidas por variações na amplitude e fase que caracterizam frequência com o que braço vibra. No modo não contacto, o braço em balanço oscila, mas não toca na superfície do material pelo que as variações na topografia da superfície são detetadas através das interações interatómicas entre a ponta e a superfície [38].

Neste trabalho foi utilizado um equipamento diInnova, da marca Veeco, em modo de contacto intermitente, com uma ponta de silício (Bruker) com uma frequência de ressonância (f_0) de 150 kHz e uma constante de mola (k) de 10N m^{-1} . O tratamento das imagens foi realizado através do programa *Gwyddion*.

2.3. Análise Estrutural

A difração de raios X (XRD – do inglês *X-ray diffraction*) é uma técnica que permite avaliar a ordem estrutural de um material. Num material com ordem estrutural, ou seja, com cristalinidade os átomos estão organizados segundo planos bem definidos e com distâncias bem definidas entre eles. Assim, quando se faz interagir um feixe de raios X com a superfície de um material cristalino e este apresenta um determinado comprimento de onda pode ocorrer difração se se verificar a lei de Bragg (**Equação (2.1)**)

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda \quad (2.1)$$

onde d é a distância interplanar, θ é o ângulo de incidência do feixe de raios X, n é um número inteiro e λ o comprimento da radiação. Esta difração é traduzida pelo aparecimento de um pico no difractograma, característico do plano em que ocorreu a difração.

Neste estudo foi utilizado o equipamento X'Pert, da Panalytical, com alvo de Cobre ($K\alpha = 0,15418$ nm), com uma tensão de 45 kV, uma corrente de 40 mA, uma gama de varrimento de 10 a 60°, com um passo de 0.03° e um tempo de 1 s/passos.

2.4. Análise Química

2.4.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR – do inglês *Fourier Transform Infrared Microscopy*) permite identificar os grupos funcionais presentes num material através da sua interação com um feixe de comprimento de onda do infravermelho. Quando a energia da radiação incidente apresenta uma frequência igual à frequência de vibração de uma determinada ligação covalente presente no material, esta começa a vibrar. Esta vibração dá origem ao aparecimento de um pico no espectro com uma intensidade e número de onda característico que, por comparação com valores tabelados, permite identificar a ligação química presente. A mesma ligação pode aparecer representada no espectro várias vezes uma vez que a mesma ligação covalente pode apresentar vários modos de vibração dependendo da energia absorvida.

O equipamento utilizado foi o Espectrómetro Frontier (FT-NIR/MIR) da Perkin Elmer, equipado com um detector FR-DTGS e um divisor de feixe de KBr. O registo dos espectros foi efetuado com resolução 4.0 cm^{-1} com 16 acumulações e recorrendo à técnica de amostragem não destrutiva de refletância total atenuada (ATR - do inglês - *Attenuated Total Reflectance*).

2.4.2. Espectroscopia de Fotoeletrão X

A espectroscopia de fotoeletrão X (XPS – do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) permite não só saber a composição química de um material como a concentração relativa que cada elemento químico, bem como o estado de valência dos elementos. Esta técnica utiliza um feixe de raio X que interage com a superfície do material até uma profundidade de 10 nm e baseia-se no efeito fotoelétrico. Os átomos presentes na

superfície do material têm uma energia de ligação conceptualmente igual á energia de ionização dos eletrões, pelo que, quando os raios X atingem a superfície do material, a energia do fotão é absorvida pelos eletrões de cada átomo. Se a energia do fotão for suficiente o eletrão é ejetado do material com uma determinada energia cinética. A partir da energia cinética do fotoeletrão (E_K) emitido é possível determinar a energia de ligação do átomo através da **Equação (2.2)**

$$E_b = h\nu - (E_K + W_s) \quad (2.2)$$

onde E_b é a energia de ligação da orbital atómica de onde foi emitido o fotoeletrão, $h\nu$ é a energia do fotão e W_s é uma função de trabalho que depende do equipamento utilizado e do material.

Em primeiro lugar foi efetuado um espectro geral onde é realizado um varrimento de todas as energias de ligação dos átomos que estão a emitir os fotoeletrões. De seguida foi efetuado um espectro de alta resolução (*High Resolution Spectra*) num pico de interesse que, após tratamento de desconvolução, permitiu saber o tipo de ligações em que um elemento em específico participa.

O equipamento utilizado foi Kratos Axis Ultra HSA equipado com uma fonte de raio X monocromática Al ($\lambda = 0,83401$ nm) com uma energia de 15 kV. A análise dos dados foi realizada através do programa CasaXPS.

2.4.3. Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é um tipo de espectroscopia vibracional e permite identificar as ligações presentes num material. Esta técnica baseia-se na irradiação de uma amostra com um feixe que, ao apresentar um comprimento de onda adequado excita os eletrões para níveis de energia virtuais, presentes entre as camadas eletrónicas. Quando ocorre emissão de energia no decaimento e esta é menor ou maior do que aquela que promoveu a absorção inicial está-se perante uma difusão (*scattering*) de Raman. Esta técnica é especialmente útil para distinguir os vários tipos de materiais à base de carbono e detetar se existem defeitos estruturais através da variação das bandas presentes no espectro.

O equipamento utilizado foi um Micro-Raman da Marca Horiba, Modelo HR 800. Foi utilizado um laser $\lambda=532$ nm, uma lente de 100, à qual corresponde um diâmetro de interação com a superfície de 1 a 2 micrómetros.

2.5. Molhabilidade

A molhabilidade é definida como a capacidade que um líquido apresenta para molhar uma superfície sólida e é usualmente traduzida pelo ângulo de contacto estático (θ) formado entre a tangente no ponto em que o líquido intersesta o sólido e a superfície do sólido (**Figura 2.1**). Por sua vez, o valor deste depende das forças coesivas existentes entre o líquido e as forças adesivas existentes entre o líquido e o sólido.

O valor do ângulo de contacto pode ser calculado considerando que quando uma gota de líquido é colocada na superfície de um sólido forma-se um equilíbrio termodinâmico entre as 3 interfaces do sistema: sólido, líquido e vapor. O equilíbrio deste sistema é traduzido pela equação de Young **Equação (2.3)**:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (2.3)$$

onde γ_{LV} é tensão superficial na interface líquido – vapor, θ é o ângulo de contacto de Young, γ_{SV} é a tensão superficial na interface sólido – vapor e γ_{SL} é a tensão superficial na interface sólido-líquido. Quando $0^\circ \leq \theta < 65^\circ$ a superfície é definida como hidrófila, ou seja, apresenta uma boa molhabilidade. Para $65^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$ a superfície é hidrófoba, ou seja, não apresenta uma boa molhabilidade, sendo designada por superhidrófoba para ângulos superiores a 150° .

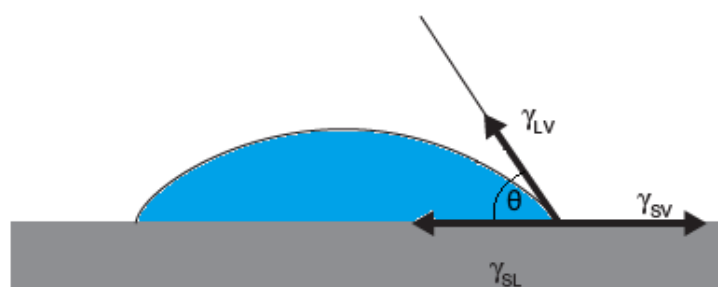


Figura 2.1 Esquema representativo da medição do ângulo de contacto e as tensões interfaciais existentes. Adaptado de [39].

Apesar da equação de Young ser uma ferramenta útil para o cálculo do ângulo de contacto, esta apenas pode ser aplicada quando se está perante um líquido colocado sobre uma superfície não rugosa. Quando a superfície apresenta rugosidade o ângulo de contacto medido vai ser diferente, uma vez que este depende não só da química da superfície, mas também das características topográficas. No sentido de resolver este problema, Wenzel e Cassie-Baxter propuseram dois modelos que permitem calcular o ângulo de contacto efetivo da superfície o que permite inferir sobre a verdadeira molhabilidade da superfície [39].

O modelo de Wenzel considera que quando um líquido entra em contacto com uma superfície rugosa penetra nas cavidades existentes e acompanha a rugosidade (**Figura 2.2a**). O ângulo de contacto que se obteria se a superfície fosse isenta de rugosidade pode ser calculado através da equação de Wenzel (**Equação (2.4)**)

$$\cos \theta' = r \cos \theta_e \quad (2.4)$$

onde θ' é o ângulo na superfície isenta de rugosidade, r é o fator de rugosidade definido como a razão entre a área de superfície atual e a área de superfície projetada e θ_e é o ângulo de contacto medido experimentalmente.

No modelo Cassie Baxter o líquido não impregna a rugosidade do sólido, deixando uma camada de vapor aprisionada (**Figura 2.2b**). Neste caso o líquido apenas interage com o topo dos elementos que conferem a rugosidade à superfície. Para calcular o ângulo de contacto que se obteria se a superfície fosse lisa aplica-se a equação de Cassie Baxter (**Equação (2.5)**)

$$\cos \theta' = f \cos \theta_e - (1 - f) \quad (2.5)$$

onde f é a fração da superfície com a qual o líquido entra em contacto.

A medição dos ângulos de contacto estáticos foi realizada através da colocação de uma gota de 10 μL de água destilada ou formamida nas superfícies. A posterior determinação do valor do ângulo de contacto foi feita através do equipamento DataPhysics QCA-20. Em cada superfície foram efetuadas um mínimo de 5 medições e os resultados apresentados sob a forma de valor médio.

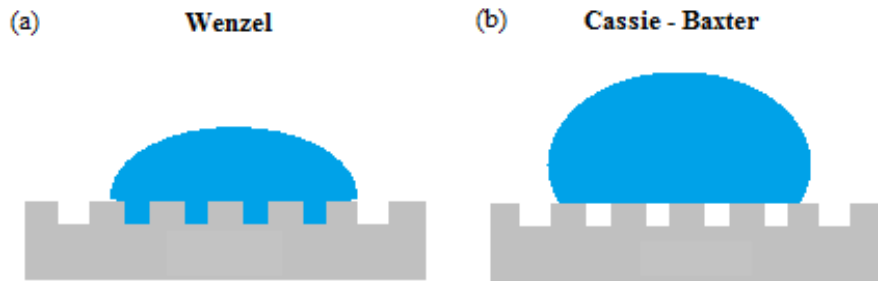


Figura 2.2 Esquema representativo dos modelos de Wenzel (a) e Cassie-Baxter (b).

2.6. Potencial de Corrente

Quando um material é imerso numa solução eletrolítica (fluidos biológicos p.e.) desenvolve carga na superfície. Esta é rapidamente neutralizada pelos iões de carga contrária existentes na solução, os contra-iões, que dão origem a uma dupla camada elétrica, representada na **Figura 2.3**.

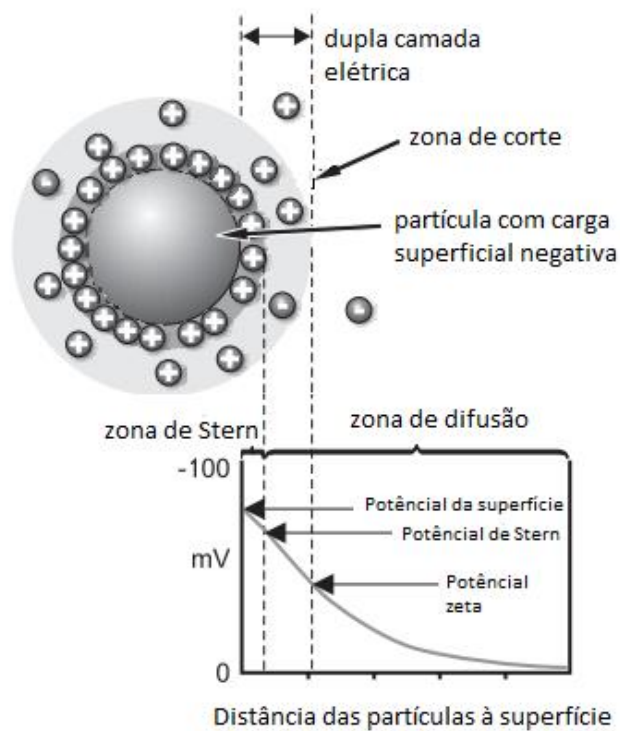


Figura 2.3 Representação esquemática do modelo da dupla camada elétrica. Adaptado de [40].

Nesta camada os iões encontram-se fortemente ligados à superfície através de ligações inter-atômicas, contudo à medida que a distância para a superfície aumenta, a ligação dos contra-íões não é tão forte formando-se uma zona de difusão. Quando se faz passar o eletrólito com uma determinada pressão forma-se uma zona de corte muito próxima da superfície, onde ocorre a quebra de algumas ligações dos contra-íões com a superfície. O potencial medido nessa zona é designado por potencial zeta (ζ) e é o valor que permite inferir de forma indireta sobre o valor do potencial da superfície [40]. O valor medido não corresponde ao verdadeiro potencial da superfície porque apesar de na zona de corte se quebrar a ligação dos contra-íões com a superfície alguns permanecem ligados e vão influenciar o valor do potencial.

O equipamento utilizado para medir o potencial zeta das superfícies foi o SurPASS, da Anton Paar GmbH em que foi utilizada como célula de medição a célula de aperto (*clamping cell*). O eletrólito utilizado foi uma solução de KCl 1 mM com pH 7. Para cada superfície foram realizadas 5 medições e os resultados apresentados sob a forma de valor médio.

2.7. Testes *in vitro*

2.7.1. Células Procariotas

Neste estudo foram utilizadas 4 estirpes bacterianas, duas Gram-negativas, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), e duas Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Os testes *in vitro* foram realizados em meio sólido e em meio líquido.

Todas as superfícies foram esterilizadas em caixas de multipoços estéreis por imersão em 2-3 mL de solução aquosa de etanol 70% (v/v) durante 10 minutos. Este processo foi repetido duas vezes e no final a solução foi retirada de cada poço e as amostras deixadas a secar à temperatura ambiente dentro da câmara de fluxo.

Antes da incubação das superfícies foram preparadas suspensões com as espécies bacterianas referidas anteriormente. As suspensões foram preparadas a partir de outras mais concentradas. Com o objetivo de preparar suspensões de 30 mL com densidade ótica de 0,1 foram preparadas as seguintes diluições:

P. aeruginosa: 8 mL de suspensão concentrada + 22 mL de meio de cultura LB (Luria Bertani);

E. coli: 6,6 mL de suspensão concentrada + 23,4 mL de meio de cultura LB;

S. aureus: 6,8 mL de suspensão concentrada + 23,2 mL de meio de cultura LB;

B. subtilis: 5,4 mL de suspensão concentrada + 24,6 mL de meio de cultura LB.

a) Meio sólido

A realização de testes *in vitro* em meio sólido têm como principal objetivo observar se o material em estudo apresenta atividade antimicrobiana, que é traduzida pela formação de um halo de inibição. Quanto maior for o diâmetro do halo de inibição maior é atividade antimicrobiana do material.

Para a preparação do meio sólido foi adicionada a cada placa de Petri meio LB previamente misturado com agar até cobrir o fundo da placa e foram coladas à temperatura ambiente, dentro da câmara de fluxo, até solidificar. Posteriormente foi colocado 1 mL de suspensão bacteriana no centro da placa e espalhado com um espalhador de vidro. As superfícies foram depois colocadas sobre a suspensão bacteriana onde a parte com o revestimento foi colocada em contacto com a suspensão. As placas de Petri foram colocadas na estufa a uma temperatura constante de 30°C durante aproximadamente 65 horas.

b) Meio líquido

Os testes *in vitro* em meio líquido foram realizados em placas de multipoços onde as superfícies em estudo foram inicialmente esterilizadas. A cada superfície, colocada no fundo poço com a superfície revestida virada para cima, foi adicionado 2 mL da respetiva suspensão bacteriana. As placas foram posteriormente seladas e colocadas na estufa a uma temperatura constante de 30°C durante aproximadamente 65 horas.

c) Observação microscópica

De forma a ser possível visualizar as bactérias em microscopia ótica e SEM procedeu-se à limpeza, fixação química e desidratação das superfícies que estiverem em meio líquido e em meio sólido. O meio de cultura das superfícies colocadas meio líquido foi retirado através de um sistema de aspiração enquanto que as superfícies em meio sólido foram colocadas em placas multipoços. O processo de limpeza das superfícies consistiu em

colocar em cada poço 2 mL de PBS (solução salina com tampão fosfato) durante 10 minutos, sob agitação, de forma a garantir que na superfície apenas permanecia o que aderiu à superfície. A fixação química foi realizada através da colocação de 3 mL de glutaraldeído 2,5 % (v/v), durante 10 minutos, tendo sido este processo repetido duas vezes. Por fim, realizou-se a desidratação das superfícies, que tal como nas células eucariotas, consistiu em submeter as superfícies, durante 10 minutos, a soluções aquosas de etanol com concentrações cada vez mais elevadas (70%, 80%, 90%, 95% e 100% (v/v)). A última solução de etanol foi aspirada e as superfícies foram deixadas ao ar livre para que os resíduos de etanol evaporassem.

Antes da observação das superfícies em SEM e devido à natureza não condutora das células, as superfícies foram revestidas com uma fina camada de ouro.

2.7.2. Células Eucariotas

Para os testes com células eucariotas foram utilizadas células do córtex de embrião de rato com 16 dias de gestação. Estas foram cultivadas sobre as superfícies escolhidas durante 14 dias de acordo com os protocolos utilizados no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (CNC).

a) Incubação das superfícies

Numa fase inicial foram preparadas culturas primárias de neurónios corticais a partir do córtex de embriões de rato Wistar E18-E19. Para tal os córtex foram lavados em HBSS (solução salina balanceada de Hank) gelado, três vezes antes e cinco vezes depois do tratamento com tripsina (solução 0,06% (v/v) em HBSS, 15 min a 37°C). As células foram dissociadas mecanicamente com HBSS e contadas. De seguida, foram incubadas ($94,7 \times 10^3$ células/cm²) em meio “Neural Plating” (meio mínimo essencial, suplementado com 10% de soro de cavalo, 0,6% de glucose e 1 mM de ácido pirúvico), durante 2-4 h em caixas multipoços, sobre as superfícies escolhidas para testar. No fim desse período o meio foi removido e substituído por meio neurobasal, suplementado com S1 (diluído 1:50), 0,5 mM de glutamina e 0,12 mg/mL de gentamicina. A divisão das células da glia foi impedida após 2-3 dias em cultura através da adição de 10 mM de 5-FdU-NOAC (dímero

heterodinucleósido fosfatado) ao meio. As culturas foram mantidas numa incubadora humidificada numa atmosfera de 5% CO₂/95% ar, a 37°C, durante 14-15 dias.

b) Observação microscópica

De forma a poder visualizar-se a possível adesão celular às diferentes superfícies através de microscopia ótica procedeu-se à realização de uma fixação química seguida da desidratação das células.

Numa fase inicial o meio de cultura foi retirado de cada poço com recurso a um sistema de aspiração. O processo de fixação química das células foi realizado com uma solução de glutaraldeído 5% (v/v) onde foi colocado um volume de 2-3 mL em cada poço. Ao fim de 10 minutos a solução de glutaraldeído foi aspirada dos poços e iniciou-se o processo de desidratação com soluções aquosas de etanol (v/v) a 25%, 50%, 75% e 100%. As superfícies foram mantidas durante 10 minutos em cada uma das soluções. Por fim, a solução foi aspirada de todos os poços e as superfícies foram deixadas a secar ao ar livre até os resíduos de etanol evaporarem completamente.

Wrinkled Surfaces: serão as rugas a melhor superfície?

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados da investigação realizada, dividida em três partes principais. No primeiro subcapítulo são apresentados os resultados dos estudos preliminares nomeadamente de como se formam as superfícies rugosas e quais as superfícies selecionadas para a etapa seguinte. Numa segunda parte é apresentada a caracterização detalhada dessas mesmas superfícies e, por fim, são apresentados os resultados da aplicação das superfícies como suporte para cultura de células.

3.1. Estudo Preliminar

a) Processo de formação de superfícies rugosas

A principal questão que se colocou no início deste trabalho foi perceber como, e em que fase do processo da pulverização catódica ocorria a formação de rugas na superfície do substrato. Após realizar a deposição de filmes finos de carbono e poliamida 6,6 sobre PDMS e silicone com várias condições de deposição (**Tabela 2.1**), foi observado, através de microscopia ótica, que todas as superfícies apresentavam rugas. Contudo, como os substratos foram submetidos a um processo de limpeza por plasma antes da deposição dos filmes a formação de rugas podia ter ocorrido por duas vias:

- 1) as rugas eram formadas durante o processo de limpeza do substrato e o filme era depositado já sobre uma topografia rugosa;
- 2) as rugas eram formadas durante o processo de deposição do filme fino, como consequência da variação da temperatura ao longo do processo de deposição e devido à diferença entre os coeficientes de expansão térmica do substrato e do filme fino, o que impedia o substrato de voltar à dimensão inicial sem sofrer uma deformação na superfície.

Pela análise da **Figura 3.1** é possível observar que, quando o substrato (PDMS ou silicone) é sujeito ao processo de limpeza por plasma e depois retirado da câmara de pulverização sem ser depositado o filme fino (**Figura 3.1c, d**), apresenta uma topografia muito semelhante à dos substratos sem limpeza (**Figura 3.1a, b**). Em oposição, após o

processo de deposição do filme fino são visíveis rugas bem definidas na superfície do filme (Figura 3.1e, f).

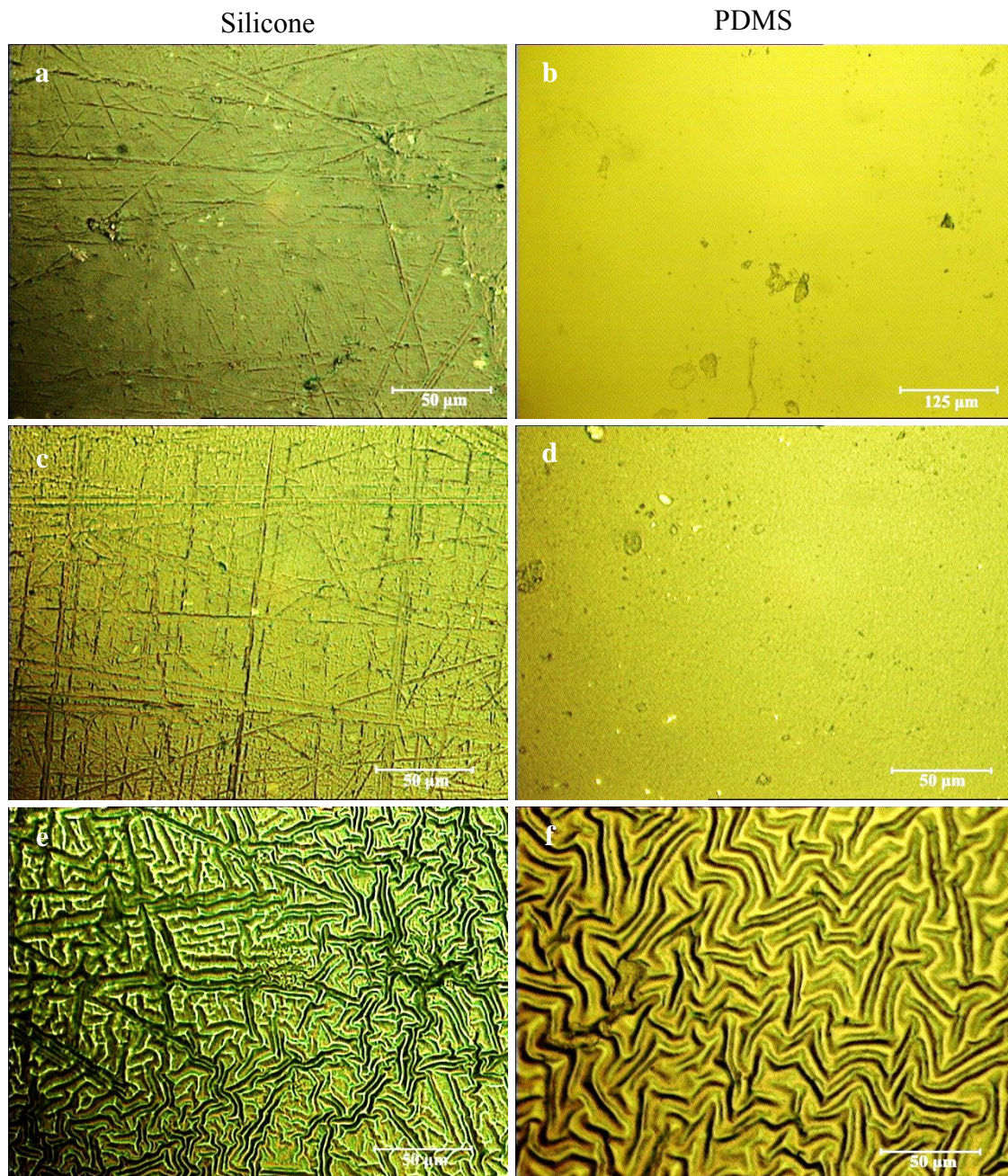


Figura 3.1 Microscopia ótica dos substratos antes da limpeza (a, b), após a limpeza (c, d) e após deposição de um filme de carbono com as condições W7 (e, f).

As superfícies sujeitas apenas ao processo de limpeza por plasma foram ainda analisadas por SEM (**Figura 3.2**) e foi possível observar que, apenas quando a potência

utilizada era muito elevada (250 W) ocorria uma ligeira modificação da topografia da superfície. Isto acontece porque durante a limpeza do substrato este é bombardeado com partículas muito energéticas que têm a capacidade de modificar partes das cadeias poliméricas da superfície originando radicais. Por sua vez, estes ligam-se com outros radicais o que leva a cadeia polimérica a ficar mais curta e quando o polímero arrefece cria uma força de compressão na superfície que a leva a enrugar [41].

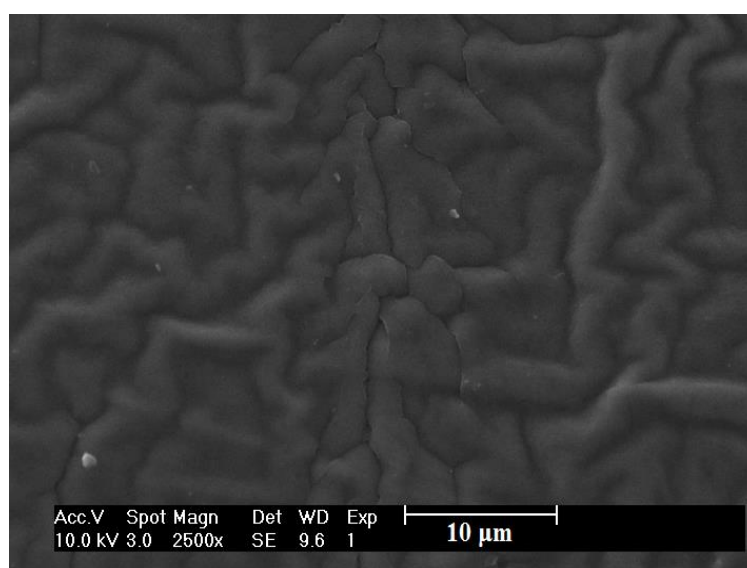


Figura 3.2 Micrografia da superfície do substrato de silicone sujeito ao processo de limpeza por plasma com uma potência de 250 W.

Apesar de haver uma ligeira alteração da topografia do polímero no final da limpeza, e que se tornou mais evidente para potências de limpeza maiores, não é esta que define a topografia no final da deposição, uma vez que as dimensões são muito menores do que as conseguidas após a deposição do filme fino. Esta pequena alteração da topografia do substrato após a limpeza é sobretudo essencial e favorável para o processo de adesão do filme fino à superfície do polímero.

Assim, é possível que a formação de rugas na superfície ocorre segundo o esquema semelhante ao representado na **Figura 3.3**. Quando se inicia a limpeza do substrato a temperatura do mesmo aumenta o que leva a que este expanda. Esta expansão é contínua à medida que o filme é depositado sobre o substrato, contudo quando a deposição termina a temperatura diminui e o substrato tende a voltar à dimensão inicial. No entanto, porque o filme fino depositado apresenta propriedades diferentes do substrato, nomeadamente o

coeficiente de dilatação linear – α (por exemplo, $\alpha_{PDMS} = 310 \times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ e $\alpha_{carbono} = 4 \times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ [42, 43]), as tensões geradas na interface substrato/filme têm como consequência a formação de uma superfície rugosa.

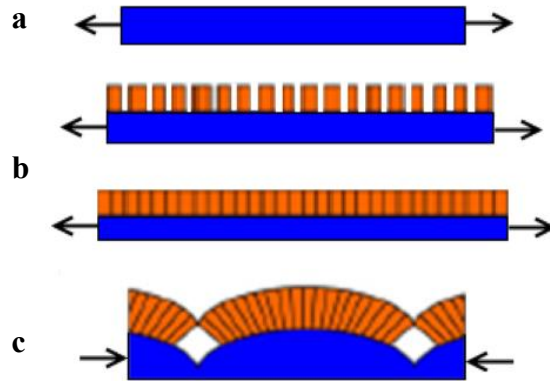


Figura 3.3 Esquema representativo do processo de formação de rugas. (a) expansão do substrato durante o processo de limpeza; (b) expansão contínua do substrato aquando da deposição do filme e (c) arrefecimento do substrato e posterior formação de rugas na superfície. Adaptado de [44].

b) Escolha do substrato polimérico

Apesar de ambos os substratos poliméricos testados permitirem a formação de superfícies rugosas, pela **Figura 3.1a** é possível observar que a superfície do silicone é demasiado heterogênea e apresenta muitas imperfeições que, após a deposição de um filme tendem a ser amplificadas. Em contrapartida, o PDMS apresenta uma superfície muito homogênea e praticamente isenta de imperfeições, que se reflete, após a deposição, em rugas mais perfeitas e distribuídas homogeneamente pela superfície (**Figura 3.1f**). Assim optou-se por utilizar como substrato polimérico apenas o PDMS, pelo que, todos os resultados apresentados daqui para a frente serão referentes ao mesmo.

c) Escolha das condições de deposição

Após a escolha do substrato, e tendo-se verificado com o silicone que todas as condições presentes na **Tabela 2.1** permitiam a formação de superfícies rugosas procedeu-se à repetição de algumas condições com o substrato de PDMS. As condições escolhidas, no caso do carbono foram a W2 e W4, com potência de deposição igual a 200 W, e a W6 e W7,

com potência de deposição igual a 100 W. No caso das condições para a deposição de poliamida 6,6 foram todas repetidas.

Apesar de todas as superfícies apresentarem a mesma morfologia, já observada na **Figura 3.1f**, foi necessário avaliar a sua topografia de forma quantitativa nomeadamente determinar o valor do comprimento de onda e a amplitude das rugas. Para tal foi realizado IFM sobre as sete superfícies onde foi possível realizar medições e determinar os parâmetros de rugosidade de cada uma. Na **Figura 3.4** é possível observar a caracterização da superfície N1 por IFM, bem como o respetivo perfil com a análise do comprimento de onda e da amplitude (**Figura 3.4 b**). Os valores dos parâmetros analisados em todas as superfícies estão resumidos na **Tabela 3.1**.

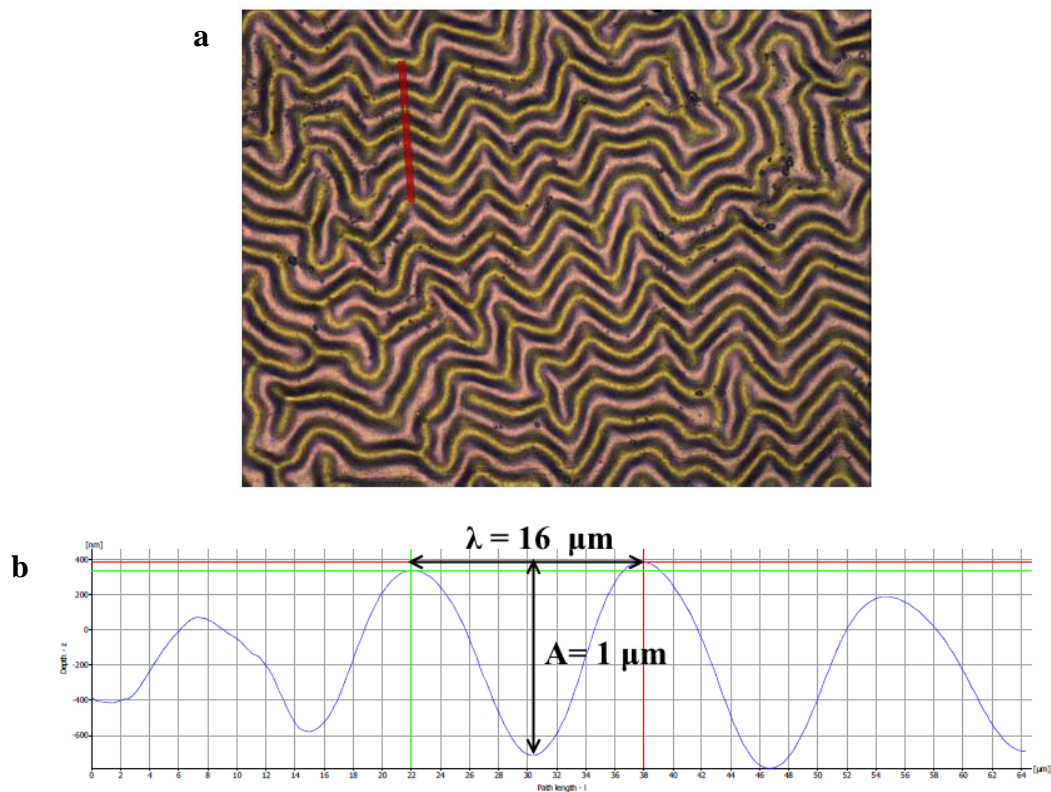


Figura 3.4 Microscopia de focagem infinita do filme N1 depositado sobre PDMS (a) e respetivo perfil da rugosidade assinalada pela linha vermelha (b).

Relativamente aos parâmetros de rugosidade, a rugosidade média linear (S_a) mede a variação média da altura em relação a um plano médio. A rugosidade quadrática média (S_q ou rms), corresponde ao desvio que ocorre na altura em relação à média. O *skewness* ($Skew$) é um parâmetro adimensional que mede a simetria do perfil em relação a

um plano médio, ou seja, compara a distribuição e altura dos picos com a distribuição e profundidade dos vales. Um perfil simétrico apresenta um valor de *skewness* igual a zero. A curtose (*Kurtosis*) é outro parâmetro adimensional e avalia a “suavidade” da superfície. Um valor de curtose igual a 3 define o limite em que a superfície é considerada achatada (<3) ou aguçada (*sharp*) (>3), apresentando respectivamente uma distribuição platicúrtica ou leptocúrtica [45].

Tabela 3.1 Comprimento de onda, amplitude e parâmetros de rugosidade dos filmes depositados sobre PDMS.

Superfície	λ (μm)	A (μm)	Parâmetros de rugosidade			
			Sa (nm)	Sq (nm)	Skew	Curtose
W2	17,6 \pm 2,1	1,0 \pm 0,2	739	1049	-	-
W4	13,0 \pm 1,0	0,7 \pm 0,2	557	708	0,20	3,47
W6	10,7 \pm 2,6	0,4 \pm 0,1	261	341	0,06	3,92
W7	10,4 \pm 3,2	0,5 \pm 0,3	208	264	0,03	3,25
N1	15,9 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	754	963	-0,25	3,10
N2	29,5 \pm 10,4	2,7 \pm 0,8	353	440	0,03	2,92
N3	28,6 \pm 1,6	3,1 \pm 0,5	1006	1201	-	-

A partir do comprimento de onda e da amplitude das rugas é possível observar que existe uma proporcionalidade entre o seu valor e a potência utilizada durante a limpeza e a deposição do filme. Esta relação pode ser justificada pelo crescente aquecimento que ocorre no substrato como consequência do seu bombardeamento por partículas que são mais energéticas e em maior número à medida que a potência aplicada aumenta. O aumento da temperatura do substrato faz com que ele expanda mais o que leva a que quando a temperatura diminui ele forme rugas com comprimento de onda maior.

As potências aplicadas durante o processo também mostram ter influência nos parâmetros de rugosidade, nomeadamente na rugosidade média (Sa) e na rugosidade quadrática média (Sq). A justificação para estes valores também está relacionada com a maior expansão do substrato devido ao aumento das potências aplicadas. Relativamente à simetria das alturas dos vales e picos, observa-se que a superfície W4 apresenta maior área de picos do que a registada nos vales enquanto a superfície N1, por apresentar um valor de

Skewness negativo, apresenta uma maior área de vales do que de picos. Apenas no caso das superfícies W6, W7 e N2 se pode afirmar que existe simetria entre os vales e os picos uma vez que o valor de *Skewness* é aproximadamente zero. Todas as superfícies, à exceção da N2, apresentam um valor de curtose superior a 3, o que indica que estas apresentam uma distribuição mais “aguçada” o que significa que é relativamente fácil obter valores que não se aproximam da média, ao contrário da superfície N2 que é mais suave.

Através desta caracterização topográfica foram selecionadas duas superfícies de carbono W4, W6 e uma superfície de poliamida 6,6, a N1. As superfícies com filmes finos de carbono foram escolhidas por representarem filmes finos obtidos com potências de deposição diferentes, que por sua vez resultaram em comprimentos de onda também diferentes. Para além disso apresentavam um desvio padrão no comprimento de onda e na amplitude mais pequeno, comparativamente com as superfícies W2 e W7. A escolha do N1 também se baseou no facto de o desvio padrão do comprimento de onda e da amplitude ser menor do que na superfície N2 e N3. Também foi tido em consideração o facto de o comprimento de onda ser semelhante ao das superfícies com filmes finos de carbono, o que nos permite inferir, no trabalho a desenvolver, a influência da composição química para superfícies topograficamente idênticas. Acresce o facto de ser a única superfície com um filme fino de poliamida 6,6 que não apresenta um valor de curtose inferior a 3. Por estes motivos os resultados apresentados daqui em diante serão referentes aos filmes W4, W6 e N1 depositados sobre PDMS e sobre silício.

3.2. Caracterização Morfológica/ Topográfica

A morfologia superficial e transversal dos filmes finos depositados sobre o PDMS e sobre silício foi avaliada por SEM. Esta técnica permitiu observar, como evidenciado na **Figura 3.5**, que os filmes depositados sobre PDMS apresentam uma dupla escala de rugosidade. Isto é, a sua superfície apresenta uma microrrugosidade, já observada por microscopia ótica e caracterizada por IFM, mas também uma nanorrugosidade incorporada nas rugas maiores.

Relativamente à seção transversal dos filmes finos depositados sobre PDMS, e em particular dos filmes W4 e N1, é possível observar que estes apresentam uma morfologia característica de um crescimento do filme colunar. Este tipo de crescimento ocorre porque

quando os adátomos chegam à superfície do substrato não têm mobilidade suficiente e condensam no local de embate dando origem a “ilhéus”. Estes, por sua vez, vão crescendo e coalescem à medida que ocorre a deposição de material o que dá origem a uma estrutura

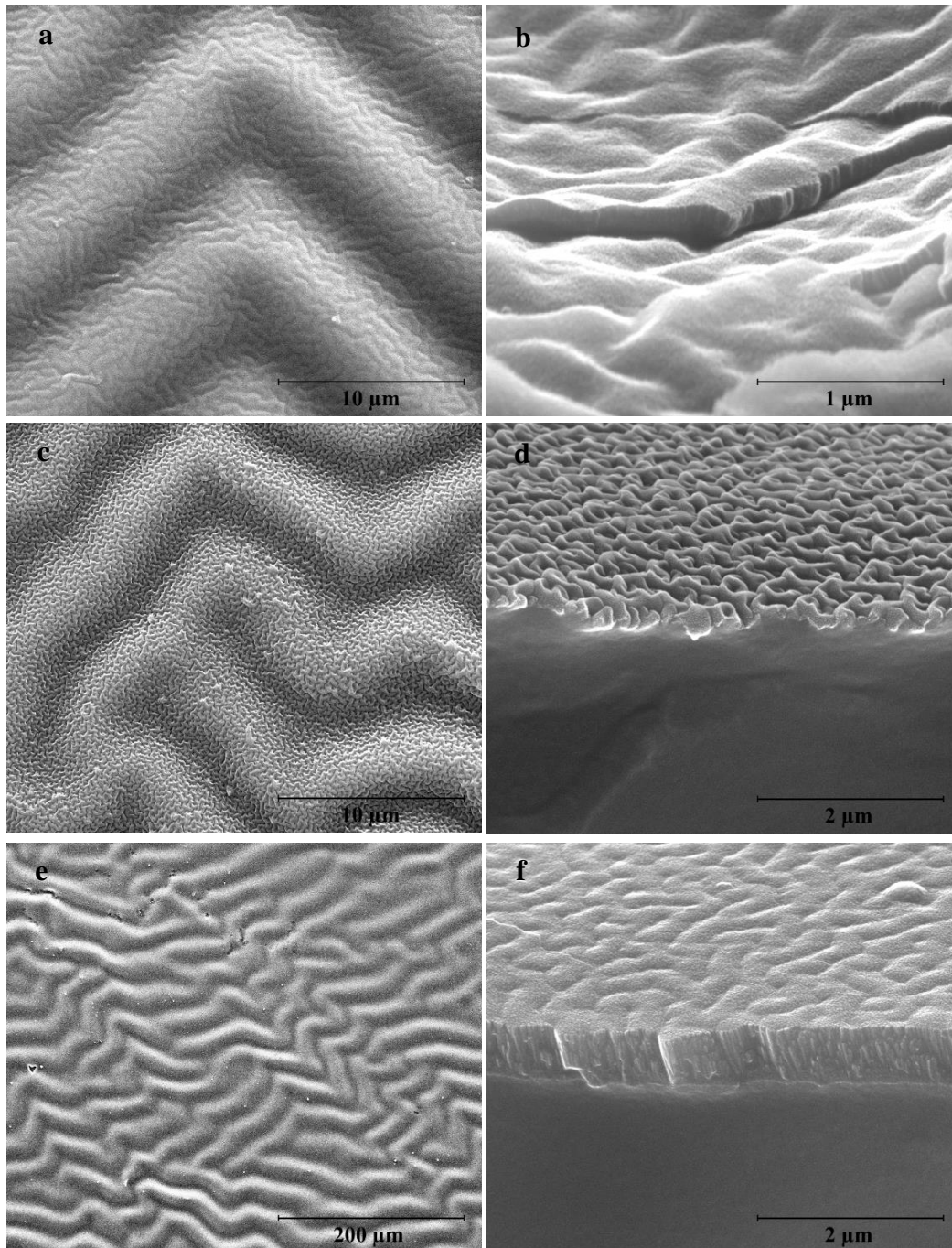


Figura 3.5 Micrografias da superfície e da seção transversal do filme W4 (a, b), do filme W6 (c, d) e do filme N1 (e, f) depositados sobre PDMS.

colunar [34]. Este crescimento colunar origina uma superfície rugosa diferente da obtida quando o crescimento acontece por camadas, assim, esta pode ser a justificção para a

nanotopografia observada nos filmes depositados sobre PDMS. No caso do filme W6 não foi possível inferir sobre a morfologia da seção transversal uma vez que a espessura do mesmo é demasiado pequena.

A morfologia da superfície dos filmes depositados sobre silício também foi analisada por SEM. Na **Figura 3.6** está representada apenas a micrografia do filme N1 que é representativa dos restantes filmes que se encontram no Apêndice A.

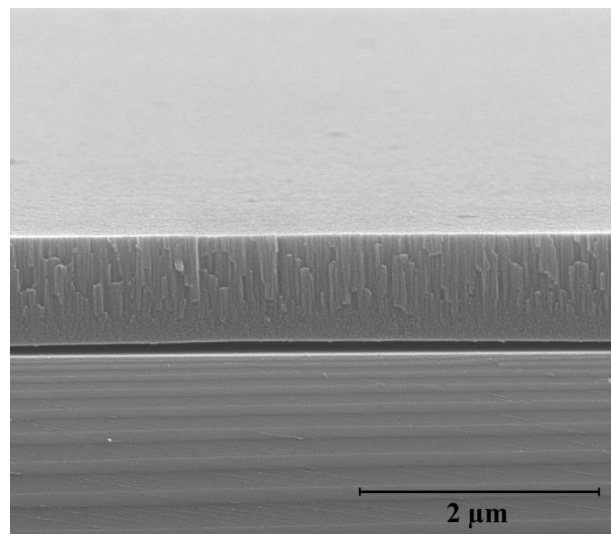


Figura 3.6 Micrografia da seção transversal do filme N1 depositado sobre silício.

Pela micrografia é possível observar que a superfície do filme é homogênea e não apresenta uma rugosidade significativa, comparativamente com os filmes depositados sobre PDMS. A seção transversal é semelhante aquela já observada nos filmes depositados sobre polímero em que o crescimento é colunar. Através da seção transversal dos filmes foi possível medir o valor da espessura de cada filme, que se encontram representados na **Tabela 3.2**. Os valores das espessuras estão relacionados com os parâmetros de deposição utilizados. No caso do filme N1, este apresenta a espessura maior uma vez que o tempo de deposição foi de 1 hora. Por outro lado, os filmes W4 e W6, apesar de terem sido depositados durante 30 minutos apresentam uma diferença significativa de espessura entre eles. Esta diferença está relacionada com a potência de deposição utilizada que, no caso do W4, foi maior (200 W). Uma potência de deposição maior leva a que a taxa de ejeção de material do alvo e consequentemente a taxa de deposição sejam também maiores o que se traduz numa espessura maior do filme.

Tabela 3.2 Espessura dos filmes W4, W6 e N1.

Superfície	W4	W6	N1
Espessura (nm)	110	20	900

A topografia dos filmes depositados sobre PDMS foi analisada por AFM onde se confirmou a existência da nanorrugosidade observada anteriormente por SEM. Na **Figura 3.7** estão representadas as imagens topográfica e de amplitude do filme N1, representativa dos restantes filmes depositados sobre PDMS.

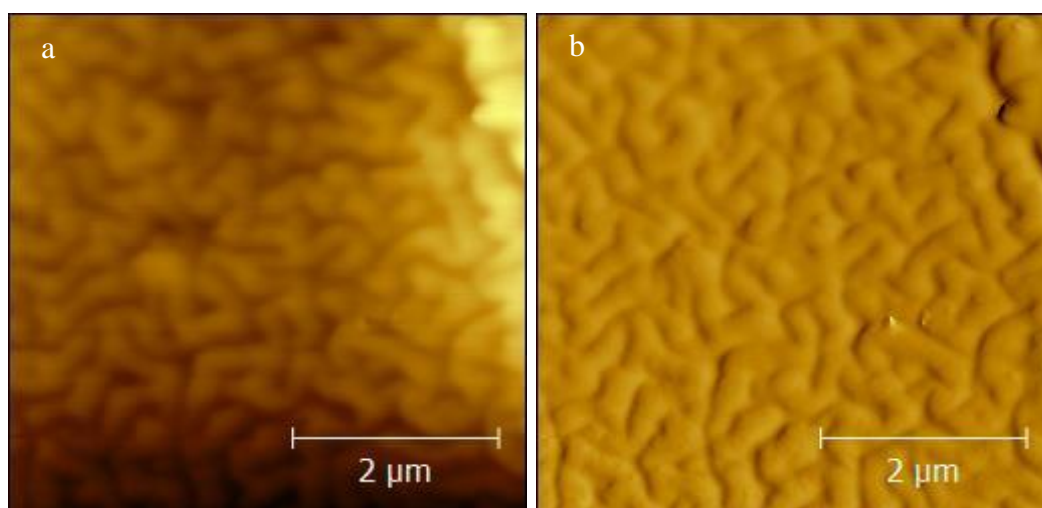


Figura 3.7 Imagem topográfica (a) e de amplitude (b) do filme N1 depositado sobre PDMS.

Os filmes depositados sobre silício e cujas superfícies analisadas por SEM aparentavam não apresentar rugosidade, foram também analisados por AFM e as imagens da topografia e da amplitude dos filmes W4 e W6 estão representadas na **Figura 3.8**.

Pela análise da figura é possível observar que os filmes depositados sobre silício apresentam uma nanorrugosidade associada que surgiu como consequência do processo de deposição do filme. No caso do filme W4 (**Figura 3.8 a, b**), como foi depositado com uma potência mais elevada, comparativamente com o filme W6 (**Figura 3.8 c, d**), deu origem a uma maior densidade de nucleação, ou seja, formaram-se mais “ilhéus” na superfície do substrato. Esta maior densidade de nucleação fez aumentar o designado efeito sombra, em que algumas partes do substrato só começam a ser revestidos posteriormente. Deste modo a fase de coalescência é diferenciada no tempo dando origem a uma topografia com relevo

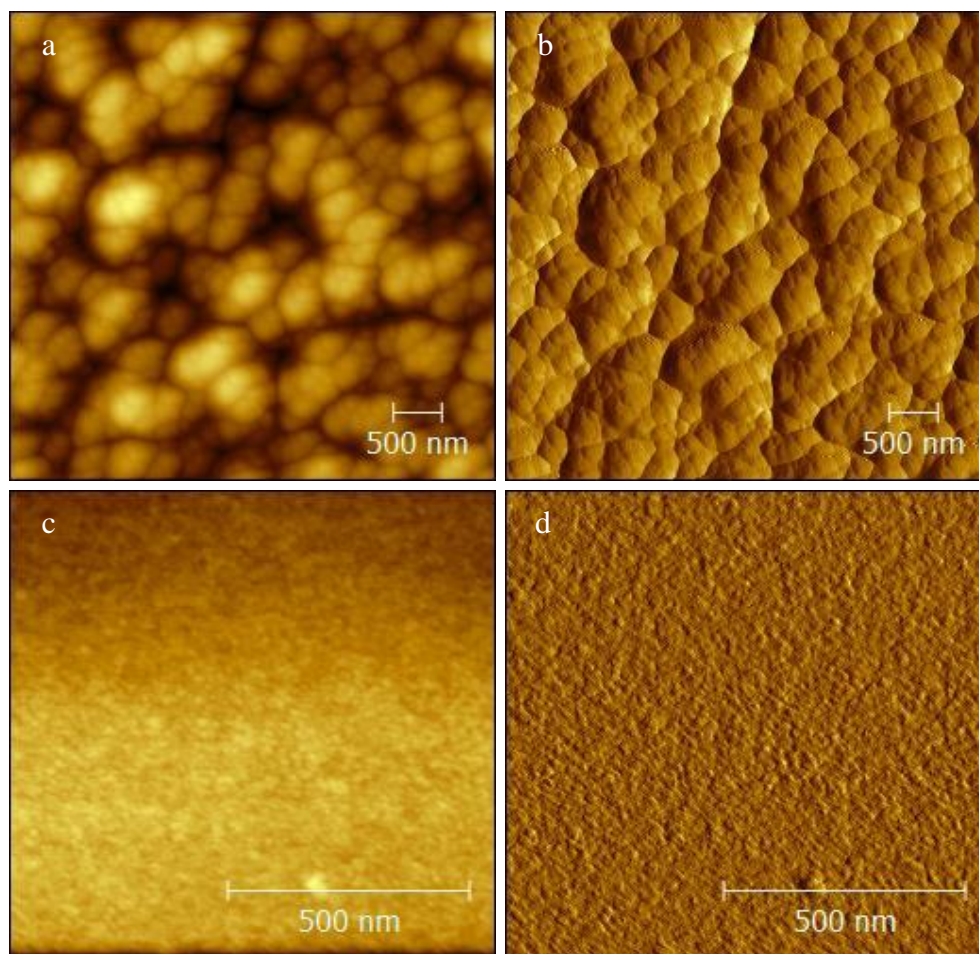


Figura 3.8 Imagem topográfica e de amplitude do filme W4 (a, b) e do filme W6 (c, d) depositados sobre silício, respectivamente.

mais acentuado o que, em termos de parâmetros de rugosidade (**Tabela 3.3**), se traduz num valor de S_a e S_q superior, quando comparado com a superfície W6 [34]. Todos os filmes apresentam uma distribuição achatada caracterizada por um valor de curtose inferior a 3. As superfícies apresentam ainda uma simetria em relação à altura dos picos e à profundidade dos vales uma vez que os valores de $Skew$ são aproximadamente zero.

Tabela 3.3 Parâmetros de rugosidade dos filmes W4, W6 e N1 depositados sobre silício.

Superfície	Parâmetros de rugosidade			
	S_a (nm)	S_q (nm)	$Skew$	Curtose
W4	59,37	72,84	0,02	-0,40
W6	25,99	30,21	-0,02	-1,11
N1	28,83	34,86	0,10	-0,69

Uma vez que os filmes depositados sobre silício apresentam uma topografia diferente dos filmes depositados sobre PDMS a sua posterior aplicação na cultura de células vai permitir inferir sobre a percentagem de influência da química e da topografia no comportamento celular, uma vez que serão testadas duas superfícies quimicamente iguais, mas com topografias diferentes.

3.3. Caracterização Estrutural

A análise estrutural dos filmes foi realizada através de difração de raios X. Na **Figura 3.9** está representado o difractograma do filme W4 que é representativo dos restantes filmes.

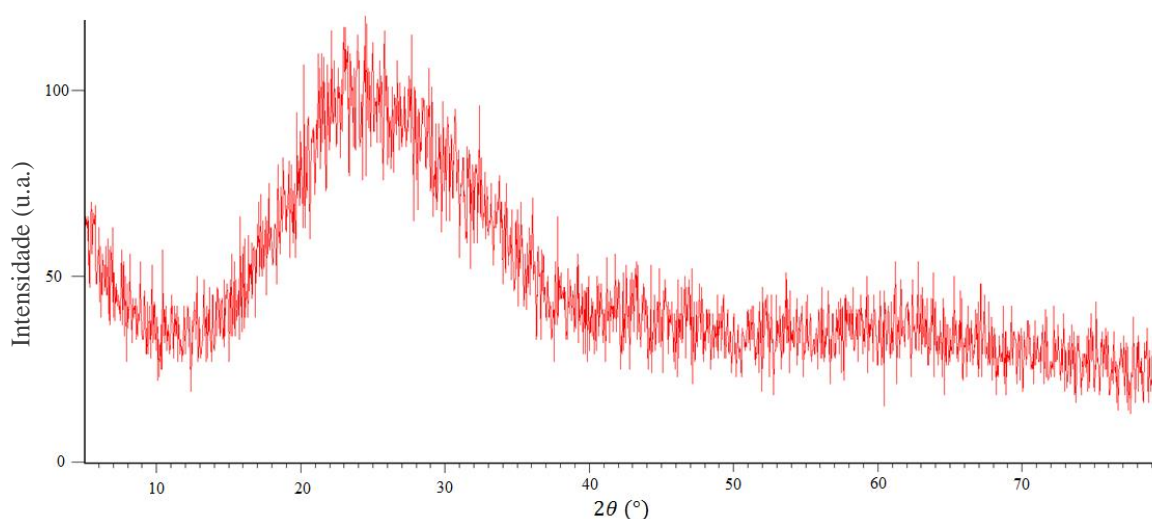


Figura 3.9 Difractograma do filme fino W4 depositado sobre PDMS.

A presença de uma bossa larga no difractograma indica que o filme não apresenta qualquer ordem estrutural. Esta ausência de ordem estrutural foi já observada na deposição de filmes finos poliméricos ou a partir de grafite e é característica do processo de pulverização catódica r.f., independentemente do grau de cristalinidade dos materiais que constituem o alvo ou o substrato. Tal acontece porque quando o material é ejetado do alvo e atinge a superfície do substrato não tem mobilidade suficiente para se arranjar de forma ordenada a curta e a longa distância. Esta baixa mobilidade é resultado das baixas temperaturas do substrato, pois no equipamento utilizado a zona do porta-substratos é continuamente arrefecida. Este arrefecimento faz com que o material, quando chega ao

substrato, condense na zona onde embateu, não podendo difundir ao longo da superfície para nuclear num local energeticamente favorável, dando origem a uma estrutura amorfa [34].

3.4. Caracterização Química

A caracterização química dos filmes depositados por pulverização catódica é fundamental uma vez que o arranjo do material ejetado na superfície do substrato pode levar à formação de novas ligações que tornam as propriedades do filme diferentes das do alvo. No caso do carbono esta caracterização torna-se particularmente importante devido aos vários estados de hibridização do carbono que originam diferentes formas alotrópicas com propriedades distintas. Uma das formas alotrópicas de carbono mais conhecidas é o diamante constituído por ligações sp^3 que formam uma rede tridimensional que confere ao material uma boa condutividade térmica. A grafite é constituída por várias camadas de ligações sp^2 em anel aromático (grafeno) que conferem ao material uma boa condutividade elétrica. O carbono amorfo não apresenta cristalinidade e é constituído por ligações sp^3 e sp^2 pelo que, as propriedades do mesmo vão depender da razão entre ambas [46, 47]. Assim, são os elementos e o tipo de ligação entre eles que vão definir as propriedades do filme.

3.4.1. FTIR

A caracterização química dos filmes de carbono e de poliamida 6,6 foi realizada, numa primeira abordagem, por FTIR, de forma a tentar identificar os grupos químicos presentes nos filmes. Neste trabalho foi realizado FTIR nos filmes depositados sobre PDMS e sobre silício. Contudo, um dos problemas da utilização desta técnica em filmes finos é que o espetro obtido pode apresentar bandas referentes a grupos químicos do substrato e não do filme. Assim os resultados que se seguem são referentes aos filmes depositados sobre silício em que a técnica foi realizada em modo ATR de modo a anular o sinal proveniente do substrato. Na **Figura 3.10** está representado o espetro de FTIR dos filmes de carbono W4 e W6.

Pela análise dos espetros é possível observar que ambos apresentam bandas largas e pouco definidas, resultado da falta de ordem estrutural dos filmes. No caso do filme W6, apesar de ser semelhante ao do filme W4, as bandas são ainda menos evidentes uma vez que a espessura do filme é consideravelmente menor. Esta fraca definição levou a que a identificação das ligações químicas presentes nos filmes de carbono se tornasse mais difícil,

contudo tendo em conta as bandas descritas na literatura foi realizada uma correspondência com as obtidas neste trabalho (**Tabela 3.4**) A partir das ligações detetadas é possível observar que houve incorporação de mais elementos para além de carbono (constituente principal da grafite), nomeadamente oxigénio e hidrogénio.

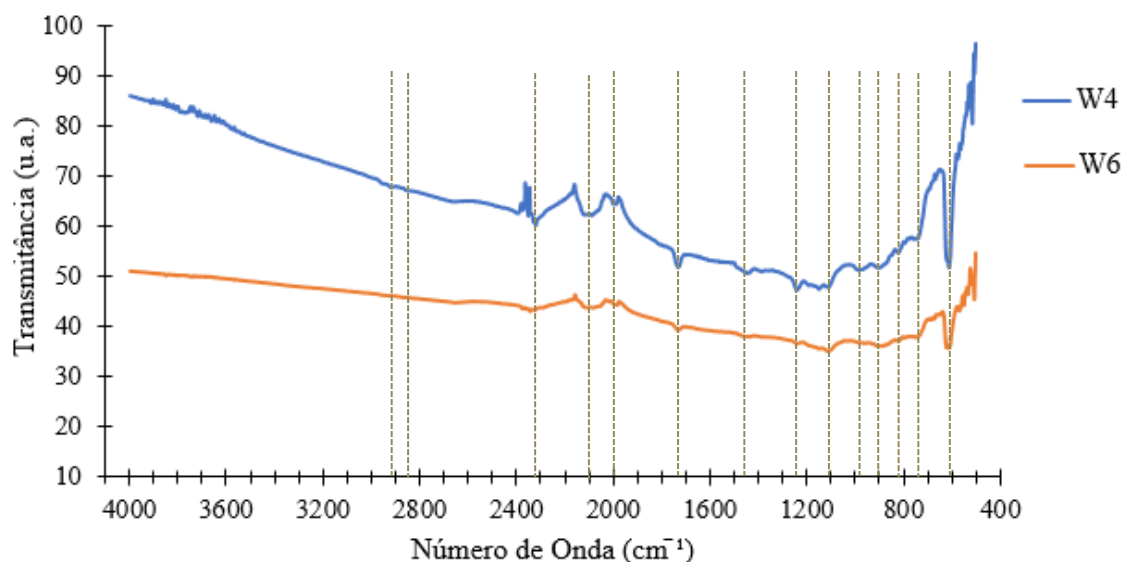


Figura 3.10 Espectro de FTIR do filme de carbono W4(azul) e do filme de carbono W6 (laranja) depositados sobre silício.

Tabela 3.4 Identificação das bandas nos espectros de FITR dos filmes de carbono W4 e W6.

Número de onda (cm ⁻¹)	Ligação	Referência
600	Deformação C-H	
~810 e ~750	C-H aromático deformação angular fora do plano	
~900 e ~990	RCH=CH ₂ deformação angular fora do plano	
1100 e ~1234	C-O deformação axial	
~1450	Deformação C=C aromático	[48, 49, 50]
~1729	Deformação C=O carbonilo	
2000	C=C=C deformação axial	
2100	C≡C deformação axial	
2319	Deformação CO ₂	
~2848 e ~2915	Deformação C-H do CH ₂ e CH ₃	

O espectro de FTIR correspondente ao filme de poliamida (N1) e o espectro do alvo de poliamida 6,6 usado para depositar o filme encontram-se representados na **Figura 3.11**.

Uma vez que o alvo apresenta uma estrutura cristalina, as bandas presentes no espectro são bem definidas ao contrário do filme N1 que, por não possuir ordem estrutural, deu origem a um espectro com bandas pouco definidas, tal como nos filmes de carbono. Apesar da fraca definição do espectro é possível observar que o seu perfil é semelhante ao do espectro do alvo, isto é, as bandas que aparecem no espectro do filme estão na mesma zona das bandas que aparecem no espectro do alvo. A única banda que não aparece no espectro do alvo está localizada nos 2150 cm^{-1} e corresponde a uma ligação dupla entre carbonos que pode ter resultado do arranjo do material ejetado na superfície do substrato. Na **Tabela 3.5** estão apresentadas as ligações detetadas no espectro do alvo de poliamida 6,6 e do filme. Todas as ligações estão em concordância com as presentes no polímero de poliamida 6,6.

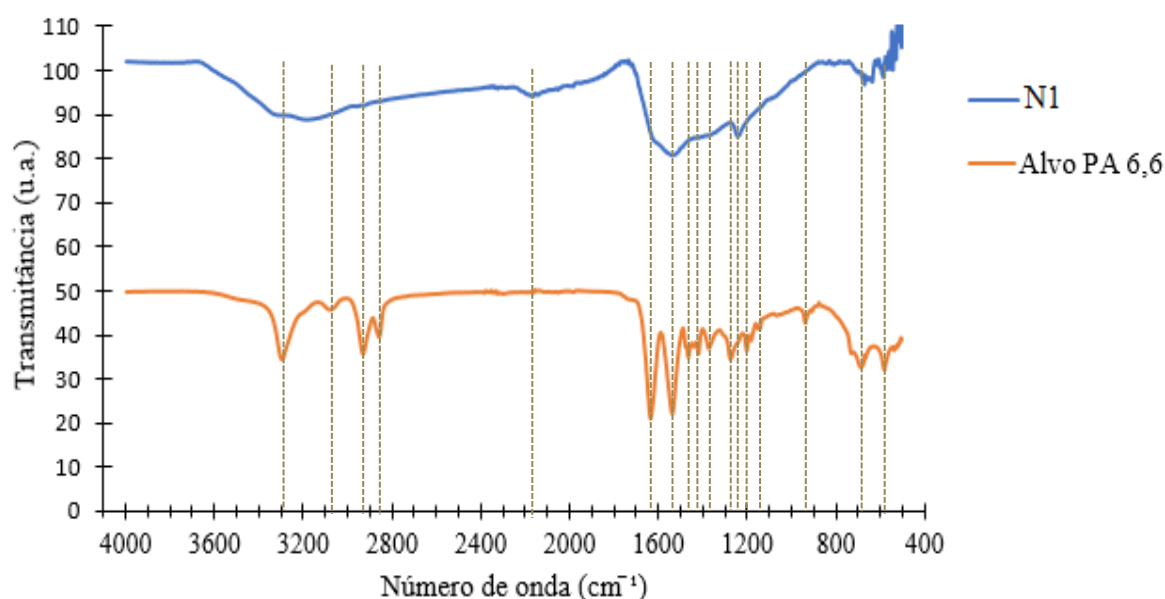


Figura 3.11 Espectro de FTIR do filme N1 depositado sobre silício (azul) e do alvo de poliamida 6,6 (laranja).

Tabela 3.5 Identificação das bandas nos espectros de FTIR do filme N1 e do alvo de poliamida 6,6.

Número de onda (cm ⁻¹)	Ligação	Referências
3298	N-H deformação axial	
3082	N-H deformação angular no plano	
2932	CH ₂ deformação axial assimétrica	
2860	CH ₂ deformação axial simétrica	
2150	Deformação C=C=O	
1634	deformação axial C=O e N-H, amida primária	
1535	deformação axial C-N e deformação angular CO-N-H, amida secundária	
1463	Deformação N-H; CH ₂ deformação angular simétrica no plano	[51, 52, 53, 54]
1437	deformação CH ₂	
1373	C-N deformação axial	
1273	Deformação axial amida III	
1220	NH-C=O deformação angular fora do plano	
1200	Pico cristalino: C-CH deformação angular fora do plano simétrica; deformação angular fora do plano assimétrica de CH ₂ ; deformação angular fora do plano, amida III	
1142	C=O deformação angular fora do plano	
935	Pico cristalino: deformação axial C-C=O	
684	C-C deformação angular	
578	Deformação C-C	

3.4.2. XPS

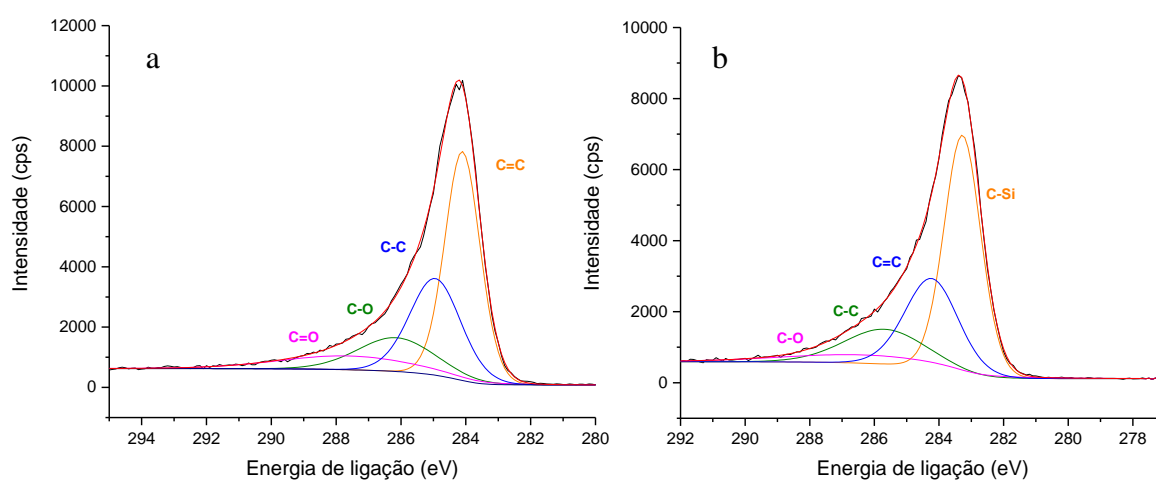
A partir do XPS foi possível realizar uma caracterização mais pormenorizada da química dos filmes de carbono e de poliamida de forma a confirmar e complementar os resultados de FTIR. Numa primeira instância foi possível determinar os elementos presentes na superfície dos filmes e a sua percentagem (**Tabela 3.6**).

Tabela 3.6 Quantificação, por XPS, da composição química dos filmes W4, W6 e N1.

Filme	Composição química (%at)		
	C	O	N
W4	80,5	13,2	6,3
W6	77,1	15,9	7,0
N1	57,9	11,1	31,0

O oxigênio presente nos filmes de carbono, e já detectado pelas ligações dos espectros de FTIR, provém do oxigênio residual presente na câmara de deposição e foi incorporado nos filmes aquando da deposição do carbono. Relativamente à presença de azoto, apesar de em pequenas quantidades comparativamente com o filme N1, pode ter resultado de uma contaminação da câmara de pulverização, resultante de deposições de poliamida realizadas anteriormente. Nos filme de poliamida 6,6 os elementos presentes coincidem com aqueles presentes no alvo não tendo ocorrido nenhuma contaminação.

A técnica de XPS permitiu ainda determinar as ligações que os elementos presentes na **Tabela 3.6** formam, através da desconvolução dos picos presentes nos espectros de alta resolução efetuados para os elementos identificados nos espectros gerais. Neste trabalho foi realizada a desconvolução dos picos de carbono e oxigênio dos filmes W4, W6 e N1 e do pico de azoto, no caso particular do filme N1. Na **Figura 3.12** estão representadas as desconvoluções dos picos de carbono referentes aos três filmes e a desconvolução do pico de azoto. As restantes desconvoluções estão apresentadas em Apêndice B.

**Figura 3.12** Desconvolução do pico de carbono do filme W4 (a), W6 (b), e N1 (c) e desconvolução do pico de azoto do filme N1 (d).

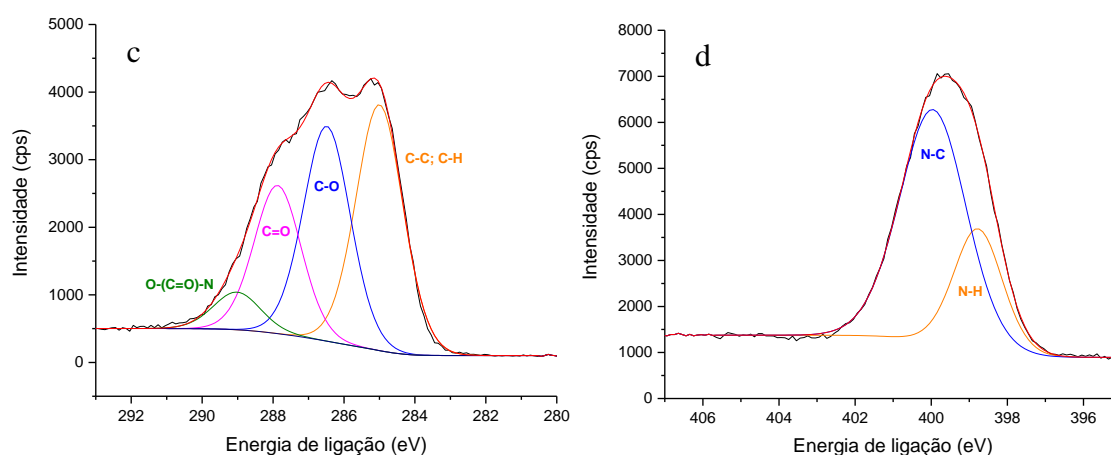


Figura 3.12 Desconvolução do pico de carbono do filme W4 (a), W6 (b), e N1 (c) e desconvolução do pico de azoto do filme N1 (d). (Continuação).

Relativamente aos filmes W4 e W6 observou-se que o carbono forma maioritariamente ligações duplas, sp^2 do tipo grafeno, uma vez que a área do seu pico é aproximadamente o dobro do das ligações C-C. No caso particular do filme W6, esta relação também é verificada, contudo, o pico de maior intensidade é o da ligação C-Si, que resultou da reação do carbono depositado com o material do substrato (silício). Uma vez que a espessura do filme é muito pequena esta ligação é proveniente da interface entre o filme e o substrato o que vem provar que existe uma excelente adesão entre o filme e o substrato uma vez que estes se ligam por ligações covalente e não por interações fracas. Através da comparação com as ligações detetadas por FTIR, a ligação tripla $C\equiv C$ não foi detetada, o que pode estar relacionado com o facto XPS analisar até uma espessura máxima de 10 nm. As ligações entre o carbono e o oxigénio, detetadas no espetro de FTIR, foram confirmadas pela desconvolução do pico do carbono e do oxigénio.

Em relação às ligações detetadas no filme N1 observa-se que estas coincidem com as observadas no espetro de FTIR dando-se especial destaque ao grupo amida (R-(CO)-N), característico da poliamida 6,6. Apenas a ligação simples C-O detetada por XPS, não se encontra presente no material do alvo, uma vez que este é constituído apenas por ligações duplas (C=O). A sua presença no filme pode ser resultado do rearranjo do material ejetado na superfície do substrato de acordo com o anteriormente analisado.

3.4.3. Espectroscopia de Raman

Relativamente aos filmes de carbono, apesar dos resultados de XPS terem demonstrado com que elementos e em que tipo de ligações o carbono está envolvido é necessário saber qual a estrutura, nomeadamente se as ligações C=C se formam em cadeia linear ou em anel aromático. A espectroscopia de Raman é uma técnica muito útil para este efeito, uma vez que permite avaliar a estrutura de filmes de carbono e detetar qual a forma alotrópica do carbono presente no filme [55]. Assim foi realizada a espectroscopia de Raman nos dois filmes de carbono onde se realizaram 3 aquisições para observar se existia homogeneidade no filme. Na **Figura 3.13** está representado o espectro de Raman dos filmes W4 e W6.

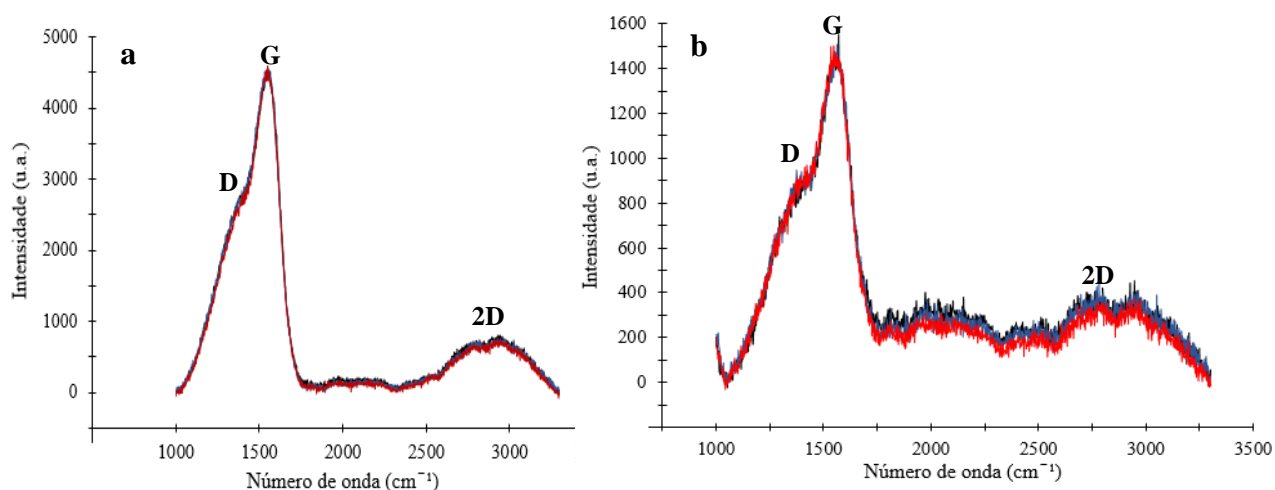


Figura 3.13 Espectros de Raman do filme W4 (a) e W6 (b).

Pela análise dos espectros observa-se que os filmes apresentam homogeneidade, uma vez que as três aquisições são iguais. O pico de maior intensidade situado a 1580 cm^{-1} , denominado por banda G, é característico da grafite e corresponde a ligações do tipo sp^2 em anel aromático o que vem confirmar o anteriormente observado em XPS. Outra banda característica da grafite é a 2D, situada nos 2700 cm^{-1} e resulta das interações das múltiplas camadas de grafeno sendo que a sua intensidade varia inversamente com o número de camadas de grafeno. A banda D, acoplada à banda G e situada nos 1350 cm^{-1} indica a presença de ligações do tipo sp^3 , que justificam a formação de ligações do tipo C-C detetadas em FTIR e XPS [55, 56]. Por fim, é possível observar ainda uma banda, situada entre a banda 2D e a banda G que está associada às hibridizações do tipo sp^2 linear e à hibridização sp .

Esta hibridização explica a formação de ligações do tipo =C=C=C=C= (policumulenos) ou do tipo -C≡C-C≡C- (poliienos), anteriormente detetadas por FTIR [57, 58]. Deste modo, tendo em conta os elementos presentes nos filmes de carbono, as ligações entre eles e a forma como estas se organizam, é possível concluir que os filmes de carbono são amorfos e as ligações do tipo sp² predominam no material e são características da grafite.

3.5. Molhabilidade

3.5.1. Ângulo de Contacto Estático

A molhabilidade foi avaliada através da medição dos ângulos de contacto estáticos dos filmes depositados sobre lamelas de vidro e sobre PDMS. No caso dos filmes depositados sobre vidro, a rugosidade da superfície é da ordem nanométrica pelo que se considera que o valor do ângulo de contacto medido está relacionado apenas com a química da superfície. No caso dos filmes depositados sobre PDMS, como apresentam uma rugosidade evidente, o ângulo de contacto medido vai depender não só da química, como da topografia da superfície. Na **Tabela 3.7** estão representados os ângulos de contacto medidos nos filmes depositados sobre vidro e sobre PDMS utilizando como líquidos, a água e a formamida. A medição do ângulo de contacto foi realizada 5 segundos após a gota ter sido colocada na superfície.

Tabela 3.7 Ângulos de contacto médios dos filmes depositados sobre vidro e sobre PDMS.

Substrato	Filme	Ângulo de contacto (°)	
		Água	Formamida
Vidro	-	20±0	-
	W4	64±1	56±1
	W6	60±2	36±1
	N1	59±3	31±1
PDMS	-	100±3	91 ±3
	W4	107±2	82±3
	W6	99±5	85 ±3
	N1	81±6	47 ±6

Relativamente aos filmes depositados sobre vidro, observa-se que estes apresentam um ângulo de contacto inferior a 65° . Uma vez as superfícies desenvolvidas neste trabalho têm como finalidade a interação com fluidos biológicos considera-se que o limiar entre a hidrofiliabilidade e a hidrofobicidade são os 65° [59]. Assim todos os filmes depositados sobre vidro são quimicamente hidrófilos. Este resultado era espectável uma vez que os grupos químicos identificados por FTIR e XPS são maioritariamente polares (-OH, -C=O, -C(O)-NH) pelo que, apresentam afinidade com a água. Uma vez que os filmes são hidrófilos, o modelo de Wenzel diz que ao aumentar a área de superfície, ou seja, ao introduzir rugosidade, a superfície devia apresentar ângulos de contacto menores [39, 60]. Contudo ao analisar os valores dos ângulos de contacto medidos na superfície dos filmes depositados sobre PDMS, que apresentam uma rugosidade à escala micrométrica e nanométrica, observa-se precisamente o contrário do que o modelo de Wenzel prevê.

A razão para esta contradição reside no facto de o líquido ter que ultrapassar as barreiras impostas pela superfície, nomeadamente os picos e os vales, para poder espalhar-se pela superfície. Assim, quando a gota é colocada na superfície rugosa, o ângulo inicial que ela forma com a superfície é muito elevado porque a gota ainda não se começou a espalhar. Contudo, como existe afinidade entre o líquido e a superfície, a gota começa a ultrapassar os picos e os vales e o ângulo começa a diminuir. A afinidade entre o líquido e a superfície do filme é que dita a velocidade de espalhamento da gota.

No caso do filme de poliamida, como apresenta na sua superfície grupos carbonilo, hidroxilo e ligações N-H, existe uma maior afinidade com a água e consequentemente é possível observar o espalhamento da gota de água mais rapidamente, que se traduz em ângulos de contacto medidos cada vez menores. Essa variação está representada na **Figura 3.15** onde está representado o comportamento de uma gota de água colocada na superfície do filme N1 depositado sobre PDMS desde o instante inicial até atingir um equilíbrio. O valor do ângulo de contacto tende para um valor muito próximo do obtido no filme depositado sobre vidro.

No caso dos filmes de carbono este espalhamento também ocorre, contudo de forma muito mais lenta, uma vez que, apesar de existir algum oxigénio que confere hidrofiliabilidade à superfície, a afinidade entre a água e o filme não é tão intensa como no caso da poliamida. Não obstante, é de esperar que os ângulos de contacto medidos diminuam até atingir valores muito próximos daqueles medidos nos filmes de carbono depositados sobre

vidro. Quando utilizada a formamida foi possível observar uma diminuição do ângulo de contacto entre estas e o filme de carbono, uma vez que a formamida apresenta uma tensão superficial menor do que a da água (**Figura 3.14**).

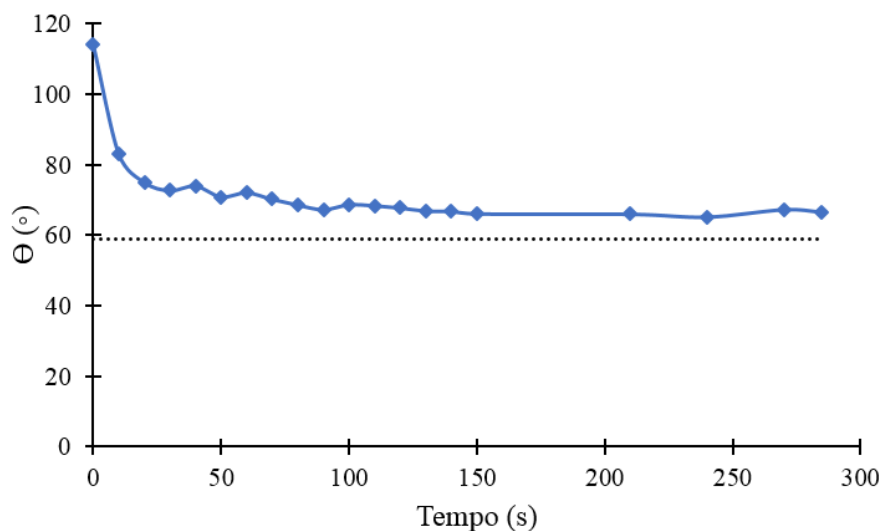


Figura 3.15 Variação do ângulo de contacto de uma gota de água colocada na superfície do filme N1 depositado sobre PDMS em função do tempo. A linha a tracejado corresponde ao ângulo medido no filme depositado sobre vidro.

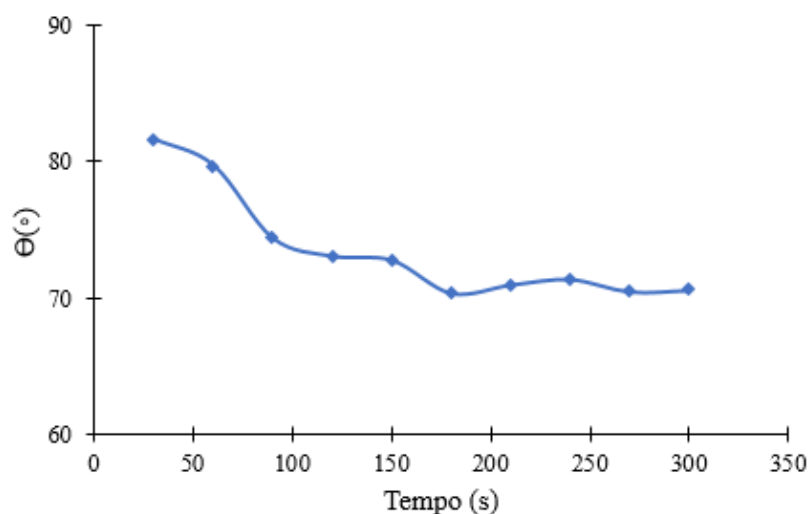


Figura 3.14 Variação do ângulo de contacto de uma gota de formamida colocada na superfície do filme de carbono depositado sobre PDMS em função do tempo.

3.5.2. Energia Superficial

A energia superficial dos filmes é outro parâmetro que permite inferir sobre a molhabilidade da superfície bem como sobre a reatividade da mesma. Este parâmetro pode ser medido através dos ângulos de contacto medidos com diferentes líquidos, neste caso a água e a formamida, e através da aplicação das **Equações (3.1) e (3.2)**:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (3.1)$$

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p \gamma_L^p} \quad (3.2)$$

onde, θ é o ângulo de contacto estático medido para cada líquido, γ_s é a tensão superficial do filme, γ_s^d a componente dispersiva da tensão superficial do filme, γ_s^p a componente polar da tensão superficial do filme, γ_L é a tensão superficial do líquido, γ_L^d a componente dispersiva da tensão superficial do líquido e γ_L^p a componente polar da tensão superficial do líquido. No caso da água $\gamma_L=72,8$ mJ/m²; $\gamma_L^p= 51$ mJ/m² e $\gamma_L^d= 21,8$ mJ/m². No caso da formamida $\gamma_L=58,2$ mJ/m²; $\gamma_L^p= 18,7$ mJ/m² e $\gamma_L^d= 39,5$ mJ/m².

As tensões superficiais dos filmes e as componentes polar e dispersiva estão apresentadas na **Tabela 3.8**.

Tabela 3.8 Tensões superficiais dos filmes e respetivas componentes dispersiva e polar.

Filme	Tensão Superficial (mJ/m ²)		
	γ_s	γ_s^d	γ_s^p
W4	38,1	16	22,1
W6	44,8	27,6	17,2
N1	50,4	36,0	14,4

Os valores de energia de superfície calculados são ligeiramente semelhantes sendo que os filmes de carbono apresentam valores mais baixos do que a poliamida pelo que, são mais estáveis. No entanto, mais importante que os valores, que não podem ser considerados absolutos, convém realçar a importância relativa das componentes dispersivas e polares. Com efeito, no que respeita aos filmes de carbono o filme com menor espessura, W6, apresenta uma distribuição da energia de superfície de 62% para a componente dispersiva e de 38% para a polar. Já a superfície mais espessa, W4, tem 42% da sua energia de superfície de superfície atribuída à componente dispersiva e 58% à componente polar.

Este resultado é consequência da diferença de espessuras dos dois revestimentos pois ambos incorporam oxigênio. Quanto maior a espessura do filme mais oxigênio é incorporado, sobretudo nas camadas mais exteriores, de acordo com a caracterização por XPS, pelo que a componente polar assume importância relativa superior. No que respeita a superfície do filme de poliamida, N1, é o que apresenta maior contribuição da sua componente dispersiva para a energia de superfície, cerca de 71%, e cuja componente polar assume menor importância, 29%.

3.6. Potencial de Corrente

O potencial zeta permitiu inferir, de forma indireta, sobre o potencial da superfície do filme. O seu valor depende da carga da superfície que, por sua vez, depende dos grupos químicos presentes na mesma. Não foi possível medir o potencial zeta nos filmes depositados sobre PDMS devido à topografia rugosa que induzia variações na pressão durante as medições. Por este motivo, os valores apresentados na **Tabela 3.9** são referentes ao potencial zeta dos filmes depositados sobre vidro.

Tabela 3.9 Valores do potencial zeta dos filmes W4, W6 e N1.

Filme	W4	W6	N1
Potencial zeta (mV)	-37,2 ± 13,1	-25,2 ± 19,5	-52,8±15,4

Pela análise dos resultados observa-se que todos os filmes apresentam um potencial negativo, o que indica que os grupos químicos presentes na superfície dos filmes apresentam maioritariamente carga negativa. Relativamente aos filmes de carbono (W4 e W6) estes apresentam um potencial zeta ligeiramente menos negativo do que o filme de poliamida (N1). Este resultado pode estar relacionado com a quantidade de grupos carboxílicos e carbonilos presentes em maior quantidade no filme de poliamida que conferem uma carga negativa ao filme. Por outro lado, este valor vem confirmar que o azoto, utilizado como gás de descarga durante a deposição, não contribuiu significativamente para a formação de uma elevada percentagem de grupos NH₂ (confere carga positiva devido à protonação) pois, caso tal acontecesse o valor do potencial zeta seria menos negativo. Este resultado vem reforçar o anteriormente observado por XPS, onde é evidente que o azoto se

encontra maioritariamente ligado ao carbono, mas a percentagem de ligações N-H é relativamente baixa. Através dos valores de potencial zeta é ainda possível inferir sobre a estabilidade dos filmes quando em contacto com eletrólitos e, portanto, numa situação diferenciada da avaliação de ângulos de contacto. Assim, as superfícies dos filmes W4 e N1 são moderadamente mais estáveis do que a superfície W6 uma vez que apresentam valores de potencial zeta inferiores a -30mV, considerada a zona de estabilidade [61]. Ainda relativamente aos valores medidos, observa-se que no caso dos três filmes, todos apresentam um desvio padrão associado muito alto. Isto indica que as superfícies dos filmes não são inertes, ou seja, reagem com o eletrólito usado. Desta forma, a cada medição realizada o valor do potencial zeta medido vai ser diferente como consequência da alteração da carga na superfície dos filmes.

3.7. Testes *in vitro*

3.7.1. Células Procariotas

A adesão bacteriana, indesejável principalmente na área dos biomateriais, pode ser controlada através da manipulação das propriedades/características da superfície. A modificação da topografia é uma das estratégias utilizadas para melhorar a atividade antibacteriana das superfícies, sendo a adaptação das dimensões topográficas um dos parâmetros fundamentais. Não obstante, para que o efeito final seja satisfatório é necessário ter em conta a química e as próprias características da célula, que intervêm igualmente na interação superfície/bactéria [62, 63].

Neste trabalho, os filmes depositados sobre silício e sobre PDMS, com diferentes topografias, mas química igual, foram colocados em contacto com 4 estirpes bacterianas, duas Gram-negativas: *E. coli* e *P. aeruginosa* e duas Gram-positivas: *B. subtilis* e a *S. aureus*. Os testes foram realizados em meio sólido e em meio líquido, contudo neste último ocorreu uma contaminação pelo que, os resultados referentes ao mesmo não serão apresentados nesta dissertação.

Os testes realizados em meio sólido tiveram como principal objetivo observar se ocorria formação de halo de inibição, contudo após aproximadamente 65 horas em contacto com as bactérias não se observou formação do mesmo. Não obstante, as superfícies foram retiradas da cultura e analisadas por microscopia eletrónica de varrimento.

Relativamente às estirpes Gram-positivas foi observado um comportamento oposto quando colocadas nas duas topografias. Nos filmes depositados sobre PDMS, ou seja, com dupla rugosidade, foi observada uma maior adesão por parte do *B. subtilis* comparativamente com os filmes depositados sobre silício que apresentam uma rugosidade menos evidente (**Figura 3.16 a, b**). Este resultado tem a ver com o facto da rugosidade dos filmes depositados sobre PDMS apresentar dimensões superiores ao tamanho da bactéria o que, de acordo com a literatura [64, 65, 66], não promove a atividade antibacteriana da superfície, muito pelo contrário, pois as bactérias ficam alojadas nas irregularidades da superfície. No caso da *S. aureus* foi observado exatamente o oposto, ou seja, nos filmes depositados sobre silício ocorreu uma maior adesão bacteriana do que nos filmes depositados sobre PDMS (**Figura 3.16 c, d**). Este resultado pode estar relacionado com a forma da

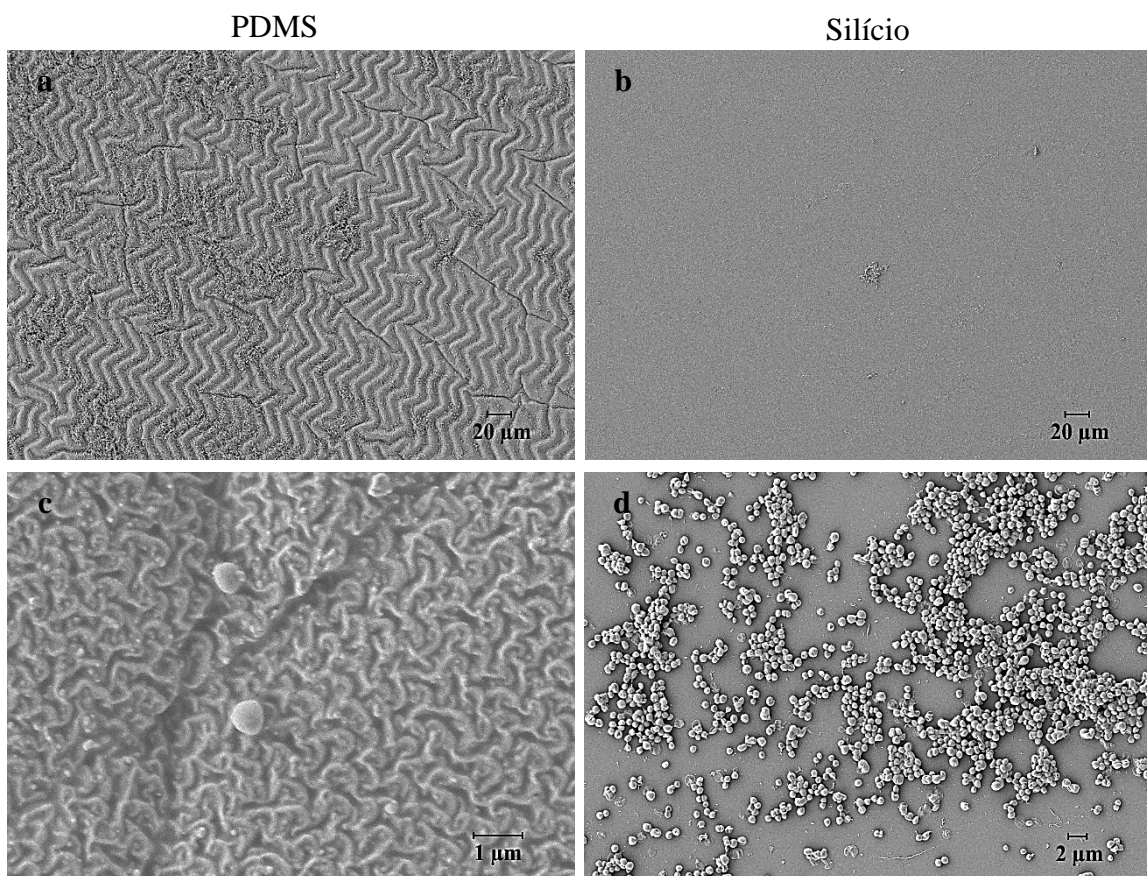


Figura 3.16 Filme W4 em contacto com a *B. subtilis* (a, b) e *S. aureus* (c, d).

bactéria, uma vez que o *B. subtilis* é um bastonete, e, portanto, mais longa e mais estreita e a *S. aureus* é cocos. Este resultado vem evidenciar o papel ativo que a própria bactéria tem na interação com a superfície [67].

No caso das Gram-negativas, e no caso particular da *P. aeruginosa* também se observa uma tendência no seu comportamento consoante o tipo de topografia com que está a interagir. Nos filmes depositados sobre PDMS foi observada uma maior adesão bacteriana ao contrário dos filmes depositados sobre silício, onde se observou uma redução na quantidade de bactérias (**Figura 3.17 a, b**). Mais uma vez, e tal como se observou com *B. subtilis*, este resultado está relacionado com as dimensões da rugosidade da superfície.

A *E. coli*, apesar de ser uma Gram-negativa como a *P. aeruginosa*, não apresentou um comportamento tão tendencioso consoante a topografia com que esteve em contacto. Isto porque não se observou uma diferença significativa no número de bactérias que aderiram à superfície dos filmes depositados sobre PDMS e sobre silício. No caso dos filmes depositados sobre PDMS, as bactérias orientaram-se segundo as rugas ou fissuras existentes no filme (**Figura 3.17 c, d**).

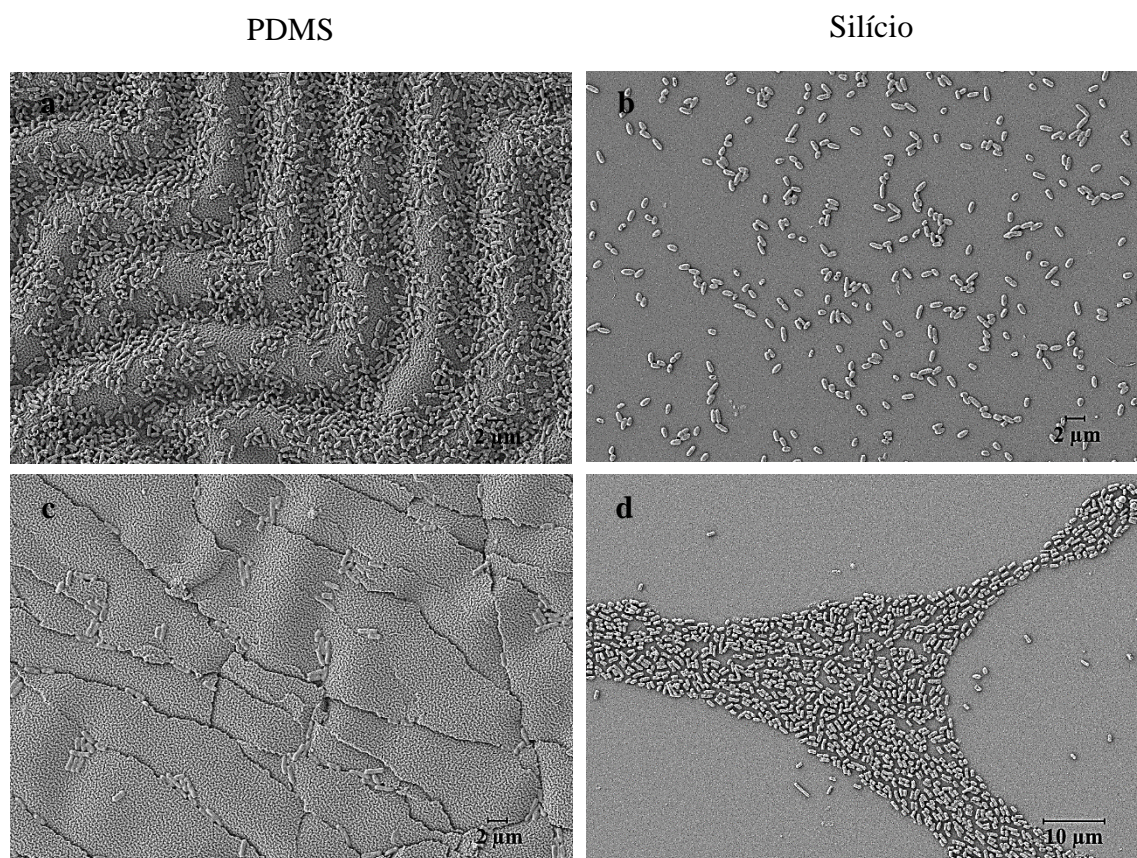


Figura 3.17 Filme W4 em contacto com *E. coli* (a, b) e *P. aeruginosa* (c, d).

Este resultado, bem como o observado no caso das Gram-positivas, vem mostrar que apesar de se testar bactérias que pertencem à mesma classe (Gram-positivas e Gram-

negativas), o comportamento de cada uma pode ser completamente distinto quando em contacto com a mesma superfície. Isto vem reforçar a ideia que as interações entre a bactéria e a superfície não dependem só das características da superfície como também da própria bactéria.

Relativamente à influência da química das superfícies na adesão bacteriana não se observou uma diferença significativa entre os filmes de poliamida e carbono. Na literatura, apesar de não ser consensual [65], está descrito que geralmente a adesão bacteriana é inibida por superfícies hidrófilas e com carga negativa [62, 63]. Neste trabalho apesar de todas as superfícies apresentarem hidrofílicidade e um potencial zeta negativo, ocorreu adesão bacteriana. No entanto, deve ser realçado que o potencial zeta foi determinado em superfícies sem a dupla rugosidade (PDMS) pois a topografia fazia variar a pressão imposta durante a passagem do eletrólito, tornando a determinação impossível. Para além disso, a distribuição das quatro estirpes pelas superfícies não foi homogénea (**Figura 3.18**), independentemente de apresentar ou não rugosidade. No caso da *E. coli* e da *S. aureus* este fenómeno foi mais evidente nos testes com os filmes depositados sobre silício.

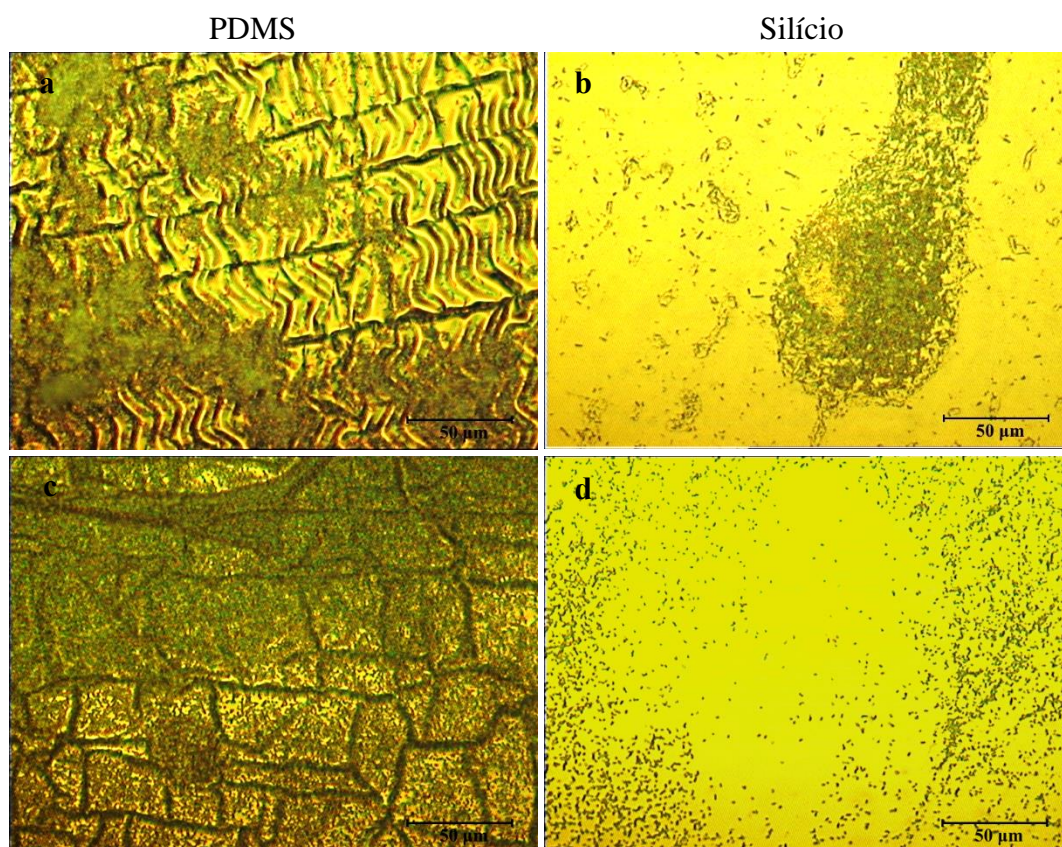


Figura 3.18 Microscopia ótica da *B. subtilis* em contacto com o filme W4 (a, b), *P. aeruginosa* em contacto com o filme W6 (c, d) e *S. aureus* em contacto com filme W4 (e, f).

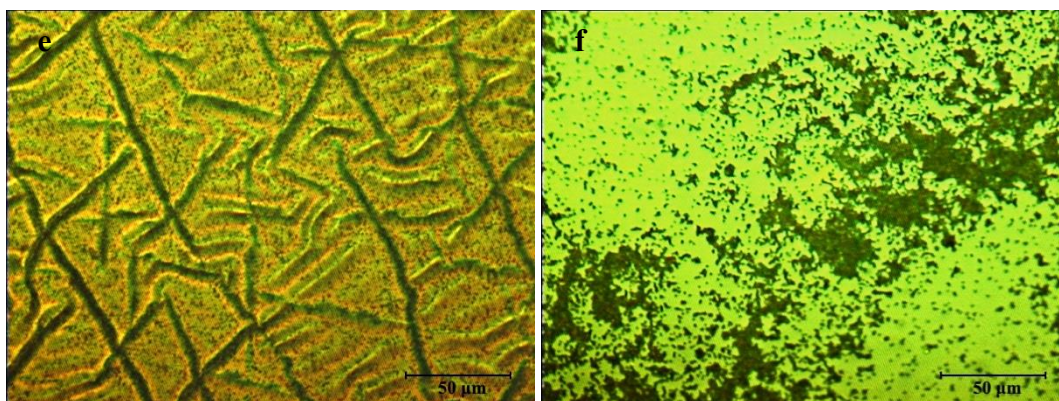


Figura 3.18 Microscopia ótica da *B. subtilis* em contacto com o filme W4 (a, b), *P. aeruginosa* em contacto com o filme W6 (c, d) e *S. aureus* em contacto com filme W4 (e, f). (Continuação).

A divergência de resultados mostra o quanto as características da superfície e o tipo de bactéria com que se está a estudar influenciam o resultado final. Assim, apesar dos resultados em meio sólido terem permitido retirar algumas conclusões, os testes em meio líquido seriam muito úteis para analisar a atividade antibacteriana das superfícies desenvolvidas neste trabalho.

3.7.2. Células Eucariotas

A cultura de células neuronais é normalmente realizada em placas de multipoços em que em cada poço é colocada uma lamela de vidro revestida com poli-L-lisina [68]. Neste trabalho a lamela de vidro revestida foi substituída pelos filmes N1, W4 e W6 depositados sobre PDMS e sobre silício. Após 14 dias em contacto com as células do córtex de embrião de rato, as superfícies foram analisadas através de microscopia ótica. No caso dos filmes depositados sobre PDMS, caracterizados por possuírem uma dupla rugosidade, não foi detetado qualquer vestígio de células pelo que, não ocorreu adesão entre estas e as superfícies dos filmes. Relativamente aos filmes depositados sobre silício, e caracterizados por apenas apresentarem nanorugosidade, foram detetadas células em todos os filmes e estas encontram-se representadas na **Figura 3.19**.

Pela análise da **Figura 3.19** é possível observar que existem neurónios o que indicia que as células não diferenciadas do córtex de embrião de rato foram capazes de aderir, proliferar e diferenciar nas superfícies W4 e W6. Apesar de não ter sido feita a marcação por

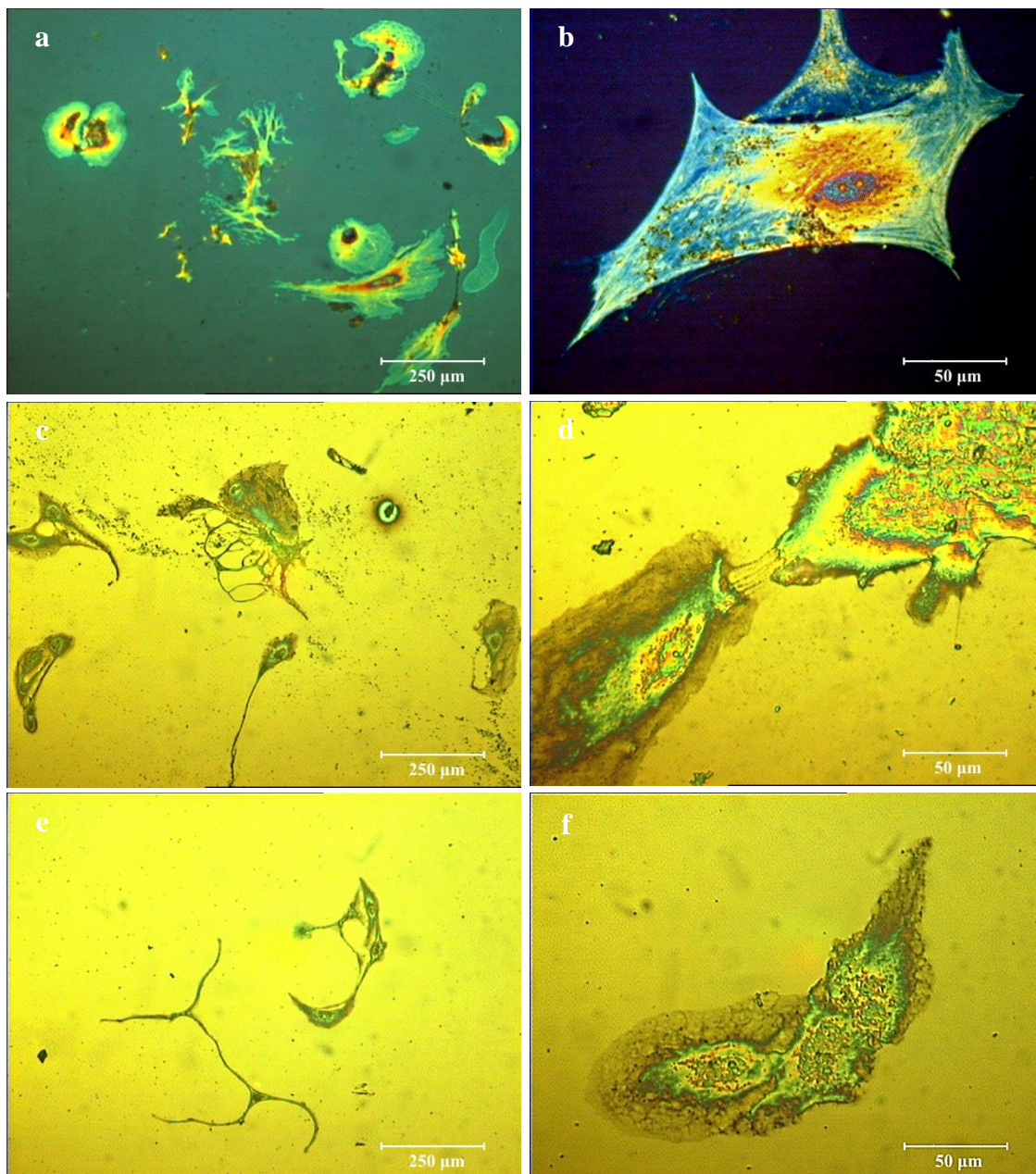


Figura 3.19 Microscopia ótica dos neurónios desenvolvidos no filme W4 (a, b), no filme W6 (c, d) e no filme N1 (e, f).

imunocitoquímica, é visível, uma morfologia consistente com a de sinapses, o que implica que os neurónios estão viáveis e funcionais (**Figura 3.19 b**). No entanto, os filmes de poliamida, apresentam uma menor densidade neuronal que a observada nos filmes de carbono e este resultado não era de todo o esperado, uma vez que a poliamida, por apresentar alguns grupos químicos semelhantes aos da poli-L-lisina, deveria ser favorável para o desenvolvimento dos neurónios. A justificação para este fraco desempenho da superfície

polimérica pode estar relacionada com o potencial zeta do filme N1 que é mais negativo do que os filmes de carbono e do que a poli-L-lisina, que apresenta um potencial zeta positivo.

Uma vez que os filmes depositados sobre silício e PDMS apenas diferem no tipo de topografia, sendo a química igual, a razão pela qual não ocorreu adesão de células nos filmes depositados sobre PDMS tem que estar relacionada com as características dimensionais da topografia. Com efeito, o comprimento de onda das rugas presentes nos filmes está compreendido entre os 10 e os 16 μm enquanto o corpo celular do neurónio tem aproximadamente 100 μm de diâmetro. Ou seja, não existe uma concordância entre o tamanho da célula e o comprimento de onda das rugas o que fez com que a célula não aderisse à superfície. Este resultado está de acordo com o descrito na literatura [6] que refere que é necessário existir uma concordância entre as dimensões da topografia superficial e da célula em estudo para que o processo de adesão e posterior proliferação ocorra. Relativamente à nanorrugosidade do silício, esta revelou-se eficaz no processo de adesão das células.

Uma vez que a dimensão do corpo celular do neurónio não permitiu que este aderisse às topografias desenvolvidas, foi também impossível verificar se estas teriam influência na orientação dos axónios. Assim, com o intuito de estudar se os axónios poderiam seguir a topografia, uma vez que apresentam dimensões em volume muito mais pequenas do que o corpo celular, optou-se por outra abordagem.

A abordagem adotada encontra-se representada esquematicamente na **Figura 3.20** e consistiu em desenvolver, numa primeira fase, as células do córtex de embrião de rato num suporte convencional, ou seja, em lamelas de vidro revestidas com poli-L-lisina ($Sq=2.37\pm 0.5$ [69]). Ao fim de 8 dias foram colocados sobre a cultura de células os filmes W4 depositados sobre PDMS com dupla rugosidade. Desta forma, foi garantido o desenvolvimento e a diferenciação das células, o que permitiu posteriormente observar se

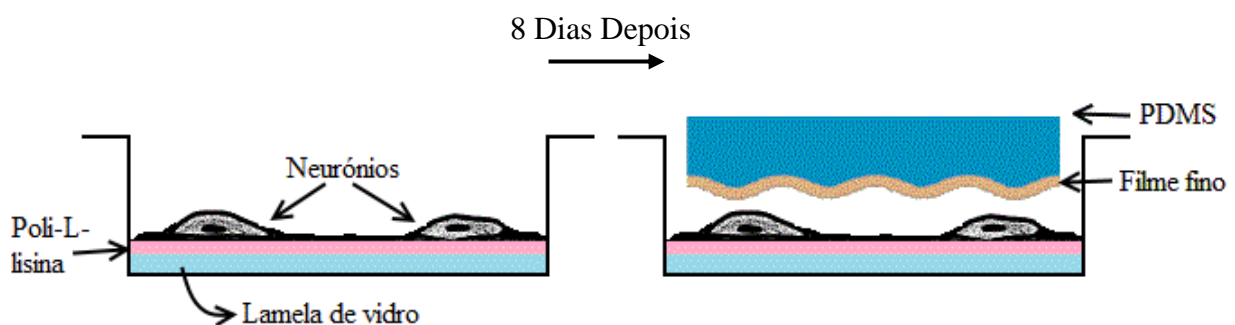


Figura 3.20 Esquema representativo da abordagem adotada para testar a interação entre os neurónios e a superfície rugosa.

ocorria interação entre estas e a superfície colocada sobre elas. Para além disso, acabou por se criar uma arquitetura 3D que, tendo em conta o meio biológico das células, é mais realista do que a cultura de células em lamelas de vidro (2D).

Após 14 dias a superfície rugosa foi separada da lamela de vidro e as duas superfícies foram analisadas por microscopia ótica e por SEM. Na **Figura 3.21** encontram-se representadas a microscopia ótica da lamela de vidro e as micrografias da superfície rugosa.

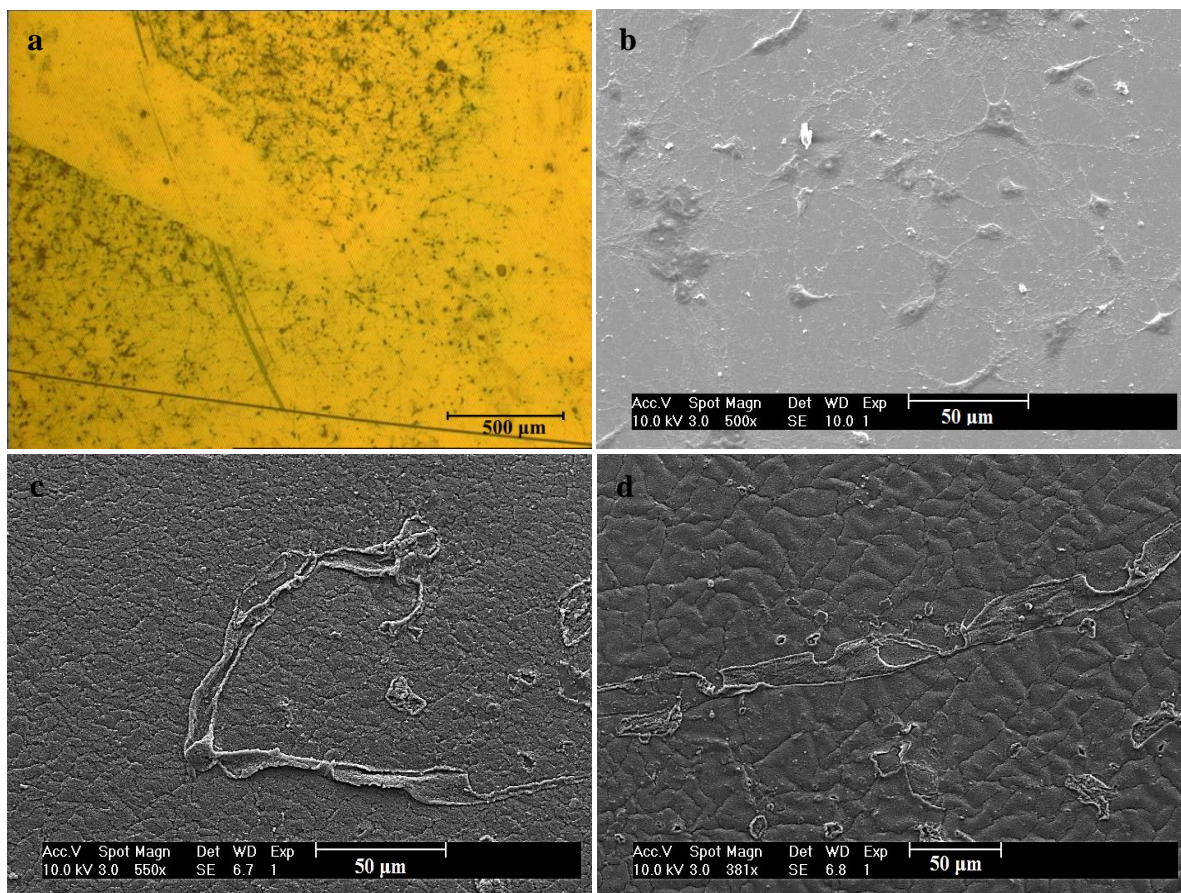


Figura 3.21 Microscopia ótica (a) e micrografia (b) das células que aderiram à lamela de vidro revestida com poli-L-lisina e micrografias de partes da rede neuronal que se desenvolveram no filme W4 depositado sobre PDMS (c, d).

A imagem de microscopia ótica da lamela de vidro com poli-L-lisina revela uma rede neuronal bem desenvolvida com algumas interrupções que se assume serem a rede que se encontra na superfície rugosa. Com efeito, pela análise da micrografia de SEM (**Figura 3.21 b**) é possível observar que um elevado número de neurónios aderiu à lamela de vidro revestida com poli-L-lisina e que estes são caracterizados por apresentar um desenvolvimento significativo de axónios e dendrites, que em conjunto formaram uma rede

neuronal relativamente complexa. De acordo com o que a observação por microscopia ótica já indicava também se observou partes da rede neuronal na superfície rugosa colocada sobre a cultura de células. Isto mostra que, apesar dos neurónios estarem colocados sobre uma superfície favorável ao seu desenvolvimento, conseguiram detetar a presença da superfície rugosa sobre eles, e esta constituiu um ambiente favorável pois ocorreu desenvolvimento da rede neuronal sobre a superfície. Desta forma desenvolveu-se uma rede neuronal tridimensional impossível de se observar no seu estado real devido á necessidade de separar as duas superfícies, para ser possível observar, o que “rasgou” a rede neuronal 3D que, aparentemente, foi criada. Assim, tendo em conta os resultados das duas abordagens é possível afirmar que apesar da dupla rugosidade das superfícies não permitir uma adesão inicial das células, devido sobretudo ao comprimento de onda das rugas produzidas, permite a posterior adesão e crescimento da rede neuronal, pelo que, a topografia e a química são favoráveis para que tal aconteça.

Estes resultados parecem indicar que as superfícies rugosas desenvolvidas poderão ser o ponto de partida para a otimização de tubos guia que permitam a regeneração de nervos do sistema nervoso periférico, dado que nestes casos normalmente o que está em causa é permitir a nova conectividade de axónios que foram danificados ou seccionados. Estes resultados indicam também que estas superfícies poderão ser favoráveis para a adesão e proliferação de células com dimensões apropriadas aos comprimentos de onda presentes, nomeadamente fibroblastos ou células endoteliais.

Wrinkled Surfaces: serão as rugas a melhor superfície?

CONCLUSÕES

O objetivo desta dissertação foi o de desenvolver superfícies com diferentes topografias, através da pulverização catódica r.f. magnetrão, que permitiu simultaneamente modificar a química da superfície através da deposição de filmes finos de carbono e poliamida 6,6. Do trabalho realizado as principais conclusões a retirar são:

- a técnica de pulverização catódica permite desenvolver superfícies rugosas como resultado das variações de temperatura a que o substrato polimérico está sujeito e da diferença entre os coeficientes de dilatação linear do substrato e do filme fino depositado;
- a utilização do PDMS permitir desenvolver uma topografia com dupla rugosidade, à escala nanométrica e micrométrica;
- os filmes finos de carbono e poliamida não apresentam ordem estrutural e incorporam elementos ou ligações que não estavam presentes nos alvos que lhes deram origem;
- os filmes finos de carbono são do tipo amorfo com predominância de ligações químicas sp^2 características das ligações C=C aromática e os filmes de poliamida apresentam maior predominância das ligações C-N do que N-H o que lhes confere um potencial zeta mais negativo do que o esperado;
- as superfícies com filmes de carbono e poliamida não formam halo de inibição quando em contacto com *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E.coli* e *S. aureus*; pela análise das superfícies em SEM observa-se alguma adesão bacteriana sendo esta mais evidente nas topografias com microrrugosidade, no caso do *B. subtilis* e da *P. aeruginosa*, e nas topografias com nanorrugosidade, no caso da *S. aureus* e *E.coli*;
- para os comprimentos de onda testados, as superfícies com microrrugosidade não favorecem a adesão de células do córtex de embrião de rato. No caso das superfícies com nanorrugosidade ocorre adesão, proliferação e a diferenciação celular, sendo os resultados mais favoráveis nas superfícies com filmes de carbono;
- quando os filmes finos de carbono depositados sobre PDMS são colocados em contacto com uma rede neuronal já desenvolvida, os axónios da mesma migram para

a superfície e continuam a desenvolver a rede neuronal, o que indica que a química e a topografia da superfície são favoráveis para esse efeito.

Trabalhos Futuros

O trabalho futuro deve tentar selecionar condições de deposição que permitam desenvolver topografias com comprimentos de onda muito superiores aqueles estudados nesta dissertação, para que seja possível que células de grandes dimensões, como é o caso dos neurónios, possam aderir e orientar-se segundo a topografia. Por outro lado, podem ser testadas superfícies com comprimento de onda da microrrugosidade, semelhantes às desenvolvidas neste trabalho, com outro tipo de células cuja morfologia seja mais adequada à topografia desenvolvida, como, por exemplo, fibroblastos ou células endoteliais.

Uma vez que os filmes de carbono apresentam uma maior predominância de ligações C=C em anel, seria interessante avaliar se estas apresentam condutividade elétrica para estimular o crescimento dos neurónios que aderem à superfície.

No caso dos testes *in vitro* com as células procariotas seria uma mais valia realizar os testes em meio líquido para avaliar a verdadeira atividade bacteriana das superfícies e ainda realizar testes na presença de radiação visível e ultravioleta, uma vez que, tanto os filmes de carbono como o filme de poliamida apresentam absorção na gama de comprimentos de onda entre os 280 – 700 nm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Vogel, V., Sheetz, M, «Local force and geometry sensing regulate cell functions», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, n. 4, pp. 265–275, 2006.
- [2] Alves, N. M., Pashkuleva, I., Reis, R. L., «Controlling cell behavior through the design of polymer surfaces», *Small*, vol. 6, n. 20, pp. 2208–2220, 2010.
- [3] Sands, R. W., Mooney, D. J, «Polymers to direct cell fate by controlling the microenvironment», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 18, n. 5, pp. 448–453, 2007.
- [4] Li, Y., Huang, G., Zhang, X., Wang, L., Du, Y., Lu, T. J., Xu, F., «Engineering cell alignment in vitro», *Biotechnology Advances*, vol. 32, n. 2, pp. 347–365, 2014.
- [5] Orlando, P, «Estudo, in vivo, de uma hidroxiapatite de arquitetura otimizada», Universidade de Coimbra, 2009.
- [6] Anselme, K., Ploux, L., Ponche, A, «Cell/Material Interfaces: Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion», *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 24, n. 5, pp. 831–852, 2010.
- [7] Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I., Percy, M. J., «Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review», *Tissue Engineering*, vol. 11, n. 1–2, pp. 1–18, 2005.
- [8] Cretel, E., Pierres, A., Benoliel, A.-M. & Bongrand, P., «How Cells Feel Their Environment: A Focus on Early Dynamic Events», *Cellular and Molecular Bioengineering*, vol. 1, n. 1, pp. 5–14, 2008.
- [9] Roach, P., Parker, T., Gadegaard, N. , Alexander, M. R., «Surface strategies for control of neuronal cell adhesion : A review», *Surface Science Reports*, vol. 65, n. 6, pp. 145–173, 2010.
- [10] Thevenot, P., Hu, W., Tang, L., «Surface chemistry influences implant biocompatibility.», *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 8, n. 4, pp. 270–80, 2008.
- [11] Chang, H.-I., Wang, Y., «Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds», em *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells*

- and *Biomaterials*, D. Eberli, Ed. InTech, 2011, pp. 569–588.
- [12] Xu, L. C., Siedlecki, C. A., «Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces», *Biomaterials*, vol. 28, n. 22, pp. 3273–3283, 2007.
- [13] Dechene, J. M., «Surface Modifications of Poly (dimethylsiloxane) for Biological Application of Microfluidic Devices», 2010.
- [14] Schmidt, D. R., Waldeck, H., Kao, W. J., «Protein adsorption to biomaterials», em *Biological Interactions on materials surfaces*, D. Puleo e R. Bizios, Eds. Springer US, 2009, pp. 1–18.
- [15] Barrias, C. C., Martins, M. C. L., Almeida-Porada, G., Barbosa, M. A., Granja, P. L., «The correlation between the adsorption of adhesive proteins and cell behaviour on hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers», *Biomaterials*, vol. 30, n. 3, pp. 307–316, 2009.
- [16] Simitzi, C., Ranella, A., Stratakis, E., «Acta Biomaterialia Controlling the morphology and outgrowth of nerve and neuroglial cells: The effect of surface topography», *Acta Biomaterialia*, 2017.
- [17] Weiss, P., Hiscoe, H. B., «Experiments on the mechanism of nerve growth», *The journal of experimental zoology*, vol. 107, pp. 315–395, 1948.
- [18] Nguyen, A. T., Sathe, S. R., Yim, E. K. F., «From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance», *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 28, n. 18, p. 183001, 2016.
- [19] Nikkhah, M., Edalat, F., Manoucheri, S., Khademhosseini, A., «Engineering microscale topographies to control the cell– substrate interface», *Biomaterials*, vol. 33, n. 21, pp. 5230–5246, 2012.
- [20] Metavarayuth, K., Sitasuwan, P., Zhao, X., Lin, Y., Wang, Q., «In fl uence of Surface Topographical Cues on the Di ff erentiation of Mesenchymal Stem Cells in Vitro», 2015.
- [21] Zinger, O., Anselme, K., Habersetzer, P., Landolt, D., «Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography», *Biomaterials*, vol. 25, n. 14, pp. 2695–2711, 2004.
- [22] Fu, G., Soboyejo, W., «Cell/surface interactions of human osteo-sarcoma (HOS) cells and micro-patterned polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces», *Materials Science and Engineering C*, vol. 29, n. 6, pp. 2011–2018, 2009.

-
- [23] Hu, J., Hardy, C., Chen, C., Yang, S., Voloshin, A. S., Liu, Y., «Enhanced Cell Adhesion and Alignment on Micro-Wavy Patterned Surfaces», vol. 9, n. 8, pp. 2–9, 2014.
- [24] Rodríguez-Hernández, J., «Wrinkled interfaces: Taking advantage of surface instabilities to pattern polymer surfaces», *Progress in Polymer Science*, vol. 42, n. July 2014, pp. 1–41, 2015.
- [25] Li, B., Cao, Y.-P., Feng, X.-Q., Gao, H., «Mechanics of morphological instabilities and surface wrinkling in soft materials: a review», *Soft Matter*, vol. 8, n. 21, p. 5728, 2012.
- [26] Matsuo, E. S., Tanaka, T., «Patterns in shrinking gels», *Nature*, vol. 358, n. 6386, pp. 482–485, 1992.
- [27] Yang, S., Khare, K., Lin, P. C., «Harnessing surface wrinkle patterns in soft matter», *Advanced Functional Materials*, vol. 20, n. 16, pp. 2550–2564, 2010.
- [28] Li, Y., Peterson, J. J., Jhaveri, S. B., Carter, K. R., «Patterned polymer films via reactive silane infusion-induced wrinkling», *Langmuir*, vol. 29, n. 14, pp. 4632–4639, 2013.
- [29] Vandeparre, H., Damman, P., «Wrinkling of stimuloresponsive surfaces: Mechanical instability coupled to diffusion», *Physical Review Letters*, vol. 101, n. 12, pp. 1–4, 2008.
- [30] Yu, C., Jiang, H., «Forming wrinkled stiff films on polymeric substrates at room temperature for stretchable interconnects applications», *Thin Solid Films*, vol. 519, n. 2, pp. 818–822, 2010.
- [31] Moon, M. W., Vaziri, A., «Surface modification of polymers using a multi-step plasma treatment», *Scripta Materialia*, vol. 60, n. 1, pp. 44–47, 2009.
- [32] Huang, Y., Yin, Z., Xiong, Y., «Thermomechanical analysis of thin films on temperature-dependent elastomeric substrates in flexible heterogeneous electronics», *Thin Solid Films*, vol. 518, n. 6, pp. 1698–1702, 2010.
- [33] Wang, R., Long, Y., Zhu, T., Guo, J., Cai, C., Zhao, N., Xu, J., «Fabrication of oriented wrinkles on polydopamine/polystyrene bilayer films», *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 498, pp. 123–127, 2017.
- [34] Cavaleiro, A., Vieira, M. T., «Engenharia de superfícies e degradação e proteção de superfícies», Coimbra, 1995.
-

- [35] Serrano, J. R., Xu, Q., Cahill, D. G., «Stress-induced wrinkling of sputtered SiO₂ films on polymethylmethacrylate», *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 24, n. 2, pp. 324–327, 2006.
- [36] Casper, M. D., Gözen, A. Ö., Dickey, M. D., Genzer, J., Maria, J.-P., «Surface wrinkling by chemical modification of poly(dimethylsiloxane)-based networks during sputtering», *Soft Matter*, vol. 9, n. 32, p. 7797, 2013.
- [37] S. H. University, «Infinite Focus Microscope (IFM)». Disponível em: <https://www.shu.ac.uk/research/specialisms/materials-and-engineering-research-institute/facilities/infinite-focus-microscope>. [Acedido: 13-Jun-2017].
- [38] nanoScience Instruments, «Atomic Force Microscopy». Disponível em: <http://www.nanoscience.com/technology/afm-technology/>. [Acedido: 13-Jun-2017].
- [39] Tran, P. A., Webster, T. J., «Understanding the wetting properties of nanostructured selenium coatings: The role of nanostructured surface roughness and air-pocket formation», *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 2001–2009, 2013.
- [40] Malvern instruments, «Zetasizer Nano Series User Manual», 2004.
- [41] Piedade, A. P., «A Pulverização Catódica e os Biomateriais», Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2001.
- [42] «Polydimethylsiloxane (PDMS)», *Cidra Precision Services*. Disponível em: <http://www.cidraprecisionservices.com/life-sciences-materials-pdms.html>. [Acedido: 19-Jul-2017].
- [43] Marques, F. C., Lacerda, R. G., Champi, A., Stolojan, V., Cox, D. C., Silva, S. R. P., «Thermal expansion coefficient of hydrogenated amorphous carbon», *Applied Physics Letters*, vol. 83, n. 15, pp. 3099–3101, 2003.
- [44] Martinez-Martinez, D., Schenkel, M., Pei, Y. T., De Hosson, J. T. M., «Microstructural and frictional control of diamond-like carbon films deposited on acrylic rubber by plasma assisted chemical vapor deposition», *Thin Solid Films*, vol. 519, n. 7, pp. 2213–2217, 2011.
- [45] Gadelmawla, E. S., Koura, M. M., Maksoud, T. M. A., Elewa, I. M., Soliman, H. H., «Roughness Parameters», *Jornal of Materials Processing Tecnology*, vol. 123, pp. 133–145, 2014.
- [46] Ren, Z., Lan, Y., Wang, Y., «Introduction to Carbon», em *Aligned Carbon*

- Nanotubes: Physics, concepts, fabrication and devices*, 1.^a ed., Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 300.
- [47] Boundless, «Allotropes of Carbon», 2016. Disponível em: <https://www.boundless.com/chemistry/textbooks/boundless-chemistry-textbook/nonmetallic-elements-21/carbon-150/allotropes-of-carbon-582-3569/>. [Acedido: 16-Jun-2017].
- [48] Chemistry LibreTexts, «Infrared Spectroscopy Absorption Table», 2014. Disponível em: https://chem.libretexts.org/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table. [Acedido: 26-Jun-2017].
- [49] N. Glagovich, «IR Absorptions for Representative Functional Groups», *Department of Chemistry and Biochemistry*, 2001. Disponível em: http://www.instruction.greenriver.edu/kmarr/Chem_162/Chem162_Labs/Interpreting_IR_Spectra/IR_Absorptions_for_Functional_Groups.htm.
- [50] Chu, P. K., Li, L., «Characterization of amorphous and nanocrystalline carbon films», *Materials Chemistry and Physics*, vol. 96, n. 2–3, pp. 253–277, 2006.
- [51] Mahdi, H. A., «An FTIR Study of Characterization of Neat and UV Stabilized Nylon 6,6 Polymer Films», *Journal For Pure And Applied Science*, vol. 24, n. 1, pp. 86–90, 2011.
- [52] Lee, K. H., Kim, K. W., Pesapane, A., Kim, H. Y., Rabolt, J. F., «Polarized FT-IR study of macroscopically oriented electrospun nylon-6 nanofibers», *Macromolecules*, vol. 41, n. 4, pp. 1494–1498, 2008.
- [53] Navarro-Pardo, F., Martinez- Barrera, G., Martinez - Hernández, A. L., Castano, V. M., Rivera-Armenta, J. L., Medellín-Rodríguez, F., Velasco-Santos, C., «Effects on the thermo-mechanical and crystallinity properties of nylon 6,6 electrospun fibres reinforced with one dimensional (1D) and two dimensional (2D) carbon», *Materials*, vol. 6, n. 8, pp. 3494–3513, 2013.
- [54] Ting, T. M., Nasef, M. M., Hashim, K. «Modification of nylon-6 fibres by radiation-induced graft polymerisation of vinylbenzyl chloride», *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 109, pp. 54–62, 2015.
- [55] Hodkiewicz, J., Scientific, T. F., «Characterizing Carbon Materials with Raman Spectroscopy», *Progress in Materials Science*, vol. 50, pp. 929–961, 2005.

- [56] Childres, I., Jauregui, L. A., Park, W., Cao, H., Chen, Y. P., «Raman Spectroscopy of Graphene and Related Materials», em *New Developments in Photon and Materials Research*, J. I. Jang, Ed. Nova Science Publishers, 2013, pp. 1–20.
- [57] Hu, Y. H., «Simulations of aberration-corrected high-resolution transmission electron microscope images for carbyne chains», *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, n. 41, pp. 17751–17754, 2009.
- [58] Casari, C. S., Bassi, A. L., Ravagnan, L., Siviero, F., Lenardi, C., Piseri, P., Bongiorno, G., Bottani, C. E., Milani, P., «Chemical and thermal stability of carbyne-like structures in cluster-assembled carbon films», *Physical Review B*, vol. 69, n. 7, p. 75422, 2004.
- [59] Vogler, E., «Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces.», *Advances in colloid and interface science*, vol. 74, pp. 69–117, 1998.
- [60] Śliwińska-Bartkowiak, M., Sterczyńska, A., Long, Y., Gubbins, K. E., «Influence of microroughness on the wetting properties of nano-porous silica matrices», *Molecular Physics*, vol. 112, n. 17, pp. 2365–2371, 2014.
- [61] Salopek, B., Krasic, D., Filipovic, S., «Measurement and application of zeta-potential», *Rudarsko-geolosko-naftni zbornik*, vol. 4, pp. 147–151, 1992.
- [62] Song, F., Koo, H., Ren, D., «Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation», *Journal of Dental Research*, vol. 94, n. 8, pp. 1027–1034, 2015.
- [63] Hegab, H. M., Elmekawy, A., Zou, L., Mulcahy, D., Saint, C. P., Ginic-Markovic, M., «The controversial antibacterial activity of graphene-based materials», *Carbon*, vol. 105, pp. 362–376, 2016.
- [64] Kargar, M., Wang, J., Nain, A. S., Behkam, B., «Controlling bacterial adhesion to surfaces using topographical cues: a study of the interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with nanofiber-textured surfaces», *Soft Matter*, vol. 8, n. 40, p. 10254, 2012.
- [65] Yoda, I., Koseli, H., Tomita, M., Shida, T., Horiuchi, H., Sakoda, H., Osaki, M., «Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion», *BMC Microbiology*, vol. 14, n. 1, p. 234, 2014.
- [66] Lu, N., Zhang, W., Weng, Y., Chen, X., Cheng, Y., Zhou, P., «Fabrication of PDMS surfaces with micro patterns and the effect of pattern sizes on bacteria adhesion», *Food Control*, vol. 68, pp. 344–351, 2016.

- [67] Epstein, A. K., Hong, D., Kim, P., Aizenberg, J., «Biofilm attachment reduction on bioinspired, dynamic, micro-wrinkling surfaces», *New Journal of Physics*, vol. 15, pp. 1–13, 2013.
- [68] Li, H. L., Zhang, H., Huang, H., Liu, Z. Q., Li, Y. B., Yu, H., An, Y. H., «The Effect of Amino Density on the Attachment , Migration , and Differentiation of Rat Neural Stem Cells In Vitro», *Molecules and Cells*, vol. 35, n. 5, pp. 436–443, 2013.
- [69] Medina Benavente, J. J., Mogami, H., Sakurai, T., Sawada, K., «Evaluation of silicon nitride as a substrate for culture of PC12 cells: An interfacial model for functional studies in neurons», *PLOS ONE*, vol. 9, n. 2, pp. 1–13, 2014.

Wrinkled Surfaces: serão as rugas a melhor superfície?

APÊNDICE A

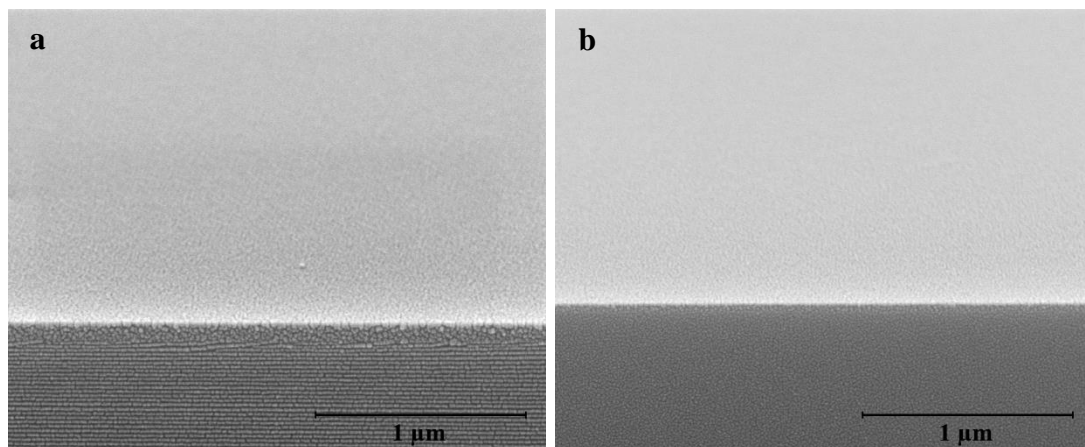


Figura A.1 Micrografias da secção transversal do filme W4 (a) e W6 (b) depositado sobre silício

Wrinkled Surfaces: serão as rugas a melhor superfície?

APÊNDICE B

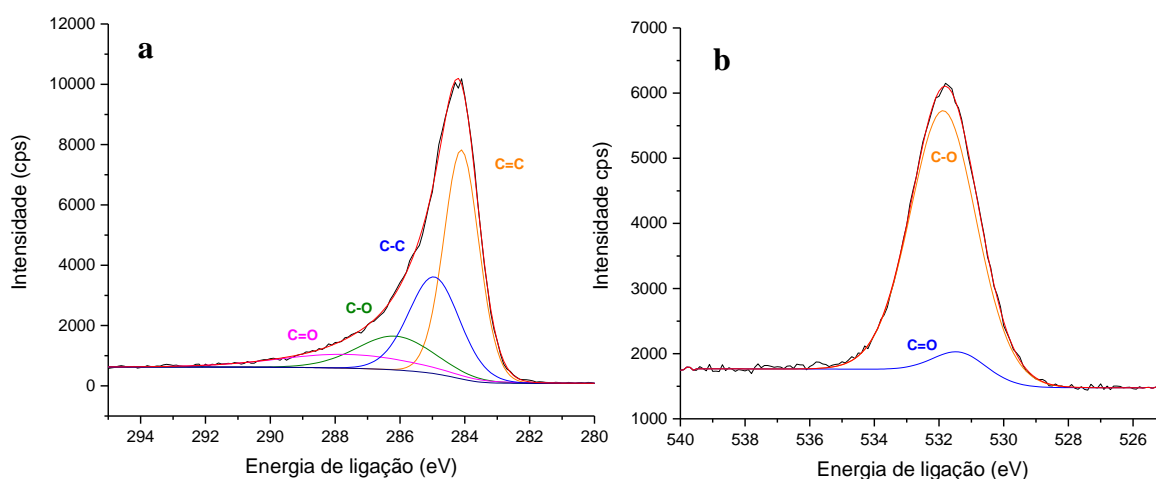


Figura B.1 Desconvolução do pico de carbono (a) e do pico de oxigênio (b) do filme W4.

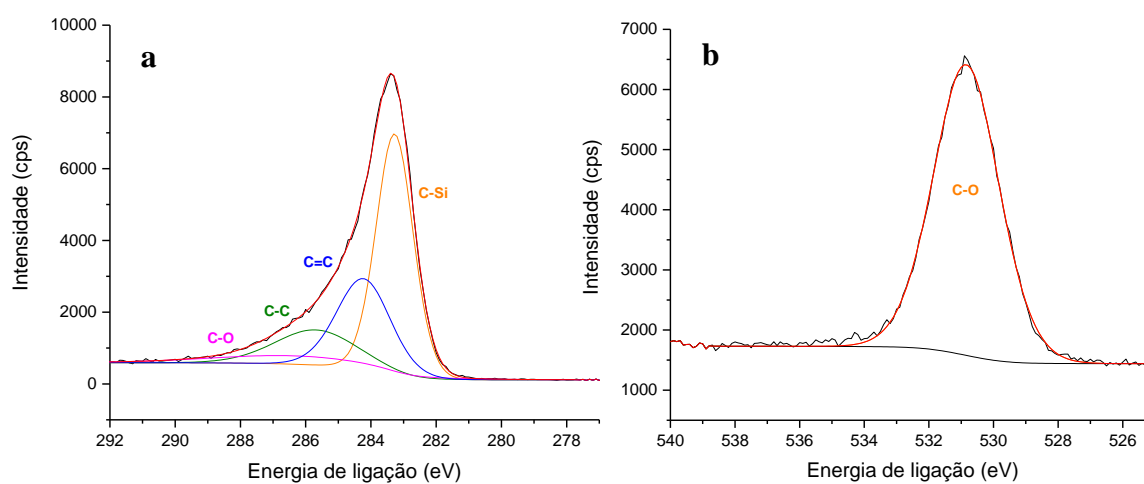


Figura B.2 Desconvolução do pico de carbono (a) e de oxigênio(b) do filme W6.

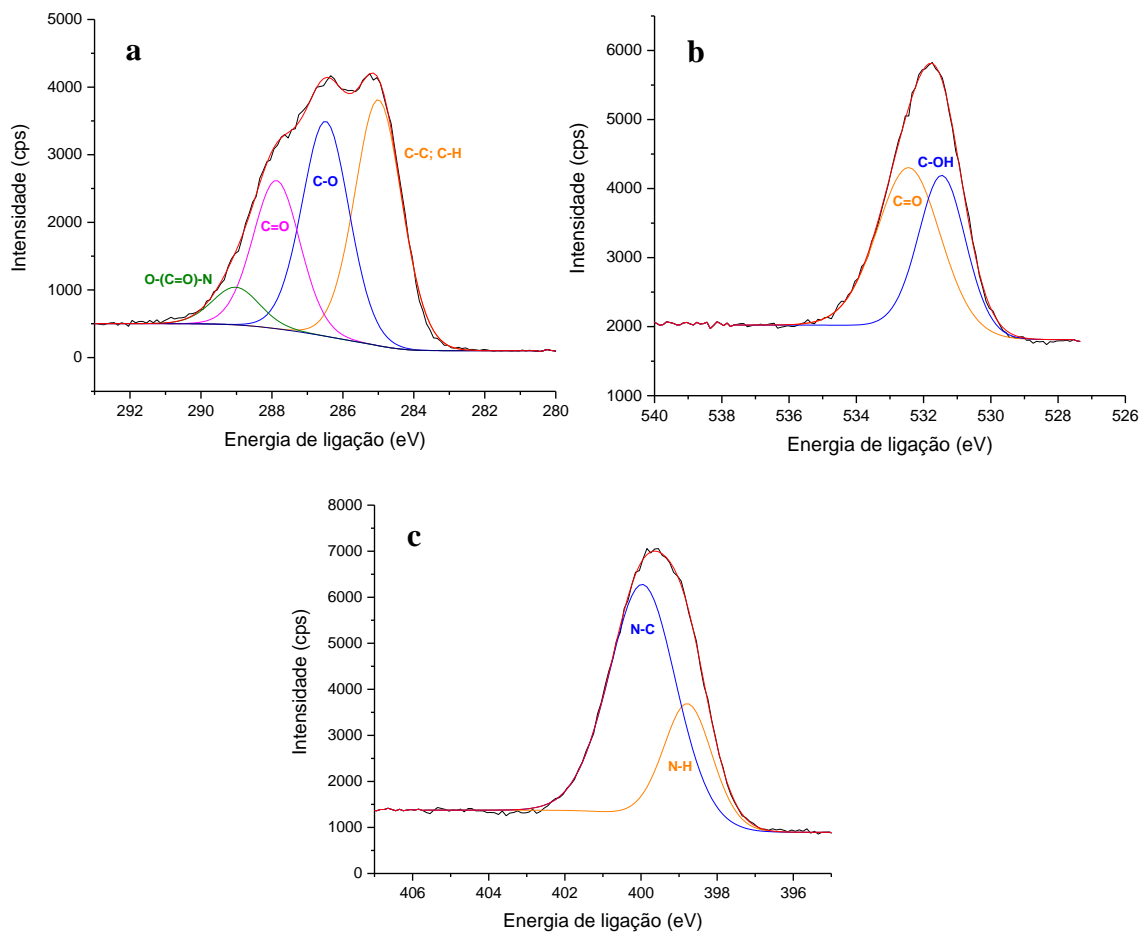


Figura B.3 Desconvolução do pico de carbono (a) e de oxigênio(b) e azoto (c) do filme N1.