



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA MECÂNICA

Modificação de Superfícies para Cultura de Células Neurais

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de
Materiais na Especialidade de Biomateriais

Autor

Cátia Sofia Claro Gomes Veneza

Orientadora

Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade

Júri

Presidente	Professora Doutora Maria Teresa Freire Vieira Professora Catedrática da Universidade de Coimbra Professor Doutor José Carlos Magalhães Duque da Fonseca Professor Auxiliar da Universidade do Porto
Vogais	Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade Professora Auxiliar da Universidade de Coimbra

Coimbra, julho, 2014

“Science can amuse and fascinate us all, but it is Engineering that
changes the world”

Isaac Asimov

Agradecimentos

Dedico um especial agradecimento à Professora Doutora Ana Paula Piedade pela sua orientação e por todos os conhecimentos que me incutiu ao longo deste trabalho, bem como pela sua disponibilidade, dedicação e profissionalismo.

Um profundo agradecimento à Professora Doutora Maria Teresa Vieira pela oportunidade concedida para a realização desta fase do meu percurso académico, e consequentemente do presente trabalho, com todos os seus conhecimentos e ampla disponibilidade dos recursos necessários à realização do mesmo.

Um agradecimento ao Professor Doutor Carlos Jorge Duarte e ao mestre 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 minha família por serem sempre o meu porto de abrigo que acolhe, protege, ensina e fortalece, por me terem concedido as condições necessárias para a conclusão do meu percurso académico e principalmente por acreditarem em mim e nas minhas capacidades.

Ao meu namorado pela paciência e compreensão, pelo saber acarinhar e incentivar, pelo aconchego e pelo amor que me fortalece e ajuda a superar todas as etapas da minha vida.

Aos amigos pela compreensão, amizade e incentivo constantes durante todo o meu percurso académico, e por acreditarem em mim.

Aos colegas de mestrado e membros do CEMUC pela partilha de conhecimentos, interesse e apoio demonstrados e particularmente pelas amizades que se desenvolveram ao longo deste trabalho.

A todos, o meu MUITO OBRIGADA.

Resumo

A procura pela compreensão do ser humano levou a desenvolvimentos científicos e tecnológicos nas mais variadas áreas de investigação. O estudo do sistema nervoso humano e dos seus constituintes é um dos maiores desafios da história da humanidade, sendo importante para áreas tais como o desenvolvimento de fármacos e sistemas de tratamento de doenças, reparação de nervos ineficazes por trauma ou doença ou para a inteligência artificial e engenharia computacional, entre outras.

A extensa complexidade do sistema nervoso dificulta a sua completa compreensão, pelo que se torna necessário o desenvolvimento de métodos e normas para este estudo. A cultura de células neuronais começou por ser um grande avanço científico para a compreensão da biologia e fisiologia das células neuronais, estendendo-se, em seguida, como suporte ao estudo da comunicação entre células, ou seja, como é que a formação e transmissão de sinapses ocorre numa complexa rede neuronal. Neste âmbito, a investigação centrada em superfícies de referência, que conjuguem a melhoria na adesão e diferenciação com baixas taxas de mortalidade celulares, tem sido alvo de investigação nas últimas décadas.

O presente trabalho procura desenvolver e estudar superfícies de material polimérico que possam eficazmente modificar as lamelas de vidro tipicamente usadas na cultura *in vitro* deste tipo de células.

A pulverização catódica, modo r.f magnetron, foi a técnica usada para a modificação das lamelas de vidro, a partir de um alvo de poliamida 6,6 usando atmosfera inerte e reativa. Numa primeira fase procurou-se compreender as modificações produzidas nos filmes, em função da variação de alguns dos parâmetros de deposição, nomeadamente da composição química do gás de descarga e da atmosfera de arrefecimento. Após caracterização abiótica de todas as superfícies algumas foram selecionadas para os testes *in vitro* com células do córtex de embrião de rato.

As superfícies desenvolvidas neste trabalho mostraram que, essencialmente, a composição química e a carga superficial são afetados pela variação dos parâmetros de deposição utilizados, ainda que a molhabilidade, por exemplo, não sofra variações consideráveis.

Os testes *in vitro* mostraram que a superfície que, mediante a combinação de parâmetros de deposição, apresentava uma carga superficial positiva permitiu taxas de adesão e proliferação celulares semelhantes às observadas nas superfícies revestidas com poli-L-lisina, utilizadas como controlo.

Palavras-chave: Pulverização Catódica, Filmes finos, Poliamida 6,6, Cultura de Células Neuronais, poli-L-lisina, Adesão e Proliferação Celulares.

Abstract

The research aiming at understanding the human life has led to developments of science and technology in several areas of research. The study of the human nervous system and its constituent comprises one of the greatest challenges in human history and is important in areas such as drug development and disease treatment systems, repair of nerves due to trauma or disease or for artificial intelligence and computer engineering, among others.

The complexity of this extensive system hinders its complete understanding, therefore it is necessary to develop methods and standards for this study. The culture of neuronal cells began as a great scientific advance in understanding the biology and physiology of neuronal cells, extending then to the communication between cells, in order to observe and comprehend the formation and transmission of synapses in a complex neuronal network. In this area, the demand for reference materials, which combine the improvement of adhesion and differentiation with low rates of cell death, is an area under investigation for decades. This work seeks to develop surfaces of polymeric material deposited on glass slides, typically used in cell culture, and evaluate the behavior of neuronal cells on the modified surfaces.

Sputtering, r.f. magnetron, was the technique used for the modification of glass slides, from a nylon 6.6 target, using both reactive and inert atmosphere. In a first stage the correlation of the surface properties with the variation of some deposition parameters, such as the chemical composition of discharge gas and cooling atmosphere, were studied. After the abiotic characterization of all some surfaces some were selected for *in vitro* testing with cortex cells of rat embryo.

The surfaces developed in this work showed that, particularly the chemical composition and surface charge are affected by varying the deposition parameters used, although wettability, for example, did not present significant variations.

In vitro tests showed that the thin film that, by combining the deposition parameters, presented a positive surface charge allowed yields of adhesion and cellular proliferation similar to those observed on surfaces with poli-L-lysine used as a control.

Keywords R.F. Magnetron Sputtering, Thin Films, Polyamide 6.6, Neuronal Cell Culture, Poly-L-lysine, Cell adhesion and proliferation.

Índice

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Simbologia e Siglas	ix
Simbologia.....	ix
Siglas	x
INTRODUÇÃO.....	1
1. Revisão Bibliográfica	3
1.1. Cultura de Células Neurais	4
1.2. Pulverização Catódica de Poliamida.....	7
2. Materiais e Métodos	12
2.1. Técnica de deposição de filmes finos - Pulverização Catódica	12
2.2. Técnicas de Caracterização.....	13
2.2.1. Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier	13
2.2.2. Espectroscopia de Fotoeletrão X	14
2.2.3. Difração de Raios X	14
2.2.4. Microscopia Eletrónica de Transmissão.....	15
2.2.5. Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	15
2.2.6. Microscopia de Força Atómica.....	16
2.2.7. Medição de Ângulos de Contacto.....	17
2.2.8. Potencial Eletrocinético.....	19
2.2.9. Testes <i>in vitro</i>	20
3. Apresentação e Discussão de Resultados	22
3.1. Taxa de deposição e composição química	22
3.2. Grupos químicos funcionais	26
3.3. Análise Estrutural.....	29
3.4. Morfologia/Topografia	30
3.5. Molhabilidade	34
3.5.1. Ângulo de Contacto estático, θ	35
3.5.2. Energia Superficial, γ_s	36
3.6. Potencial Eletrocinético	39
3.7. Testes <i>in vitro</i>	40
Conclusões.....	46
Referências Bibliográficas.....	47
Apêndices	A
APÊNDICE A - XPS	A1
APÊNDICE B - FTIR.....	A8
APÊNDICE C - SEM	A12
APÊNDICE D - AFM.....	A16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura química da poli-L-lisina, adaptado de [26].....	5
Figura 1.2. Esquema representativo de ligações entre PLL/vidro e PLL/células , adaptado [27,28].	6
Figura 1.3. Polimerização, por condensação, da poliamida 6,6, adaptado de [37]	7
Figura 2.1. Representação esquemática da medição do ângulo de contacto com uma superfície e das tensões de interface existentes, adaptado de [42]	17
Figura 3.1. Exemplo de avaliação da espessura por AFM.	22
Figura 3.2. Desconvolução dos espectros C1s das superfícies PA4 (a) e PA6 (b).	24
Figura 3.3. Espectros FTIR do alvo de PA 6,6 (a) e dos filmes PA6 (b) e PA12 (c).	26
Figura 3.4. Difractogramas do alvo de PA 6,6 a) e do filme fino PA12 b).	29
Figura 3.5. Imagem de campo claro de TEM do filme fino PA4.	30
Figura 3.6. Micrografias da superfície dos filmes finos PA4 a) e PA13 b).	31
Figura 3.7. Micrografias da secção transversal dos filmes finos da superfície PA4 a) e PA13 b).	31
Figura 3.8. Imagem topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA4.	32
Figura 3.9. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA10.	32
Figura 3.10. Representação esquemática da influência da rugosidade na molhabilidade de acordo com Wenzel e Cassie-Baxter.	35
Figura 3.11. Potencial zeta do alvo, das superfícies dos filmes finos e de PLL avaliados em KCl 1 mM, pH 7,0.	39
Figura 3.12. Micrografias da superfície PA4 após 14 dias de testes <i>in vitro</i>	41
Figura 3.13. Micrografias da superfície PA5 após 14 dias de testes <i>in vitro</i>	41
Figura 3.14. Micrografias da superfície PA11 após 14 dias de testes <i>in vitro</i>	42
Figura 3.15. Micrografias da superfície PA6 após 14 dias de testes <i>in vitro</i>	42
Figura 3.16. Microscopia de fluorescência das superfícies PA4 a), PA5 b) e PA11c) após 14 dias de testes <i>in vitro</i>	43
Figura 3.17. Microscopia de fluorescência de superfície modificada com PLL após 14 dias de testes <i>in vitro</i>	44
Figura 3.18. Fotografia digital das superfícies utilizadas nos testes <i>in vitro</i>	44
Figura 3.19. Microscopia óptica da superfície PA6 após 14 dias de testes <i>in vitro</i>	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Condições de deposição e designação dos filmes finos.....	13
Tabela 3.1. Composição química, espessura e taxa de deposição dos filmes finos.	23
Tabela 3.2. Identificação das ligações presentes em todos os revestimentos, resultantes da desconvolução dos espectros C1s, N1s e O1s.....	25
Tabela 3.3. Identificação de bandas no espectro de infravermelho da Poliamida 6,6.....	27
Tabela 3.4. Identificação de bandas no espectro de infravermelho de filmes finos de PA, referidos na literatura.....	27
Tabela 3.5. Identificação de novas bandas nos espectros FTIR dos revestimentos	28
Tabela 3.6. Parâmetros de rugosidade superficial avaliados por AFM.	33
Tabela 3.7. Tensão superficial e respetivas componentes polar e dispersiva dos líquidos usados[69].	34
Tabela 3.8. Valor médio dos ângulos de contacto e respetivo desvio padrão.	36
Tabela 3.9. Energia livre das superfícies e variação da energia da energia livre de interface.	38

SIMBOLOGIA E SIGLAS

Simbologia

n – número inteiro.

λ – comprimento de onda da radiação incidente.

d - distância entre planos cristalinos.

θ - ângulo de incidência dos raios X.

f_0 – frequência de ressonância.

k - constante de força.

γ_{sv} - tensão da interface sólido–vapor.

γ_{sl} - tensão da interface sólido-liquido.

γ_{lv} - tensão da interface liquido-vapor.

θ - ângulo de contacto.

ζ - .potencial zeta.

$\frac{dl}{dp}$ - declive da curva de valores da corrente em função da pressão.

η - viscosidade do eletrólito.

ε - constante dielétrica do eletrólito.

ε_0 - permitividade em vácuo.

L - comprimento do canal de medição.

A - secção transversal do canal de medição.

θ_w - ângulo de Wenzel (ângulo da superfície isenta de rugosidade).

r - relação entre a área real e a área projetada da superfície.

θ_Y - ângulo medido experimentalmente.

γ_s - energia superficial do filme.

γ_s^d e γ_s^p - componentes dispersiva e polar da energia superficial dos filmes.

γ_L - tensão superficial do líquido.

γ_L^d e γ_L^p - componentes dispersiva e polar da tensão do líquido.

ΔG - variação da energia livre de Gibbs.

Siglas

PLL – poli-L-lisina

MG – Matrigel

FN – fibronectina

PDL – poli-D-lisina

PEI – poli(etilenoimina)

PTFE – poli(tetrafluoretileno)

PBS – Phosphate Buffer Saline

316L – Aço Inoxidável 316L

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy

ATR – Attenuated Total Reflectance

XPS – X-Ray Photoelectron Spectroscopy

XDR – X-Ray Diffraction

TEM – Transmission Electron Microscopy

SEM – Scanning Electron Microscopy

FEG – Field Emission Gun

EDS – Energy Dispersive Spectrometry

AFM – Atomic Force Microscopy

CNC – Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de

Coimbra

HBSS – Solução balanceada de Hank

BSA – Albumina Sérica Bovina

INTRODUÇÃO

As neurociências são uma importante área do conhecimento que tem por base o estudo do sistema nervoso, desde a sua estrutura básica à formação de redes neuronais. O estudo deste sistema é um dos maiores desafios para a comunidade científica devido não só à sua complexidade fisiológica bem como à sensibilidade das células neuronais em ambientes que não o seu meio biológico natural. No entanto, é baseada na cultura de células neuronais *in vitro* que a investigação científica tem possibilitado uma vasta gama de conhecimentos desde a fisiologia das células até às experiências para desenvolvimento de inteligência artificial. Contudo, os testes *in vitro* só permitem extrapolar os resultados quando se consegue criar um ambiente idêntico ao do meio biológico onde estas células proliferam.

A modificação de lamelas de vidro com solução aquosa de poli-L-lisina (PLL) tem sido uma das metodologias mais utilizadas na cultura de células neuronais. No entanto, este não é um método consensual pois não consegue manter permanentemente as suas propriedades, pelo que se torna necessária a investigação de metodologias alternativas. Neste âmbito, a ciência dos materiais pode e deve criar interligação com as neurociências, por exemplo, na procura de materiais que originem uma superfície favorável à adesão, diferenciação e proliferação celulares, mas cujas propriedades/características se mantenham de modo permanente.

A presente dissertação tem como objetivo a utilização da técnica de pulverização catódica para a modificação da superfície de lamelas de vidro com filmes finos de poliamida 6,6 e investigar a capacidade das novas superfícies apresentarem um conjunto de propriedades/características favoráveis à cultura de células neuronais. A variação dos parâmetros de deposição originou superfícies distintas que foram caracterizadas sobretudo no que concerne a composição química, a topografia, a molhabilidade e a carga superficial. Após caracterização, as superfícies escolhidas foram usadas em testes *in vitro* com células neuronais de córtex de embrião de rato e as superfícies novamente caracterizadas por microscopia eletrónica de varrimento e microscopia de fluorescência.

O presente trabalho está organizado em três capítulos em que o primeiro é dedicado ao enquadramento teórico deste trabalho; no segundo é feita uma breve exposição das condições experimentais e técnicas utilizadas e por último, no terceiro capítulo, são apresentados e discutidos os resultados deste estudo.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A procura do ser humano por meios que possibilitem prolongar e incrementar a sua qualidade de vida, tem impulsionado a investigação científica e o desenvolvimento tecnológico. Com efeito, são diversas as áreas do conhecimento que se encontram interligadas, no sentido de desenvolver mais e melhores métodos de estudo de terapêuticas ou substitutos para funções degeneradas ou perdidas.

A ciência dos materiais e as neurociências são duas grandes áreas de investigação que se interligam de modo, por exemplo, a procurar novos materiais que possibilitem a investigação dos mecanismos biológicos característicos das células neuronais.

A investigação das células do sistema nervoso central e periférico tem diferentes objetivos, de entre os quais se destacam:

- a profunda compreensão da biologia e fisiologia celular [1-4];
- o conhecimento sobre a formação de redes neuronais, nas quais as células comunicam entre si através da formação e transmissão de sinapses[4-6];
- o estudo do efeito de fármacos para tratamento de doenças degenerativas como a doença de Alzheimer [2,4,7-9];
- a reparação ou substituição de nervos lesionados ou disfuncionais por doença ou trauma [10-15];
- o estudo de redes neuronais artificiais como modelos para a engenharia de inteligência artificial e engenharia computacional [3,16];
- o desenho, a conceção e a modificação de implantes neuronais para alívio de dores crónicas e dos sintomas de doenças neuro degenerativas, como a doença de Parkinson [16];

A cultura de células *in vitro* é essencial para estes estudos, sendo necessário superfícies que garantam a sobrevivência, a adesão, a diferenciação e a proliferação celulares [3,6,7]. Assim, a investigação sobre materiais biocompatíveis que traduzam um ambiente adequado à sobrevivência celular é, sem dúvida, um excelente exemplo da interface entre as duas áreas do saber - Neurociências e Ciência dos Materiais.

A biocompatibilidade de um biomaterial está relacionada com uma interação harmoniosa do material quando em contacto com tecidos vivos ou fluidos orgânicos, com o mínimo de respostas alérgicas ou inflamatórias, não ocorrendo rejeição do mesmo pelo organismo [17]. No âmbito específico deste trabalho, a biocompatibilidade de superfícies modificadas para cultura celular traduz a capacidade do material ser reconhecido pelas células, de modo a que estas adiram, diferenciem e desempenhem as suas funções como se estivessem no seu ambiente biológico natural, isto é, o sistema nervoso central.

1.1. Cultura de Células Neurais

A cultura de células em superfícies de lamelas de vidro modificadas tem sido objeto de extensa investigação nas últimas décadas [5,12,18]. Na literatura estão descritos diversos métodos e abordagens focados neste assunto. Yi Sun e colaboradores [3] procuraram compreender o efeito de diferentes revestimentos na adesão e morfologia das células neuronais, assim como na formação de redes neuronais. Para tal colocaram células neuronais do hipocampo de rato em superfícies de vidro modificadas, por imersão em soluções, com Matrigel® (MG), fibronectina (FN), poli-L-lisina (PLL), poli-D-lisina (PDL) e poli(etilenoimina) (PEI). Estes investigadores concluíram que a adesão celular é significativamente afetada pela composição química e concentração do material utilizado para a modificação. Com efeito, superfícies revestidas com materiais poliméricos (PEI, PDL e PLL) apresentaram melhores taxas de adesão de células neuronais, em relação a materiais revestidos com proteínas (MG, FN e LN), observando que os melhores resultados ocorreram em substratos revestidos com poli-L-lisina. No que concerne à morfologia celular, os materiais poliméricos levaram ao desenvolvimento de maior número de neurites, e consequentemente redes neuronais mais complexas, no entanto Matrigel® levou ao desenvolvimento de neurites mais longas, o que segundo estes autores, pode acelerar a especificação dos axónios.

A equipa liderada por Hai-Long [13] investigou o efeito da utilização de superfícies com diferentes densidades de grupos amina na adesão, migração e diferenciação celular. Células neuronais foram cultivadas em lamelas de vidro quimicamente modificadas com diferentes concentrações de 3-aminopropil-trietoxissilano com o objetivo de induzir diferentes densidades de grupos amina na superfície do vidro, e

os resultados foram comparados com os observados em superfícies revestidas com poli-L-lisina. Estes autores observaram que tanto as lamelas modificadas com poli-L-lisina como as que possuíam maior densidade de grupos amina apresentaram maior biocompatibilidade e afinidade para a adesão e migração celular. No entanto, uma taxa de diferenciação celular mais significativa foi observada nas superfícies com maior concentração de grupos amina. Estes autores também observaram que a superfície com maior densidade de grupos amina foi a que apresentou valores de ângulo de contacto mais elevados, o que poderá indicar que tal como a composição química e a carga de superfície também o maior ou menor carácter hidrofóbico da superfície pode desempenhar um papel fundamental.

Os exemplos acima descritos são reflexo da falta de concordância relativamente ao melhor tipo de superfície para a cultura de células neuronais. No entanto, e de um modo geral, a literatura refere que:

- a superfície do material em contacto com as células modula fortemente a adesão e mortalidade das mesmas [3,13,14,19];
- propriedades como a carga e composição química de superfície, rugosidade, molhabilidade e interação entre proteínas são fatores determinantes na cultura de células. [2,8,14,18,15];
- grupos amina e carga de superfície positiva são essenciais para o sucesso da cultura de células *in vitro* [13, 21-23];

Além do que transparece das duas investigações acima reportadas, são vários os estudos que fazem referência à poli-L-lisina, como sendo eficiente na cultura de células neuronais, sendo o método de modificação de superfícies de lamelas de vidro mais utilizado em centros de investigação de neurociências. [2,6,8,10,24,25];

A poli-L-lisina (PLL) é um homopolímero natural, constituído por uma sequência de aminoácidos L-lisina, covalentemente ligados entre si, cuja sua estrutura química se encontra na Figura 1.1.

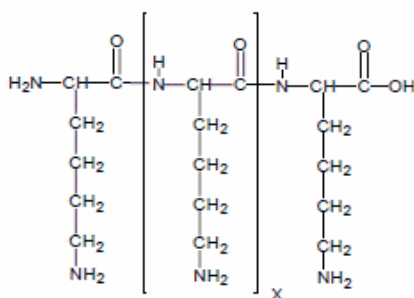


Figura 1.1. Estrutura química da poli-L-lisina, adaptado de [26].

A sua utilização quase generalizada é consequência da excelente biocompatibilidade para com as células neuronais devido à presença de grupos amina conjugada com uma carga superficial positiva [13,23,24]. Muitos autores descrevem a importância da carga positiva deste polímero que, através de forças eletrostáticas, se liga não só aos grupos silanol da lamela de vidro como aos grupos carregados negativamente das células neuronais (Figura 1.2) [2,6,8,13,18,23].

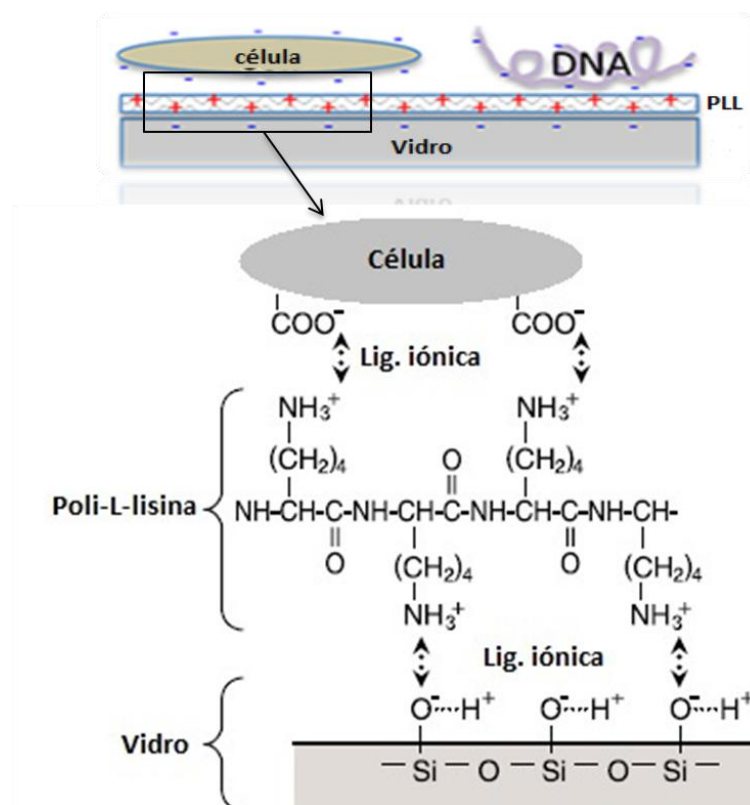


Figura 1.2. Esquema representativo de ligações entre PLL/vidro e PLL/células , adaptado [27,28].

No entanto, dado que estas ligações não são covalentes e considerando que o meio de cultura das células neuronais apresenta uma elevada força iónica, capaz de interferir com as ligações eletrostáticas, a modificação do vidro não é permanente, sendo referido por diversos autores o problema da falta de estabilidade, ao longo do tempo, das propriedades das superfícies modificadas com a poli-L-lisina[6,10,18].

Neste contexto há a necessidade de investigar novos métodos e materiais para o revestimento permanente e reprodutível da superfície de lamelas de vidro para a cultura de células neuronais.

1.2. Pulverização Catódica de Poliamida

Os materiais poliméricos apresentam-se como os materiais de eleição para a modificação de superfícies para culturas de células *in vitro* pois, genericamente, apresentam uma boa interação com o meio biológico aliada a uma composição química que pode ser alterada, fácil processamento e, no geral, baixo custo [2,19].

De entre as várias técnicas disponíveis para a modificação de superfícies a pulverização catódica, especialmente a efetuada a partir de materiais poliméricos, é foco de investigação desde há décadas. Com efeito, a modificação de superfícies por pulverização catódica a partir de alvos de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) é das mais referenciadas na literatura. No entanto, novos requisitos para aplicações específicas, levaram à investigação da utilização desta técnica para outros materiais poliméricos, como é exemplo a poliamida 6,6 [29,30].

Nylon® é a designação genérica de uma família de polímeros sintéticos conhecidos como poliamidas. Sintetizado pela primeira vez em 1930 pela empresa DuPont, [31,32] tornou-se um dos polímeros termoplásticos de engenharia mais utilizados em áreas como a indústria têxtil, automóvel, militar, etc [33]. A poliamida 6,6 resulta da polimerização por condensação de dois compostos químicos, com 6 átomos de C cada, dos quais são exemplo a hexametilenodiamina e o ácido adípico [34], como exemplificado na Figura 1.3.

O interesse industrial por este polímero surge devido às excelentes propriedades que possui, nomeadamente elevadas resistência à tração, rigidez, resistência à abrasão, resistência química e térmica, boa estabilidade dimensional, e boa resistência bacteriana, aliadas ao seu baixo custo e produção nas mais variadas formas [35,36].

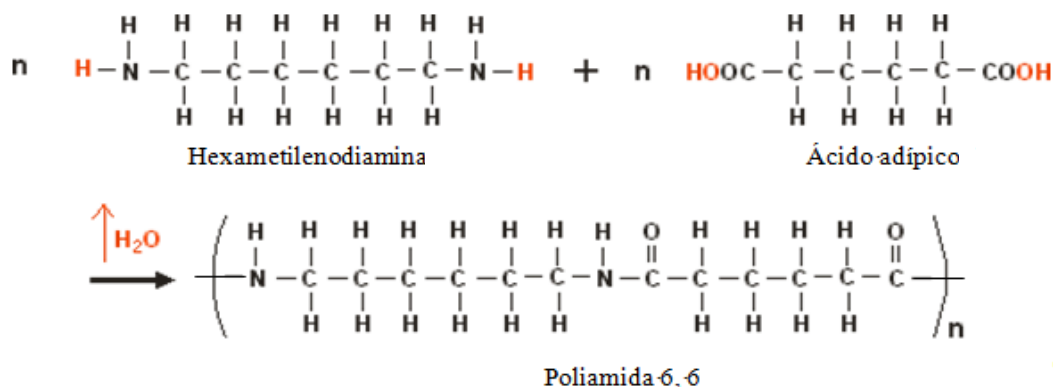


Figura 1.3. Polimerização, por condensação, da poliamida 6,6, adaptado de [37]

No que respeita a área dos biomateriais, o Nylon® é usado essencialmente como suturas dado à sua facilidade de ser processado sob a forma de fibras e que, devido às ligações de hidrogénio intermoleculares, aumentam a resistência mecânica na direção da fibra [38]. A sua utilização como biomaterial não é mais extensa devido ao seu carácter higroscópico que induz a perda de resistência mecânica quando implantado *in vivo*. Com efeito, as moléculas de água atuam como plasticizantes que atacam a região amorfa do polímero [38].

A técnica de pulverização catódica é bastante vantajosa pois permite satisfazer requisitos essenciais para modificação de superfícies, nomeadamente a utilização de uma vasta gama de materiais, a obtenção de materiais não sintetizáveis por vias químicas tradicionais, adaptar os parâmetros de deposição às propriedades/características desejadas e produzir superfícies quimicamente estáveis ao longo do tempo [20,21,29,39,40]. Se ainda se considerar que não ocorre a formação de resíduos tóxicos (tecnologia limpa) e o facto de o filme formado se encontrar esterilizado no final do processo de deposição, a pulverização catódica é, sem dúvida, uma técnica de excelência para a aplicação pretendida neste trabalho.

Vários grupos de investigação procuraram identificar e compreender as condições de deposição que permitem produzir filmes finos, por pulverização catódica r.f magnetrão, a partir de poliamida 6,6, independentemente da aplicação final. Estes avaliaram os efeitos de diferentes parâmetros de deposição, tais como a composição química da atmosfera de deposição, bem como a potência e a pressão de deposição nas propriedades finais dos revestimentos.

O grupo de Jaroslav Kousal [29] procurou mostrar a possibilidade de usar a pulverização catódica r.f magnetrão de um alvo de poliamida 6,6, em diferentes atmosferas gasosas, de modo a formar um filme fino com elevada concentração de grupos amina. No seu trabalho realizaram deposições a partir de um alvo de poliamida 6,6 (diâmetro 80 mm e espessura de 3 mm), a uma pressão de 2 Pa e 60W de potência, sobre silício (Si), vidro e vidro revestido a ouro, tendo usado atmosferas de Ar, N₂ e mistura de ambos. Este estudo concluiu que a composição da atmosfera influencia a taxa de deposição, que aumenta com o aumento da percentagem de azoto. Também a composição química dos revestimentos foi afetada, tendo sido observado que o aumento de azoto levou à formação de espécies -NH_x, com concomitante diminuição do valor dos ângulos de contacto com a água, sem

alterações da rugosidade das superfícies. Este estudo mostrou ainda que, após exposição ao ar, ocorre um aumento da concentração de $-OH$ e O_2 , devido ao vapor de água adsorvido, e a uma diminuição da percentagem de azoto nos filmes.

O. Kylián e colaboradores [39] também investigaram o uso de pulverização catódica r.f magnetron para a produção de filmes finos ricos em aminas primárias, e estudaram a capacidade destes filmes na adsorção de proteínas, como a albumina. Neste estudo usaram um alvo de poliamida 6,6 (diâmetro 80 mm e espessura de 2 mm), a uma pressão de 2 Pa e 40W de potência em atmosferas de Ar, Ar/N₂, Ar/H₂ e N₂/H₂. Mais uma vez ficou demonstrada a relação da taxa de deposição com a composição química do gás usado, sendo a relação a seguinte Ar/N₂>N₂/H₂>Ar>Ar/H₂. Adicionalmente, a composição química dos revestimentos também foi afetada sendo que:

- a utilização de Ar produz filmes com composição química elementar semelhante à da poliamida 6,6;
- a utilização de Ar/H₂ induz a formação de grupos amina, no entanto com densidade superficial inferior às superfícies depositadas apenas em Ar.
- a mistura Ar/N₂ leva a um aumento significativo na concentração em azoto, no entanto, as relações NH₂/N e NH₂/C são de aproximadamente 5%, indicando que apenas uma quantidade limitada de azoto se encontra incorporada no filme sob a forma de aminas primárias;
- a mistura N₂/H₂ apresentou a combinação das vantagens de Ar/H₂ e Ar/N₂, levando à formação de filmes ricos em azoto, com uma provável incorporação de grupos amina de cerca de 20%.

Por último, conseguiram observar que os filmes produzidos são eficientes na adsorção de proteínas, sendo a cinética mais rápida nas superfícies depositadas em N₂/H₂ seguidas pelas depositadas em Ar/N₂, Ar e Ar/H₂.

Tendo como objetivo a utilização de filmes finos de poliamida 6,6 em aplicações biomédicas como a adsorção de biomoléculas ou cultura de células, A. Artemenko e colaboradores [20] decidiram avaliar a estabilidade dos referidos filmes quando em contacto com o ar e em ambientes aquosos, como a H₂O e uma solução salina de tampão fosfato (PBS - do inglês “*phosphate buffer saline*”). Os revestimentos foram preparados por pulverização catódica r.f magnetron de um alvo de poliamida 6,6 (diâmetro 80mm e espessura 2 mm) a uma pressão de 2Pa e 40W de potência. A mistura de gases escolhida

foi Ar, Ar/N₂ e N₂/H₂, e os substratos revestidos foram silício, vidro e vidro revestido a ouro.

Este estudo comparativo permitiu concluir que no que refere à exposição ao ar, todos os filmes sofreram oxidação devido à presença de uma maior densidade relativa de átomos de oxigénio. Quando imersos em meio aquoso as alterações observadas variaram entre as diversas superfícies. No que concerne à dissolução dos filmes, os depositados em atmosfera de Ar e Ar/N₂ apresentam menor perda de espessura, contrariamente aos depositados em N₂/H₂, sendo que estes são também os que apresentam maiores alterações na morfologia superficial após imersão. Os autores justificam este comportamento com o facto de os filmes depositados em atmosfera de N₂/H₂ apresentarem maior concentração de grupos NH₂, que apresentam maior solubilidade.

No que refere ao comportamento de células em superfícies preparadas por pulverização catódica de um alvo de poliamida 6,6, B. Finke e colaboradores [21] procuraram estudar a possibilidade de aplicação destas superfícies na melhoria da adesão de osteoblastos e, conseqüentemente, no incremento da osteointegração. Estes autores usaram um alvo de poliamida 6,6 (80mm de diâmetro de 2mm de espessura), com uma potência de 40 W em atmosfera de N₂/H₂ e os filmes finos foram depositados sobre uma liga de titânio, Ti6-Al4-V. Células osteoblásticas MG-63 foram cultivadas nas superfícies produzidas, em meio de cultura isento de soro, para evidenciar o efeito do revestimento na adesão e diferenciação celulares. Este estudo demonstrou que a modificação do Ti6-Al4V com filmes contendo grupos funcionais carregados positivamente foi suficiente para melhorar, de forma significativa, o contacto celular com a superfície do material, relativamente ao Ti6-Al4V não modificado. No entanto, uma relação direta entre os grupos amina primários da superfície e o incremento no crescimento celular não foi observado, podendo indicar, segundo os autores, que outros grupos químicos funcionais contendo azoto, tais como amidas ácidas ou imidas, possam também ser importantes durante este processo biológico.

Na literatura consultada não se encontrou reportado o estudo do comportamento de células neurais em superfícies revestidas, por pulverização catódica, com filmes finos de poliamida 6,6.

O objetivo da presente dissertação centra-se no desenvolvimento de filmes finos de poliamida 6,6, depositados por pulverização catódica r.f. magnetron,

quimicamente estáveis, com carga superficial positiva e, após caracterização dos mesmos, avaliar o seu desempenho como superfície propícia à cultura *in vitro* de células neuronais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Técnica de deposição de filmes finos - Pulverização Catódica

Os filmes finos foram depositados utilizando o equipamento Edwards Coating System E306A que possui dois geradores de rádio frequência de 13,56MHz, que fornecem uma potência máxima de polarização do alvo e do substrato de 1000W e de 500W, respetivamente.

As deposições foram efetuadas 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 os gases utilizados foram o árgon (Ar) e o azoto (N₂) com 99,999% de pureza e ar atmosférico (ar). As deposições foram efetuadas sobre substratos de silício (Si), aço inoxidável 316L (316L) e lâminas e lamelas de vidro. Antes da inserção na câmara de deposição todos os substratos foram limpos em banho de ultrasons, sucessivamente em acetona e etanol, durante 10 minutos em cada líquido, e em seguida secos em corrente de ar quente. O uso destes substratos é justificado pela exigência de diversas técnicas de caracterização dos filmes finos. Em cada deposição, um dos substratos de silício foi parcialmente mascarado com uma gota de nitreto de boro, de modo a, após destacamento, se avaliar a espessura do filme.

Após a colocação das amostras na câmara, esta foi evacuada até uma pressão última de 10^{-4} Pa, tendo sido iniciado o procedimento de limpeza do alvo e dos substratos com os seguintes parâmetros: pressão de 0,7 Pa, tempo de 600 s, potência da fonte de substratos de 60W e densidade de potência do alvo de poliamida 6,6 de $7,6 \times 10^{-3}$ W.mm⁻². As condições de deposição, bem como as designações das superfícies, estão sumariadas na Tabela 2.1

Tabela 2.1. Condições de deposição e designação dos filmes finos.

Designação	Parâmetros fixos	Parâmetros variáveis	
		Atmosfera	Arrefecimento
PA4	Pressão total: 0,7 Pa	Ar	1°C.min ⁻¹ , vácuo
PA5		Ar+N ₂ (0,6+0,1Pa)	1°C.min ⁻¹ , vácuo
PA6		N ₂	1°C.min ⁻¹ , vácuo
PA7	Tempo: 3600 s	Ar + N ₂ (0,67+0,03 Pa)	1°C.min ⁻¹ , vácuo
PA9		Ar + N ₂ + ar (0,6+0,03+0,07Pa)	1°C.min ⁻¹ , vácuo
PA10		Ar + N ₂ + ar (0,6+0,03+0,07Pa)	1°C.min ⁻¹ , em N ₂ e ar
PA11	Dpot*: 7,6x10 ⁻³ W.mm ⁻²	Ar + ar (0,6+0,1 Pa)	1°C.min ⁻¹ , vácuo
PA12		Ar + ar (0,6+0,03 Pa)	1°C.min ⁻¹ , vácuo
PA13		Ar + ar (0,6+0,1 Pa)	1°C.min ⁻¹ , em ar

*Dpot = densidade de potência

2.2. Técnicas de Caracterização

2.2.1. Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier, (FTIR - do inglês “*Fourier Transform Infrared spectroscopy*”) permite identificar os grupos químicos funcionais de um material. Esta técnica tem como princípio base de funcionamento o facto de as ligações químicas covalentes apresentarem frequências de vibração específicas, correspondendo a determinados níveis de energia. Quando o material interage com um feixe de comprimento de onda no infravermelho absorve parte desta radiação, dando origem a diferentes tipos de vibração das ligações covalentes de que são exemplo o alongamento (“*stretching*”), a torção, a rotação, entre outros. Cada grupo funcional apresenta frequências próprias de vibração que, por comparação com valores tabelados, permitem identificar os grupos químicos funcionais.

Neste estudo foi utilizado o equipamento Jasco, modelo FTIR 4200, em modo ATR (do inglês “*Attenuated Total Reflectance*”). Os espectros foram registados com uma

resolução espectral de 4cm^{-1} e uma acumulação de 64 interferogramas, e a análise dos grupos químicos foi realizada após desconvolução gaussiana. A identificação dos grupos químicos presentes foi realizada, por comparação, com os dados existentes na literatura.

2.2.2. Espectroscopia de Fotoeletrão X

A espectroscopia de fotoeletrão X, (XPS - do inglês "*X-ray Photoelectron Spectroscopy*"), permite caracterizar a composição química de um material através não só da informação dos elementos químicos que a constituem bem como do respetivo estado de oxidação e vizinhança química, através da energia de ligação. O seu princípio de funcionamento baseia-se no efeito fotoelétrico, em que um feixe de raios X incide na superfície do material em análise, transferindo energia aos eletrões das camadas eletrónicas internas que o constituem, provocando a sua ejeção e, após deteção, determinação da energia da ligação.

Neste estudo foi utilizado um equipamento Thermo Scientific K-Alpha ESCA equipado com fonte de raios X com radiação monocromática Al $K\alpha$ ($h\nu=1486.6$ eV). Devido à natureza não condutora das superfícies foi necessária a utilização de um canhão de eletrões (entre 0 a 14 eV) e um canhão de iões Ar de baixa energia. Os fotoeletrões foram detetados com um ângulo de 90° em relação à superfície da amostra. As medições foram efetuadas com um passo de 100 eV para o espectro geral e um passo de 20 eV para os espectros de alta resolução. A composição química elementar foi determinada usando as fotoemissões padrão Scofield. A indexação dos espectros foi feita após desconvolução e tratamento no programa "CasaXPS".

2.2.3. Difração de Raios X

A difração de raios X (XRD – do inglês "*X-Ray Diffraction*") permite avaliar o grau de ordem estrutural de um material. O feixe de raios X incide na amostra e, ao interferir construtivamente com os planos cristalinos, é difratado de acordo com a lei de Bragg (Equação 2.1)

$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad (2.1)$$

na qual n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a

distância interplanar e θ é o ângulo de incidência dos raios X.

Neste trabalho foi utilizado o equipamento Philips X'Pert, equipado com goniómetro PW3200/00 com uma tensão de 40 kV, intensidade de corrente de 35 mA e anticátodo de cobalto ($K\alpha_1=0,178896$ nm e $K\alpha_2=0,179285$ nm). A gama de varrimento foi de 10 a 120°, com um passo de 0,08° e tempo de aquisição de 2s por passo.

2.2.4. Microscopia Eletrónica de Transmissão

A microscopia eletrónica de transmissão (TEM - do inglês "*Transmission Electron Microscopy*") é uma das mais poderosas técnicas de caracterização estrutural de materiais.

Nesta técnica um feixe de eletrões é acelerado, colimado por lentes eletromagnéticas, e direcionado para uma amostra de espessura à escala submicrométrica, interagindo com esta enquanto a atravessa. Os eletrões que interagem com a amostra e são transmitidos através desta, apresentam uma intensidade e direção controladas pelas leis da difração, impostas pelo arranjo cristalino dos átomos do material, e são responsáveis pela formação de uma imagem e, caso seja necessário, um padrão de difração de eletrões.

No presente trabalho foi usado o microscópio FEI Tecnai G² 200kV e os filmes finos foram depositados sobre grelhas de cobre para TEM e observados diretamente sem qualquer tipo de preparação adicional.

2.2.5. Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento, (SEM - do inglês "*Scanning Electron Microscopy*"), permite a observação da morfologia superficial de amostras com elevada resolução. O seu princípio de funcionamento baseia-se na interação de um feixe de eletrões com a superfície, os quais ao penetrarem, num certo volume, provocam uma série de diferentes fenómenos, tais como a difusão e emissão de eletrões. Os eletrões secundários, emitidos de uma profundidade de cerca de 30 a 50 nm, são os responsáveis, após deteção, pela formação das imagens de morfologia.

Neste trabalho foram utilizados dois equipamentos: um com um filamento de tungsténio da marca JOEL modelo-XL30 e outro com canhão de emissão de campo (FEG – do inglês "*Field Emission Gun*") marca FEI Quanta 400 FEG ESEM, ambos equipados

com sistema EDS (“*Energy Dispersive Spectrometry*”) da EDAX. Esta caracterização permitiu a observação da morfologia superficial e em secção transversal, em que as observações foram efetuadas com uma tensão de aceleração do feixe de 15kV.

2.2.6. Microscopia de Força Atómica

A microscopia de força atómica (AFM - do inglês “*Atomic Force Microscopy*”), é uma técnica de caracterização de superfícies que tem como princípio fundamental a medida das deflexões de um braço em balanço (“*cantilever*”) que tem na extremidade livre uma ponta sensível às forças que atuam entre esta e a amostra em análise. A interação causa a deflexão do “*cantilever*” que é medida através da mudança de direção angular de um feixe laser emitido por um fotodiodo. O fotodetector envia a informação da variação do feixe laser a um sistema piezoelétrico que a converte em valores de voltagem, proporcionais à deflexão, que são usados para produzir uma imagem topográfica, com resolução que pode chegar à escala atómica. A magnitude da deflexão depende do tipo de forças entre os átomos da superfície e os da ponta, tais como forças Van der Waals e forças de exclusão de Pauli. Estas não são dependentes de propriedades eléctricas das amostras, sendo possível caracterizar superfícies não condutoras.

O varrimento da superfície pode ser efetuado em contacto direto (modo de contacto), a algumas décimas de nanómetro de distância (modo de não contacto) ou em contacto intermitente com a superfície (modo *tapping*) [41].

O equipamento utilizado neste estudo foi o modelo diInnova da marca Veeco. As pontas utilizadas foram de Si₃N₄, modelo RTESPA-CP da Bruker, com frequência de ressonância, f_0 , de 291-326kHz e constante de força, k , entre 20-80 N.m⁻¹ e todos os ensaios foram realizados em modo de contacto intermitente. Esta técnica permitiu ainda determinar a espessura dos filmes finos. O tratamento de imagens e de dados foi efetuada no programa “*Gwyddion*”.

2.2.7. Medição de Ângulos de Contacto

Quando se coloca em contacto direto um líquido sob uma superfície sólida, ocorrem interações moleculares na interface líquido-sólido que podem ser definidas em termos de ângulo de contacto e energia livre de superfície.

O ângulo de contacto é uma medida quantitativa da molhabilidade de um sólido por um líquido e permite avaliar o grau de hidrofilicidade/hidrofobicidade da superfície sólida, quando o líquido utilizado é a água. Este ângulo é definido geometricamente como o ângulo formado pelas tangentes das interfaces líquido-vapor e líquido-sólido com o plano da superfície sólida (Figura 2.1).

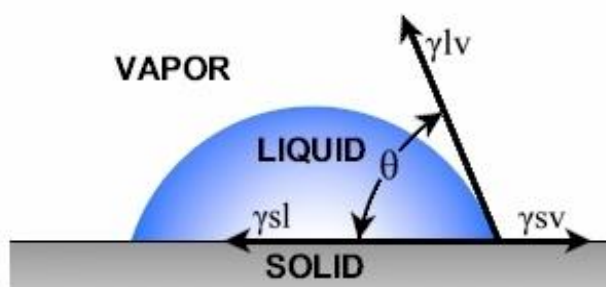


Figura 2.1. Representação esquemática da medição do ângulo de contacto com uma superfície e das tensões de interface existentes, adaptado de [42]

A relação entre o ângulo de contacto e as componentes de tensão superficial, são descritas pela equação de Young (Equação 2.2):

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} * \cos\theta \quad (2.2)$$

onde γ_{sv} é a tensão da interface sólido-vapor; γ_{sl} é a tensão da interface sólido-líquido; γ_{lv} é a tensão da interface líquido-vapor e θ é o ângulo de contacto.

A rugosidade é um parâmetro importante que influencia a medição do ângulo de contacto, pelo que é necessário compreender se a rugosidade de cada revestimento afeta significativamente os valores dos ângulos de contacto medidos. Deste modo é possível saber se os ângulos de contacto se devem à rugosidade da superfície dos revestimentos ou à sua composição química. Por este motivo, e para aferir e validar os resultados experimentais, deve ser afetado o tratamento dos valores recorrendo aos

modelos teóricos de Wenzel e Cassie-Baxter consoante as superfícies sejam hidrófilas ou hidrófobas, respetivamente. A equação de Wenzel (Equação 2.3), permite saber o valor do ângulo de contacto que se obteria caso a superfície fosse isenta de rugosidade.

$$\cos \theta_w = r \times \cos \theta_Y \quad (2.3)$$

onde θ_w é ângulo de Wenzel (ângulo da superfície isenta de rugosidade), r é a rugosidade avaliada pela relação entre a área real e a área projetada da superfície, e θ_Y é ângulo medido experimentalmente.

Neste trabalho foi efetuada a medição dos ângulos de contacto estáticos no equipamento DataPhysics QCA-20, e os líquidos, gota de 10 μL , utilizados foram a água destilada e a formamida, os quais apresentam diferentes valores de tensão superficial. Este procedimento foi repetido seis vezes em locais distintos de cada amostra e o valor médio calculado é apresentado como sendo o ângulo de contacto. Os ângulos de Wenzel foram calculados para todos os revestimentos, e os seus valores foram comparados com os valores experimentais medidos.

2.2.8. Potencial Eletrocínético

A magnitude das cargas superficiais que se desenvolvem na interface quando um sólido se encontra em contacto com um líquido pode ser avaliada através do potencial zeta (ζ). A acumulação de cargas elétricas na interface entre um sólido e um líquido dá origem à formação de uma dupla camada eletroquímica que é constituída por uma fase imóvel denominada “camada de Stern”, na qual as cargas se encontram fixas ao longo da interface, e uma camada móvel, onde as cargas, devido a forças de ligação mais fracas, podem ser deslocadas pelo movimento do eletrólito. O potencial da interface entre estas duas camadas é conhecido como potencial zeta.

Os processos de medição deste valor são variados mas o mais comum consiste em fazer passar uma solução de eletrólito, sob pressão, numa célula de medição que contem a amostra. O movimento do eletrólito gera um potencial que pode ser calculado pela medida direta do potencial de fluxo (“*Streaming potential*”) ou pela corrente de fluxo (“*Streaming current*”), induzidos pela passagem do líquido. A relação entre o valor da corrente, nas condições usadas neste trabalho, e o potencial zeta é dada pela equação de Helmholtz-Smoluchowski (Equação 2.3)

$$\zeta = \frac{dl}{dp} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \frac{L}{A} \quad (2.4)$$

em que $\frac{dl}{dp}$ representa o declive da curva de valores da corrente em função da pressão; η representa a viscosidade do eletrólito; ε corresponde à constante dielétrica do eletrólito; ε_0 é a permissividade em vácuo; L é o comprimento do canal de medição e A a seção transversal do canal de medição [43,44].

No presente trabalho foi utilizado o analisador eletrocínético SurPASS da Anton Paar GmbH, em que foram usadas como células de medição a célula de aperto (“*Campling cell*”) e a célula com abertura ajustável (“*Adjustable Gap Cell*”) e como eletrólito uma solução de KCl 1mM a pH=7.

2.2.9. Testes *in vitro*

Células neuronais do córtex de rato com 16 dias de gestação foram cultivadas em lamelas de vidro modificadas pelos revestimentos designados por PA4, PA5, PA6 e PA11, durante um período de 14 dias de acordo com os protocolos utilizados no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (CNC). Como controlo foram utilizadas lamelas de vidro revestidas com poli-L-lisina.

As culturas primárias de neurónios corticais foram preparadas a partir do córtex de embriões de rato Wistar E18-E19. Resumidamente, os córtex foram lavados, em HBSS (solução salina balanceada de Hank) gelado, três e cinco vezes, antes e depois do tratamento com tripsina (solução 0,06% (v/v) em HBSS, 15 min a 37°C), respectivamente. As células foram dissociadas mecanicamente com HBSS. Após contagem, as células foram incubadas ($94,7 \times 10^3$ células/cm²) com 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 lamelas de vidro revestidas com poli-L-lisina (0,1 mg/mL). No fim deste 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. Após 2-3 dias em cultura, a divisão das células da glia foi impedida pela 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.

Após o tempo de incubação foram efetuados dois procedimentos experimentais:

- para análise da morfologia das células por SEM as superfícies foram sujeitas a fixação química com uma solução de glutaraldeído 5% (v/v) durante 10 minutos e, em seguida, desidratadas com soluções aquosas de etanol (v/v) a 25%, 50%, 75% e 100%, tendo permanecido 10 minutos em cada solução; imediatamente antes da observação em SEM as superfícies foram revestidas, por pulverização catódica, com um filme de 30 nm de ouro;

- para avaliação da adesão e viabilidade celular as superfícies foram sujeitas a um protocolo para marcação dos núcleos, sendo posteriormente observadas num

microscópio de fluorescência da marca Zeiss, modelo Axiovert 200 acoplado a uma câmara AxioCam.

Protocolo para marcação dos núcleos

As células são lavadas duas vezes com PBS e, em seguida são fixadas, durante 15 minutos à temperatura ambiente, com uma solução de 4% paraformaldeído e 4% sacarose (v/v) em PBS, pré aquecido a 37°C. Após uma lavagem rápida com PBS as células são novamente lavadas por duas vezes durante 5 minutos de cada vez.

A permeabilização das células é efetuada com uma solução 0,25% de Triton X-100 (v/v) em PBS, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Findo este tempo as células são lavadas, durante 5 minutos, com PBS

A marcação não específica é bloqueada com uma solução de 10% BSA (v/v) em PBS, durante 30 minutos, a 37°C. As células são novamente lavadas com PBS.

Para marcar o núcleo as células foram incubadas com uma solução do corante Hoechst 33342 (0.5 µg/mL, em PBS), durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Após lavar as células uma vez com PBS e absorver o excesso de líquido com papel de filtro as amostras são montadas numa lâmina de vidro limpa sobre uma gota do meio de montagem DAKO. O excesso do meio de montagem é removido com papel de filtro e o conjunto é selado com verniz de unhas. As amostras são guardadas a 4°C até à observação em microscopia de fluorescência que deve ocorrer no período máximo de uma semana.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da caracterização dos filmes finos produzidos por pulverização catódica r.f magnetron com alvo de poliamida 6,6, com uma densidade de potência do alvo de $7,6 \times 10^{-3} \text{ W.mm}^{-2}$.

3.1. Taxa de deposição e composição química

A composição química superficial foi avaliada por XPS e a taxa de deposição foi calculada a partir da espessura dos filmes finos avaliadas por AFM, como exemplificado na Figura 3.1, após a remoção da gota de nitrato de boro colocada para este efeito sobre o substrato de silício (Tabela 3.1).

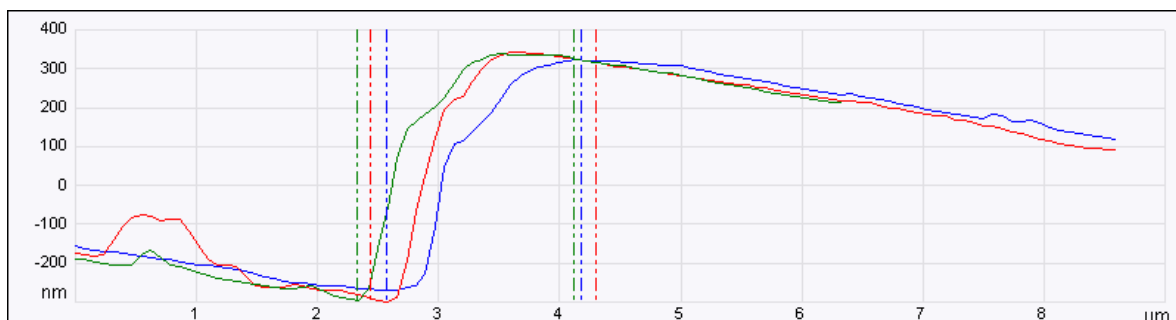


Figura 3.1. Exemplo de avaliação da espessura por AFM.

Os resultados apresentados na Tabela 3.1 permitem evidenciar diferenças significativas na taxa de deposição dos filmes que variam não só com a composição de gases usada durante a deposição, bem como da atmosfera de arrefecimento. Para a série de deposições em atmosfera inerte (PA4) e com concentrações variáveis de azoto (PA5 a PA7), a maior taxa de deposição ocorre quando é usada uma maior pressão relativa de azoto (PA 6). Quando se compara a taxa de deposição de PA4 com a dos filmes depositados em atmosfera reativa com ar e ar e azoto e com arrefecimento em vácuo ou na presença de ar e azoto (PA9 a PA13) é visível um aumento significativo da taxa de deposição para esta série, em que o mais importante ocorre para os filmes depositados na

presença da mistura de gases reativos concomitantemente com o arrefecimento na presença da mesma mistura de gases (PA10). Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados por outros autores. [29,39,45].

Tabela 3.1. Composição química, espessura e taxa de deposição dos filmes finos.

Superfície	Composição Química (%atm)				Espessura (nm)	Taxa de Deposição (nm.s ⁻¹)
	C	O	N	N/C		
PA4	71,1	21,0	6,3	0,088	147 ± 4	0,04
PA5	66,9	19,3	13,8	0,206	251 ± 4	0,07
PA6	60,4	17,5	22,1	0,366	366 ± 4	0,10
PA7	70,3	19,7	10,0	0,142	225 ± 19	0,06
PA9	66,8	19,4	13,8	0,207	468 ± 7	0,13
PA10	60,3	17,3	23,4	0,388	628 ± 14	0,20
PA11	69,4	19,0	11,6	0,167	575 ± 22	0,16
PA12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	495 ± 11	0,14
PA13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	607 ± 16	0,17

Durante o processo de deposição a partir de um alvo polimérico, quando este é bombardeado com iões energéticos, ocorre a quebra de ligações, com ejeção de fragmentos de material para o substrato. Esta ejeção implica que no local onde o material se encontrava, fiquem ligações pendentes e radicais, que se podem rearranjar de diferentes formas, nomeadamente formarem ligações insaturadas intramoleculares e reticulações intermoleculares, o que mais frequentemente acontece em deposições em atmosfera inerte.

Quando as deposições ocorrem na presença de gases reativos, como o azoto ou o oxigénio, as espécies quimicamente ativas formadas no plasma podem interagir com as ligações pendentes, evitando a reticulação e a formação de ligações insaturadas e, consequentemente, facilitando a ejeção de outros fragmentos do alvo [29,39,45]. Se o processo de ejeção é facilitado então a taxa de deposição aumenta o que, experimentalmente, se traduz em filmes mais espessos. Todos os filmes apresentam

espessuras submicrométricas, sendo que os filmes com menor e maior espessura são os designados por PA4 e PA10, respetivamente.

Quanto à composição química de superfície avaliada por XPS (Tabela 3.1) é visível que todas as superfícies apresentam valores próximos no que respeita ao carbono e ao oxigénio, o que implica que as deposições na presença de ar não são eficazes na incorporação de oxigénio. No entanto, é necessário recordar que o ar é constituído por uma relação $N_2:O_2$ de, aproximadamente, 3:1. Este facto é particularmente evidente quando se compara o teor em azoto das superfícies PA6 e PA10 que são semelhantes apesar da primeira superfície ser resultado de uma deposição em atmosfera de N_2 e a segunda de uma na presença de $Ar+ar+N_2$ e cujo arrefecimento ocorre na presença de $ar+N_2$. Assim a presença de ar parece reforçar sobretudo a incorporação de azoto. Das análises efetuadas nos filmes finos depositados com diferentes pressões de azoto é evidente, tal como seria expectável, que a concentração de N_2 no filme fino aumenta com o aumento dos teores de azoto na atmosfera de deposição e arrefecimento.

Para identificar os tipos de ligações presentes na superfície dos filmes finos foi feita a desconvolução dos espectros de XPS no programa “CasaXPS”, como exemplificado na Figura 3.2.

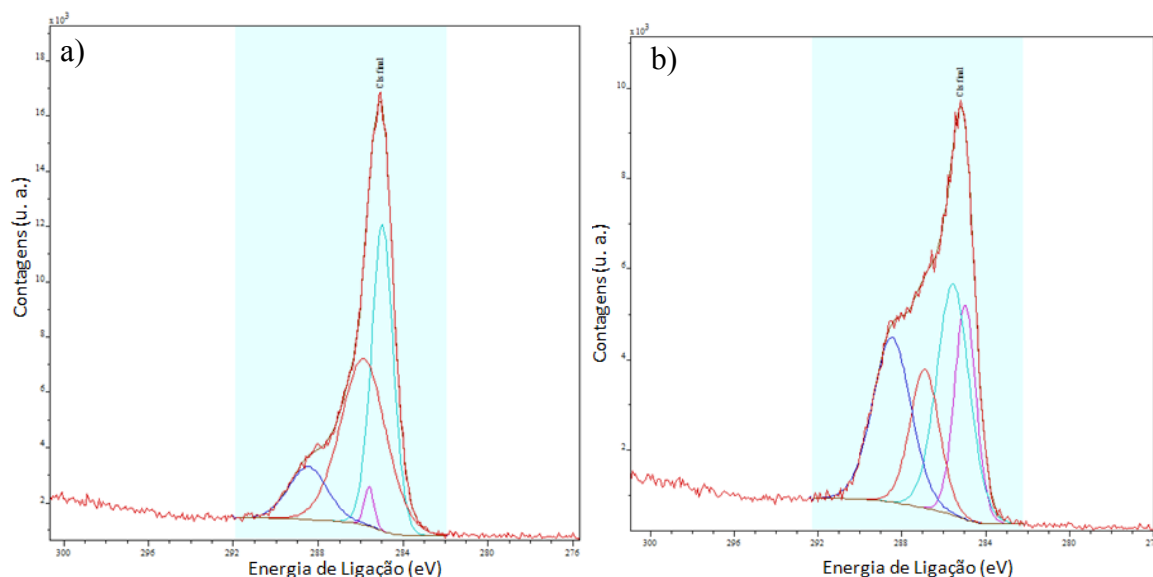


Figura 3.2. Desconvolução dos espectros C1s das superfícies PA4 (a) e PA6 (b).

A desconvolução dos espectros de alta resolução de C1s, N1s e O1s foram realizadas para todos os revestimentos e os resultados estão apresentados no apêndice A.

De um modo geral, e em todos os filmes finos, foram identificadas as energias de ligação, correspondentes às ligações presentes na Tabela 3.2. Os tipos de ligação correspondente a cada energia de ligação presente nos espectros analisados, foram identificados segundo os dados presentes na literatura. [21,30,45-53]

Tabela 3.2. Identificação das ligações presentes em todos os revestimentos, resultantes da desconvolução dos espectros C1s, N1s e O1s.

Espetros	Energias	Tipo de ligação
C1s	285,0	C-C, C-H
	285,7	C-N, C-NH
	286,6	C=N, C≡N, C=O
N1s	288	C-O, C=O, C=N, N-C=O
	399,0	C-N, C=N, C-NH ₂ , C≡N
	400,5	O=C-NH ₂ , C-N
O1s	531,3	C-O, C=O, N-C=O
	532,2	O=C-O, C=O, C-O
	532,95	C-O, C=O

Dos resultados apresentados na Tabela 3.2, dados por XPS, pode-se concluir que os revestimentos apresentam na sua superfície ligações duplas (C=N) e triplas (C≡N) que não estão presentes no material do alvo, o qual é caracterizado maioritariamente por ligações simples e algumas duplas entre grupos C=O. Por outro lado se observa que na superfície dos revestimentos estão presentes grupos amida (N-C=O), amina (NH₂) e nitrilos (C≡N), dos quais se destaca a presença de grupos amina que fazendo parte da poli-L-lisina, mas não da poliamida 6,6, e se encontram incorporados na superfície dos filmes finos.

3.2. Grupos químicos funcionais

A análise química e das ligações efetuadas por XPS apenas dão informação sobre os 10 nm mais exteriores das superfícies estudadas. Deste modo, e para ter uma informação mais geral sobre o tipo de grupos químicos presentes foi efetuada a caracterização por FTIR (Figura 3.3).

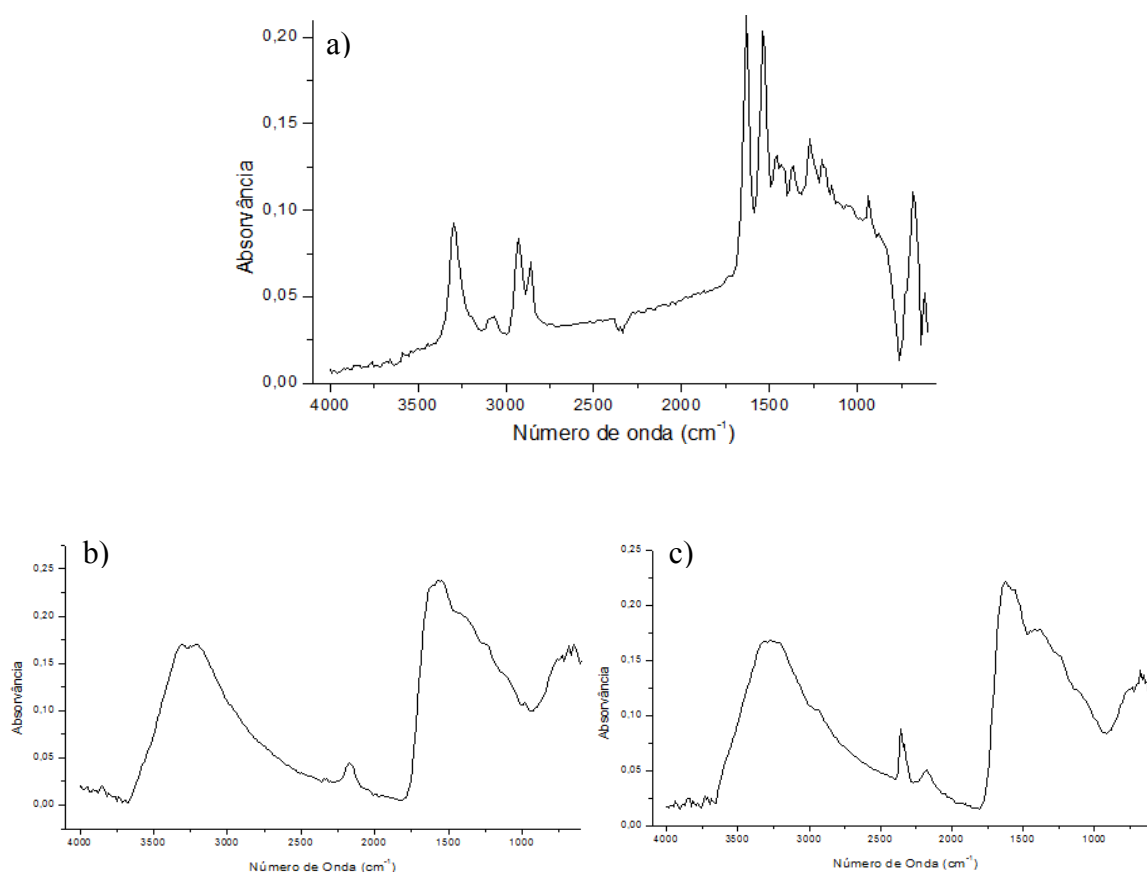


Figura 3.3. Espectros FTIR do alvo de PA 6,6 (a) e dos filmes PA6 (b) e PA12 (c).

A poliamida 6,6 é um material semicristalino, o que se traduz num espectro de FTIR com picos bem definidos (Figura 3.3 a), contrastando com os espectros dos filmes finos (Figura 3.3 b e c). Estes apresentam picos pouco definidos e muito largos, os quais são característicos de materiais com baixa ordem estrutural.

No sentido de identificar adequadamente os grupos químicos funcionais foram efetuadas desconvoluções, no programa “*Origin Peak Fit*”, na gama de número de onda característica dos grupos químicos da poliamida 6,6 e os grupos funcionais foram identificados tendo por base os dados presentes na literatura (Tabelas 3.3 e 3.4).

Tabela 3.3. Identificação de bandas no espectro de infravermelho da Poliamida 6,6.

Bandas (cm ⁻¹)	Identificação	Referências
Alvo de PA 6,6		
680	O=C-N e C-C deformação axial; NH deformação angular fora do plano	
930	Banda cristalina C-CO e C-C deformação axial simétrica	
1200	C-CH deformação axial simétrica CH ₂ deformação axial simétrica Amida terciária numa cadeia hidrocarbonada Amida terciária deformação axial simétrica	
1370	C-N deformação axial simétrica CH ₃ deformação axial simétrica de grupo terminal	
1464	NH deformação axial simétrica	
1534	NH deformação axial simétrica (amida secundária) C-N e C-C deformação axial simétrica Grupos amida N-mono substituídos	[54-66]
1640	C=O deformação axial simétrica (amida primária) CO deformação axial simétrica + NH deformação angular + CN deformação axial simétrica	
2850	CH ₂ deformação axial simétrica	
2930	CH ₂ deformação axial simétrica	
3080	C-H deformação axial simétrica	
3300	N-H deformação axial simétrica	

Tabela 3.4. Identificação de bandas no espectro de infravermelho de filmes finos de PA, referidos na literatura.

Filmes de PA 6,6 depositados por outros autores		
Bandas (cm ⁻¹)	Identificação	Referências
1000-1400	CH ₂ e CH ₃ deformação axial simétrica	
1700	C=N, C=C e C=O deformação axial simétrica	
2500-2300	C≡N, C≡C deformação axial simétrica	[21,29,30,39]
3100-2700	CH ₂ e CH ₃ deformação axial simétrica	
3700-3200	N-H e O-H deformação axial simétrica	

As bandas identificadas no espectro do alvo de poliamida 6,6 estão de acordo com a literatura e os filmes finos, de um modo geral, apresentam vibrações semelhantes às do material do alvo (apêndice B). No entanto, em alguns casos surgiram novas bandas de vibração, que correspondem a novos grupos químicos funcionais (Tabela 3.4), as quais vão de encontro ao referido por outros autores [21,29,30,39].

Tabela 3.5. Identificação de novas bandas nos espectros FTIR dos revestimentos

Superfícies	Bandas (cm ⁻¹)	Descrição
PA 4	2346	C≡N, C≡C nitrilos, deformação axial simétrica
	1700	C=N, C=C e C=O, deformação axial simétrica
PA 5 a PA13	2500- 2300	C≡N, C≡C deformação axial simétrica
	3100-2700	CH ₂ e CH ₃ deformação axial simétrica
	3400-3500	O-H deformação axial simétrica

A identificação de grupos químicos efetuada por FTIR pode não coincidir completamente com a identificação das ligações químicas por XPS e este facto deve-se ao volume integrado por cada uma das técnicas. Enquanto os elementos químicos identificados são os mesmos que constituem o material utilizado como alvo, já o tipo de ligação que estabelecem é distinta da do alvo de PA 6,6. Este é caracterizado por ligações simples e as únicas ligações duplas são as do grupo >C=O. Já no caso dos filmes finos há a presença de ligações duplas e triplas entre átomos de C e N, C e C, bem como o aparecimento de grupos hidroxilo, -OH. A presença de ligações pendentes e radicais, tanto no material ejetado e que se encontra no plasma, como no material na superfície do substrato permite a formação de novas ligações, sendo que as ligações insaturadas são termodinamicamente mais favoráveis de se formar do que as ligações simples. Com efeito, as entalpias médias de dissociação de ligações químicas (em kcal/mol) são de: C-C = 83; C-N = 73; C=C = 146; C=N = 147; C≡C = 200; C≡N = 213 [67].

3.3. Análise Estrutural

A análise estrutural do material do alvo e dos filmes finos produzidos foi avaliada por difração de raios X (Figura 3.4) e por TEM (Figura 3.5).

O difratograma da poliamida 6,6 apresenta alguns picos bem definidos, conjuntamente com “bossas” largas que correspondem à parte cristalina e amorfa do material semicristalino, respetivamente. Os difratogramas dos filmes finos são todos semelhantes entre si e são caracterizados, de acordo com o exemplo do filme PA12, por “bossas” largas características de materiais sem ordem estrutural.

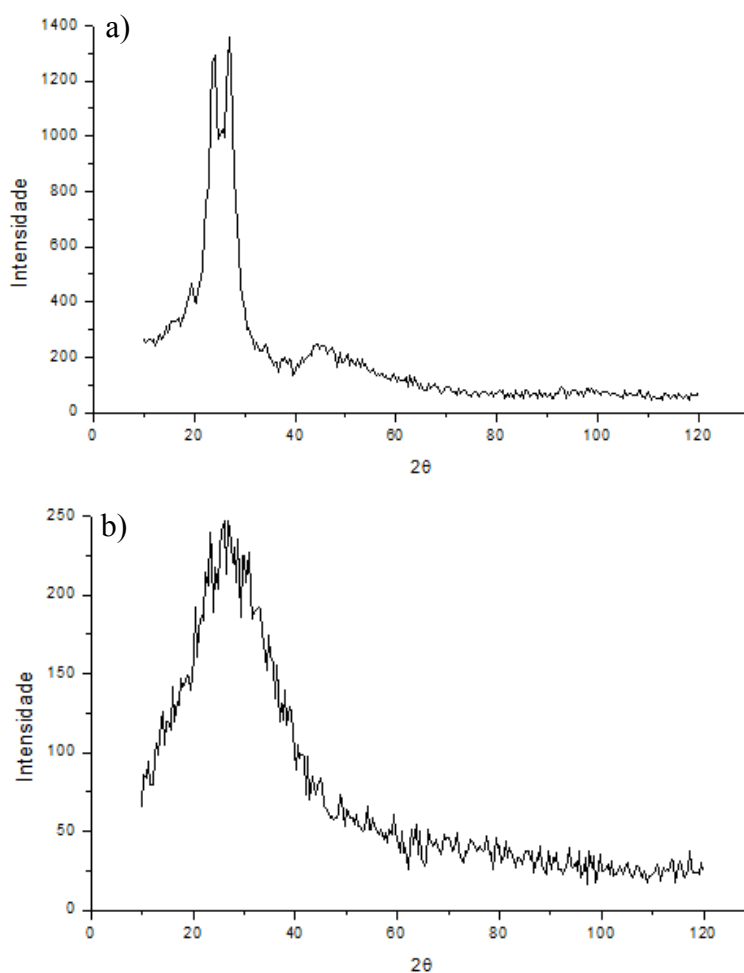


Figura 3.4. Difratogramas do alvo de PA 6,6 a) e do filme fino PA12 b).

A Figura 3.5, representativa da observação de todas as amostras em TEM, permite observar a ausência de ordem estrutural nos filmes, o que está de acordo com os resultados

de DRX. Com efeito a micrografia de campo claro não apresenta as delimitações que circundam as zonas com ordem estrutural, que são características em materiais cristalinos.

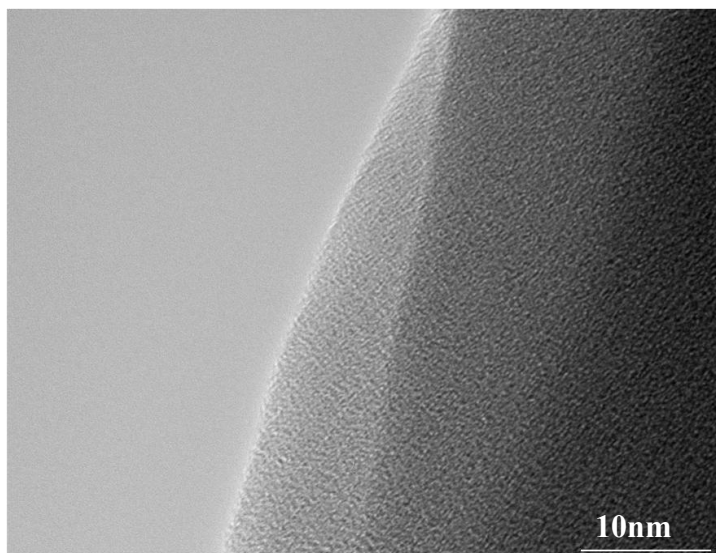


Figura 3.5. Imagem de campo claro de TEM do filme fino PA4.

Estes resultados seriam espectáveis, uma vez que a pulverização catódica de materiais poliméricos origina filmes finos sem ordem estrutural. A emissão de fragmentos do alvo e não de átomos, a falta de rearranjo das espécies na sua chegada ao substrato e a rápida velocidade de arrefecimento após a deposição não constituem condições favoráveis a arranjos atômicos bem definidos e regulares a longa distância – cristalinidade.

3.4. Morfologia/Topografia

A morfologia superficial e da secção transversal dos filmes finos foi observada por microscopia eletrónica de varrimento (Figuras 3.6 e 3.7).

A Figura 3.6 mostra a superfície de dois dos filmes finos, depositados com diferentes parâmetros de deposição. As diferenças em termos de morfologia são evidentes, concluindo-se que as condições de deposição usadas influenciam fortemente a morfologia superficial dos revestimentos.

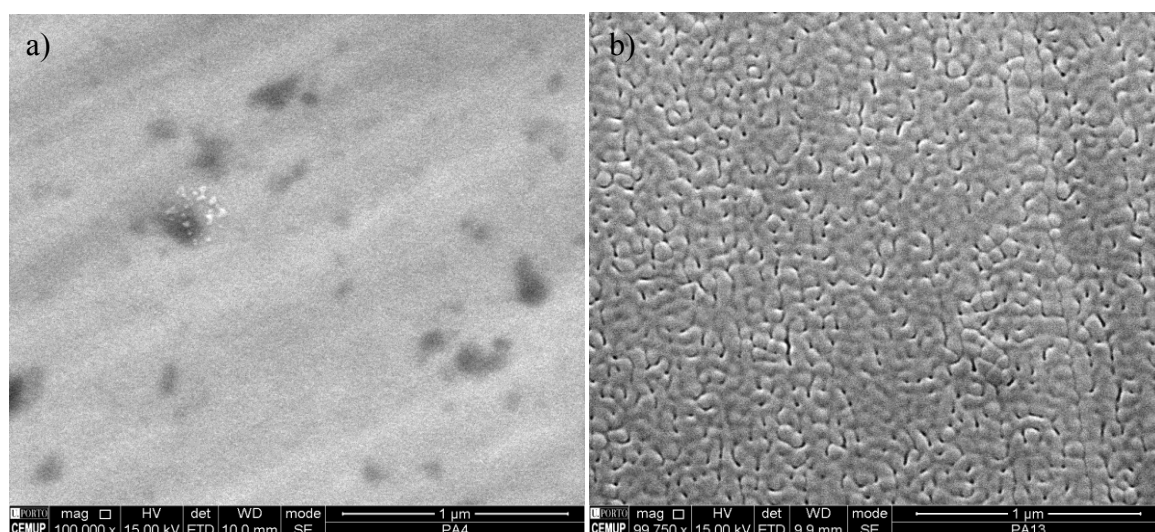


Figura 3.6. Micrografias da superfície dos filmes finos PA4 a) e PA13 b).

A morfologia da secção transversal de dois filmes finos está representada na Figura 3.7 e é representativa das secções transversais de todos os filmes (apêndice C). Os revestimentos são caracterizados por não apresentarem morfologia aparente, designação de “*featureless*”, dado que são filmes finos densos e sem porosidade. Este tipo de morfologia da secção transversal é característico de materiais sem ordem estrutural que, como foi já observado, é o caso de todos os filmes finos depositados neste estudo. As micrografias permitem também avaliar as diferenças de espessura entre o filme depositado em atmosfera inerte e os depositados em atmosfera reativa.

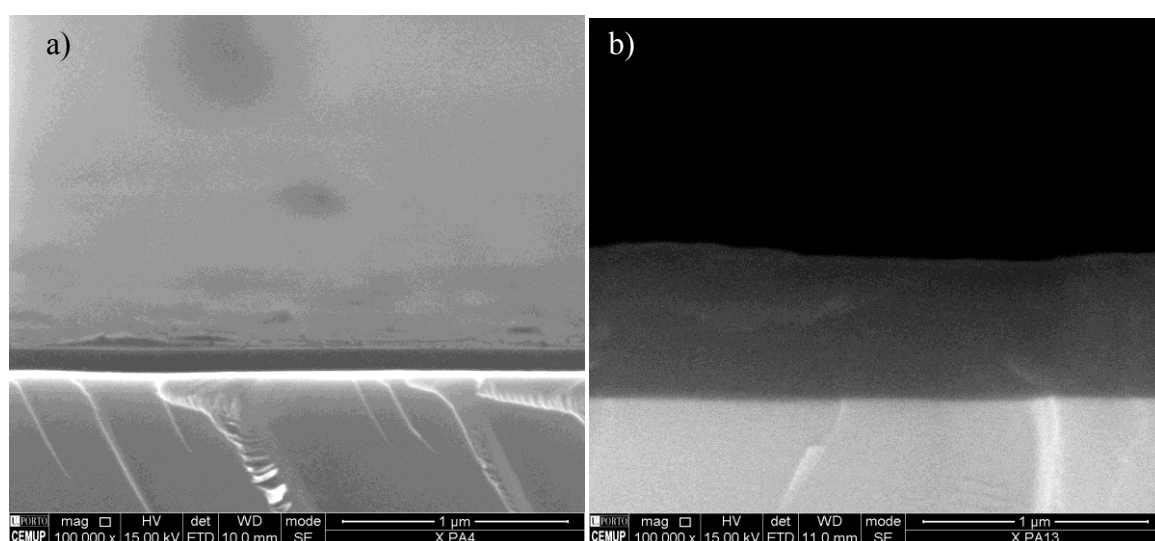


Figura 3.7. Micrografias da secção transversal dos filmes finos da superfície PA4 a) e PA13 b).

De forma a caracterizar mais pormenorizadamente a topografia superficial todos os filmes finos foram caracterizados por AFM, e nas Figuras 3.8 e 3.9 são apresentadas as imagens topográfica e de amplitude de duas das superfícies depositadas com diferentes parâmetros.

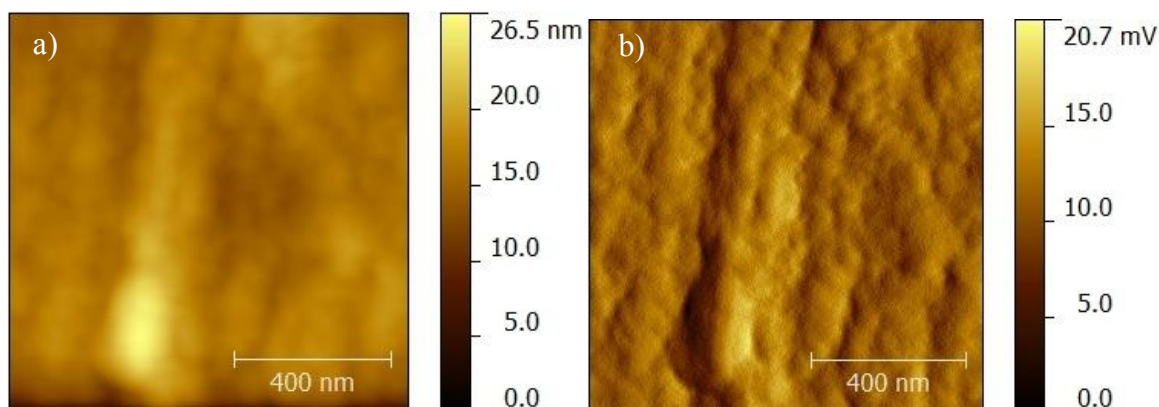


Figura 3.8. Imagem topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA4.

As imagens da Figura 3.8 revelam uma superfície suave e homogénea que caracteriza o filme fino depositado em atmosfera não reativa; em que a topografia é pouco acentuada, no que refere à altura pico/vale, devido à coalescência das partículas em agregados de grande dimensão, contrariamente ao que acontece na superfície PA10, em que é evidente a presença de partículas pequenas e bem definidas (Figura 3.9).

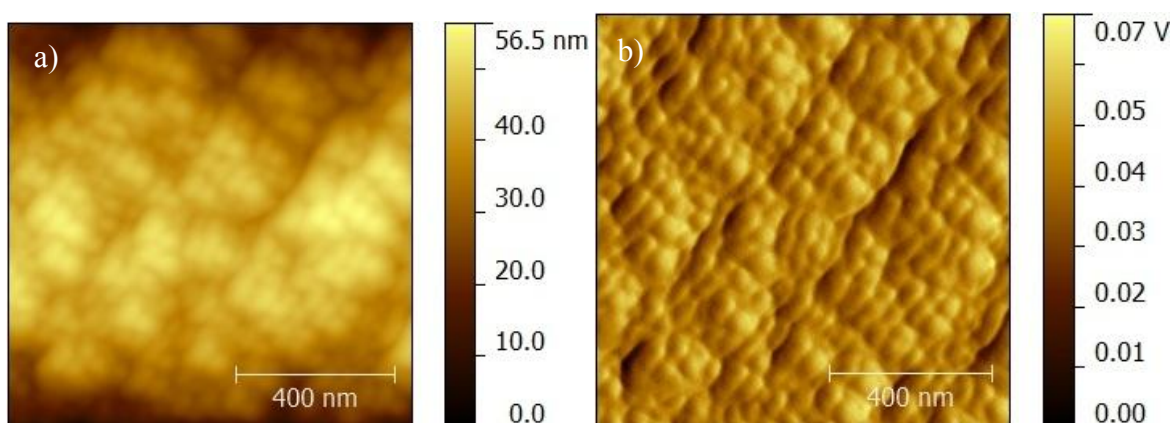


Figura 3.9. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA10.

Como anteriormente referido a presença de um maior número de espécies reativas contendo N_2 na câmara de deposição, leva a uma maior libertação de fragmentos

de material, e conseqüentemente a uma maior densidade de nucleação dos fragmentos no substrato. Tal facto pode justificar o evidente menor tamanho de partícula em PA10 e não em PA4 [29,39,45]. Esta mesma tendência ocorre para os restantes filmes produzidos (apêndice D).

As imagens topográficas da superfície de todos os filmes foram tratadas no programa “Gwyddion”, através do qual foi possível determinar parâmetros de rugosidade superficial, nomeadamente: S_a que corresponde à rugosidade média linear calculada pela média aritmética do desvio da altura da superfície relativamente a uma linha média do perfil; e S_{MS} que é o valor médio quadrático do desvio relativo à média do perfil [68].

Quando existe uma distribuição Gaussiana da rugosidade da superfície, ou seja quando a relação S_{ms}/S_a se encontra entre 1,20 a 1,25, é também possível analisar os parâmetros adimensionais de assimetria (*skewness*) e curtose (*kurtosis*), em que o primeiro avalia a simetria da superfície em relação ao plano médio e o *segundo* a ‘suavidade’ da superfície (Tabela 3.6) [68].

Tabela 3.6. Parâmetros de rugosidade superficial avaliados por AFM.

Superfícies	S_a (nm)	S_{ms} (nm)	Skew	Kurtosis
PA4	45	55	0,06	-0,6
PA5	49	60	0,04	-0,7
PA6	47	55	-0,05	-1,0
PA7	42	53	-0,30	0,2
PA9	45	54	-0,40	-0,5
PA10	182	215	-0,50	.0,8
PA11	73	87	-0,09	-0,8
PA12	75	90	0,01	0,6
PA13	108	129	-0,40	-0,7

Os resultados mostram que os valores de rugosidade média linear (S_a) das superfícies PA4 a PA9, não diferem muito entre si, contrariamente ao que acontece nas restantes superfícies. As superfícies PA11 e PA12 seguem a mesma tendência, apresentando rugosidades semelhantes entre si, mas superiores às anteriores. Por último destacam-se as superfícies PA10 e PA13 que apresentam valores de rugosidade claramente superiores.

Esta caracterização evidencia que a presença de N_2 durante a deposição não induz alterações na rugosidade superficial (PA 5, 6 e 7). Quando as deposições ocorrem na presença de ar e N_2 simultaneamente há um aumento da rugosidade superficial, mas não tão evidente quando, após as deposições, o arrefecimento ocorre na presença de uma atmosfera reativa. Nestes casos, PA10 e PA13, a rugosidade superficial atinge os valores mais elevados. Quando se permite um maior número de espécies reativas na câmara de deposição durante o processo de arrefecimento, ocorre a ligação destas espécies às ligações pendentes no filme o que induz um aumento de rugosidade e de espessura, como referido anteriormente. Este facto pode ser confirmado pela observação mais cuidada da morfologia da superfície PA13 (Figura 3.6 b) onde é notório o aumento da rugosidade quando comparada com a amostra arrefecida em atmosfera inerte - PA11. Também a morfologia da secção transversal (Figura 3.7 b) realça a “ondulação” induzida pelo aumento da rugosidade de PA13.

As superfícies apresentam maioritariamente valores de *skew* negativos o que indica que, na área analisada, os vales são predominantes sobre os picos. Os valores positivos são próximos de zero, sugerindo que nestas superfícies existe equilíbrio entre a área ocupada pelos vales e pelos picos. Todas as superfícies apresentam valores de *kurtosis* inferiores a 3 o que reflete a suavidade do perfil dos vales e picos, como pode ser perceptível tanto nas micrografias de superfície como nas imagens de AFM.

3.5. Molhabilidade

Os ângulos de contacto estático foram medidos utilizando dois líquidos, a água e a formamida, cujos valores de tensão e respetivas componentes polar e dispersiva se encontram na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Tensão superficial e respetivas componentes polar e dispersiva dos líquidos usados[69].

	Água	Formamida
γ_L (mJ.m ⁻²)	72,8	58,2
γ_L^p (mJ.m ⁻²)	43,7	23,1
γ_L^d (mJ.m ⁻²)	29,1	35,1

3.5.1. Ângulo de Contacto estático, θ

O ângulo de contacto estático entre um sólido e uma gota de água permite aferir sobre o grau de hidrofilicidade ou hidrofobicidade. A análise deste parâmetro de caracterização deve ser cuidada, pois existem vários fatores que contribuem para uma falsa interpretação dos valores obtidos, como é exemplo a rugosidade da superfície do material. Com efeito, não há superfícies isentas de rugosidade, mesmo quando a nível microscópico se apresentam niveladas. A rugosidade de uma superfície sólida pode, dependendo da composição química da superfície e das propriedades do líquido, provocar alterações na sua molhabilidade.

A molhabilidade de superfícies rugosas atraíram a atenção de Wenzel, Cassie e Baxter que desenvolveram diferentes teorias sobre este fenómeno [70]. Estes autores descreveram dois estados de molhabilidade, nomeadamente um estado em que a superfície é completamente molhada por um líquido (estado Wenzel) e o estado onde o ar fica aprisionado na rugosidade do substrato e apenas as áreas de topo da superfície se encontram molhadas (estado Cassie) (Figura 3.10).



Figura 3.10. Representação esquemática da influência da rugosidade na molhabilidade de acordo com Wenzel e Cassie-Baxter.

No caso das superfícies produzidas neste trabalho, os valores iniciais do ângulo de contacto estático (Tabela 3.8) indicam que há alguma afinidade dos líquidos utilizados para com as superfícies, pelo que se aplica o estado de Wenzel, descrito pela Equação 3.1:

$$\cos \theta_w = r \times \cos \theta_Y \quad (3.1)$$

onde θ_w é ângulo de Wenzel (ângulo da superfície isenta de rugosidade), r é a rugosidade avaliada pela relação entre a área real e a área projetada da superfície, e θ_Y é ângulo medido experimentalmente.

De modo a compreender se as superfícies apresentam rugosidades que efetivamente afetem os valores de ângulos de contacto foi calculado o ângulo de Wenzel e comparado com o ângulo experimental avaliado nas superfícies rugosas (Tabela 3.8). Os cálculos efetuados permitem afirmar que, apesar de existirem diferenças significativas de rugosidade, a variação nos valores dos ângulos de contacto estático é devida à composição química da superfície e não à diferença de topografia superficial.

Tabela 3.8. Valor médio dos ângulos de contacto e respetivo desvio padrão.

Superfície	Ângulo de contacto (°)		Ângulo de contacto Wenzel (°)	
	Água	Formamida	Água	Formamida
Poliamida 6.6	66 ± 2	28 ± 1	--	--
PA4	57 ± 2	40 ± 2	56 ± 2	40 ± 2
PA5	60 ± 1	42 ± 4	59 ± 1	42 ± 4
PA6	61 ± 1	35 ± 1	60 ± 1	34 ± 1
PA7	60 ± 2	34 ± 3	59 ± 2	33 ± 3
PA9	58 ± 2	22 ± 2	57 ± 2	21 ± 2
PA10	57 ± 0,3	27 ± 2	56 ± 0,3	24 ± 2
PA11	54 ± 2	26 ± 1	53 ± 2	25 ± 1
PA12	53 ± 1	25 ± 1	53 ± 1	24 ± 1
PA13	56 ± 1	31 ± 1	55 ± 1	30 ± 1

3.5.2. Energia Superficial, γ_s

A energia superficial pode ser calculada a partir dos valores dos ângulos de contacto estáticos através das Equações 3.2 e 3.3:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (3.2)$$

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p \gamma_L^p} \quad (3.3)$$

em que γ_s representa a energia superficial do filme; γ_s^d a componente dispersiva da energia superficial; γ_s^p a componente polar da energia superficial; γ_L a tensão superficial do líquido; γ_L^d a componente dispersiva da tensão do líquido; γ_L^p a componente polar da tensão do líquido; θ é o ângulo de contacto estático medido em cada líquido [69].

A Equação 3.3 permite o cálculo das componentes de energia superficial, através dos ângulos de contacto com a água e a formamida, para além de também possibilitar o cálculo da energia livre da lamela de vidro γ_{svidro} , que relacionando-se com os valores de γ_s dos filmes, através da Equação 3.4, permite conhecer a energia de interface entre a superfície da lamela de vidro e dos filmes finos (γ_{12}).

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2 \times (\gamma_1 \times \gamma_2)^{\frac{1}{2}} \quad (3.4)$$

Este valor da energia de interface pode ser usado para determinar o trabalho necessário para que ocorra a separação dos filmes da superfície da lamela de vidro, ou seja para avaliar a adesão na interface, através da equação 3.5:

$$\Delta G_{12}^A = -W^A = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (3.5)$$

em que ΔG é a variação da energia livre de Gibbs, componente termodinâmica, e que pode ser relacionada com o trabalho de adesão pela referida equação [69].

Os valores das energias livres de superfície dos filmes finos, as suas componentes polar e dispersivas calculadas a partir dos ângulos de contato experimentais e a partir dos ângulos de Wenzel calculados, bem como a variação da energia livre entre os filmes e os substratos, estão sumariados na Tabela 3.9.

Da análise dos resultados o que mais deve ser salientado é o facto de a componente polar da energia de superfície de todos os filmes finos ser superior à do alvo de PA 6,6. Este facto é normal se tomarmos em consideração que todos os filmes finos apresentam uma relação O/C superior à do alvo enquanto a maioria das amostras apresenta também a relação N/C superior à do alvo. Apenas os filmes finos depositados em atmosfera inerte e com pressões parciais de azoto mais baixas apresentam uma relação N/C inferior à do alvo (PA4 e PA7). Assim, mais uma vez se confirma a incorporação, na superfície dos filmes finos, de uma maior concentração dos grupos químicos funcionais já

existentes no polímero ou uma incorporação de outros grupos químicos contendo N e O que conferem uma maior componente polar à energia superficial.

Os valores calculados permitem ainda inferir sobre a estabilidade dos filmes finos depositados. Com efeito, ao apresentarem valores de energia superficial inferior à do alvo, as superfícies desenvolvidas são quimicamente mais estáveis e menos reativas o que, considerando a aplicação final, é sem dúvida um resultado positivo.

No que refere à variação da energia livre, todos os filmes depositados apresentam um valor negativo, o que indica boa adesão no sistema substrato/filme, o que mais uma vez é um resultado desejável quando se pretende uma modificação que seja estável e permanente.

Tabela 3.9. Energia livre das superfícies e variação da energia da energia livre de interface.

Superfície	γ_s (mJ. m ⁻²)		γ_s^d (mJ. m ⁻²)		γ_s^p (mJ. m ⁻²)		ΔG_{12}^A (mJ.m ⁻²)
	Exp*	Wenzel	Exp*	Wenzel	Exp*	Wenzel	
Alvo PA 6,6	54,3	n.d	47,2	n.d.	7,1	n.d.	n.d.
PA 4	46,3	46,4	24,7	24,8	21,6	21,6	-102,0
PA 5	44,8	44,9	25,9	26,0	18,9	18,9	-100,4
PA 6	48,2	48,5	33,8	34,0	14,4	14,4	-104,1
PA 7	48,5	49,0	33,1	33,6	15,4	15,4	-104,4
PA 9	54,4	54,7	41,1	41,5	13,3	13,3	-110,6
PA 10	52,2	53,2	36,9	38,0	15,2	15,2	-108,3
PA 11	52,6	53,0	34,0	34,4	18,6	18,6	-108,7
PA 12	52,8	53,3	34,0	34,5	18,8	18,9	-109,0
PA 13	50,1	50,6	31,5	32,0	18,6	18,7	-106,2

3.6. Potencial Eletrocinético

Como referido anteriormente a carga de superfície do material de cultura parece desempenhar um papel fundamental no comportamento de células neuronais, sendo este um dos motivos pelo qual a poli-L-lisina é utilizada na modificação da superfície das lamelas de vidro.

Os potenciais eletrocinéticos da poli-L-Lisina, do alvo e de todas as superfícies revestidas foram avaliados em KCl 1mM a pH 7,0 e os resultados são apresentados na Figura 3.11.

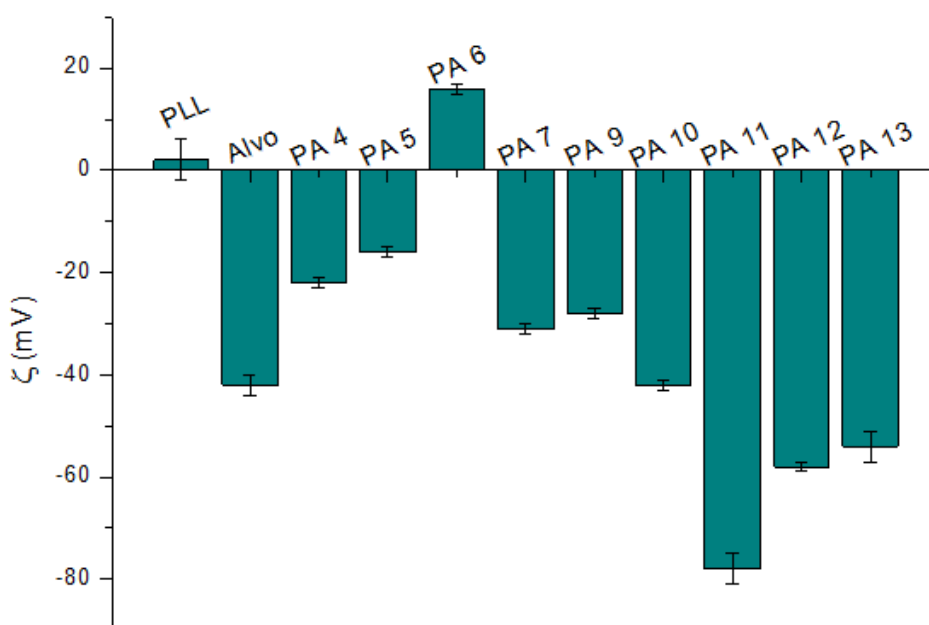


Figura 3.11. Potencial zeta do alvo, das superfícies dos filmes finos e de PLL avaliados em KCl 1 mM, pH 7,0.

Os resultados confirmam que, como referido na literatura, a PLL possui carga de superfície positiva com valor médio de +2 mV, para as condições experimentais utilizadas. Todas as superfícies apresentam valores de potencial zeta negativos à exceção da superfície PA6. Os filmes finos depositados em atmosfera inerte apresentam um valor de potencial ligeiramente menos negativo que o alvo o que pode provavelmente, ser atribuído a um maior teor de azoto que, se sob a forma de NH_2 , contribui com valores positivos para a carga de superfície. As superfícies depositadas com teores crescentes de azoto (PA7, PA5 e PA6) apresentam também valores crescentes de carga de superfície,

culminando com o valor positivo de +16 mV para a superfície PA6. Estes resultados indicam que o azoto à superfície do filme fino deve estar maioritariamente sob a forma de $-NH_2$. As superfícies depositadas na presença de ar (PA11, PA12 e PA13) apresentam valores de potencial zeta mais negativos que os do alvo indicando que a superfície tem concentrações de grupos que conferem carga negativa ($-OH$, $-COOH$) superiores às que possam induzir cargas positivas [71-73]. Assim, e apesar do teor em azoto determinado por XPS indicar maior concentração deste elemento do que no alvo a sua incorporação, pelo menos na superfície dos filmes finos, não foi efetuada maioritariamente sob a forma de $-NH_2$. Para as superfícies depositadas numa atmosfera mista de azoto e ar os valores são semelhantes entre si e muito semelhantes aos do alvo. Estes resultados são algo surpreendentes, sobretudo o respeitante à superfície PA10 dado que apresenta relações O/C e N/C muito semelhantes às da superfície PA6 pelo que seria expectável que também apresentasse um valor de carga superficial nulo ou mesmo positivo. O facto de tal não acontecer indica, uma vez mais a incorporação de grandes concentrações de azoto, mas não sob a forma de grupos amina que conferem carga superficial positiva. Com efeito, tanto por FTIR, mas sobretudo por XPS, foram identificados grupos químicos insaturados contendo azoto e que, de acordo com a literatura não contribuem para a carga superficial positiva [43,71,72].

Para os testes *in vitro* com células neuronais foram selecionadas superfícies com diferentes cargas superficiais, a saber: superfícies com vários valores de carga superficial negativa, PA11, PA5 e PA4 e a superfície com carga positiva PA6.

3.7. Testes *in vitro*

Após um período de 14 dias de contacto com a cultura com células do córtex de embrião de rato, as amostras, após procedimento de preparação para SEM, foram revestidas a ouro e analisadas para caracterizar a morfologia celular em cada superfície.

Nas figuras referentes às superfícies PA4 (Figura 3.12) e PA5 (Figura 3.13) é visível que as células neuronais apresentam alguma diferenciação, com a formação de neurites, mas há problemas de compatibilidade com as superfícies pois as células encontram-se em aglomerados tridimensionais e não aderentes e espalhadas na superfície. Assim, esta caracterização parece indicar que não há problemas com a química da

superfície (há diferenciação) mas, como apresentam carga negativa é provável que a repulsão “obrigue” as células a assumirem este tipo de estruturas tridimensionais.

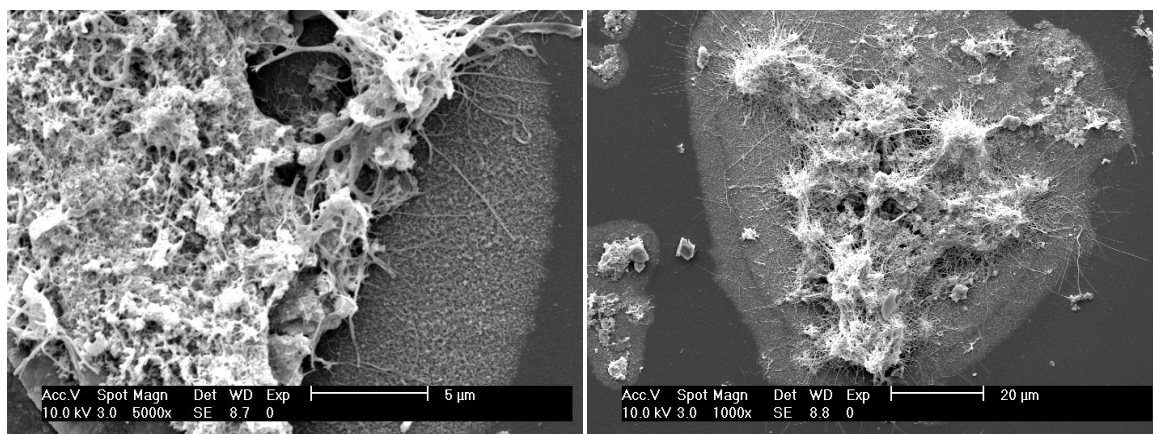


Figura 3.12. Micrografias da superfície PA4 após 14 dias de testes *in vitro*.

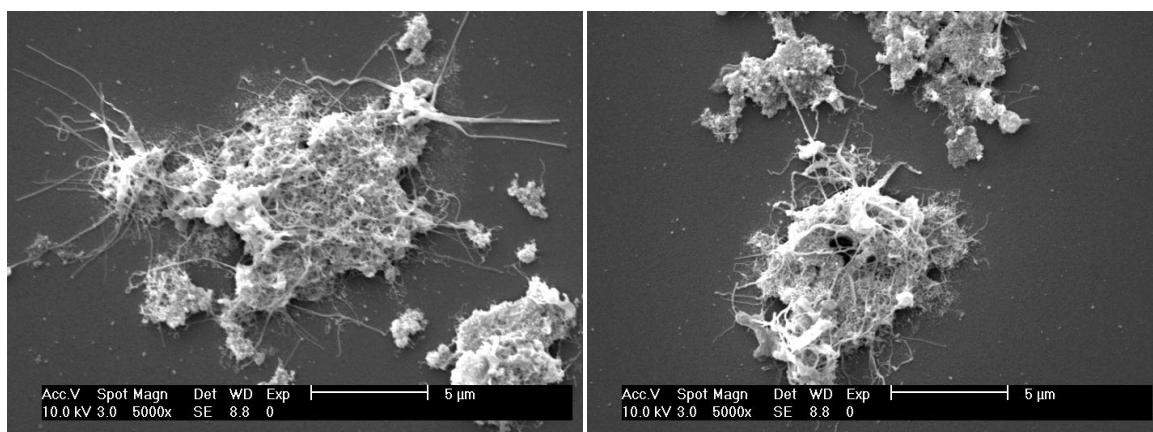


Figura 3.13. Micrografias da superfície PA5 após 14 dias de testes *in vitro*.

A superfície PA11 (Figura 3.14), que apresenta a carga superficial mais negativa de todos os revestimentos produzidos, não induz diferenciação celular nem permite o crescimento de neurites. As micrografias evidenciam apenas estruturas globulares características de células que sofreram apoptose. Considerando que a superfície apresenta uma carga de cerca de -80 mV estes resultados seriam expectáveis.

A superfície PA6, com uma carga superficial positiva, apresenta adesão, diferenciação e proliferação celular (Figura 3.15) o que está de acordo com o referido na literatura. As células apresentam uma morfologia típica com o desenvolvimento de neurites e a formação de rede neuronal.

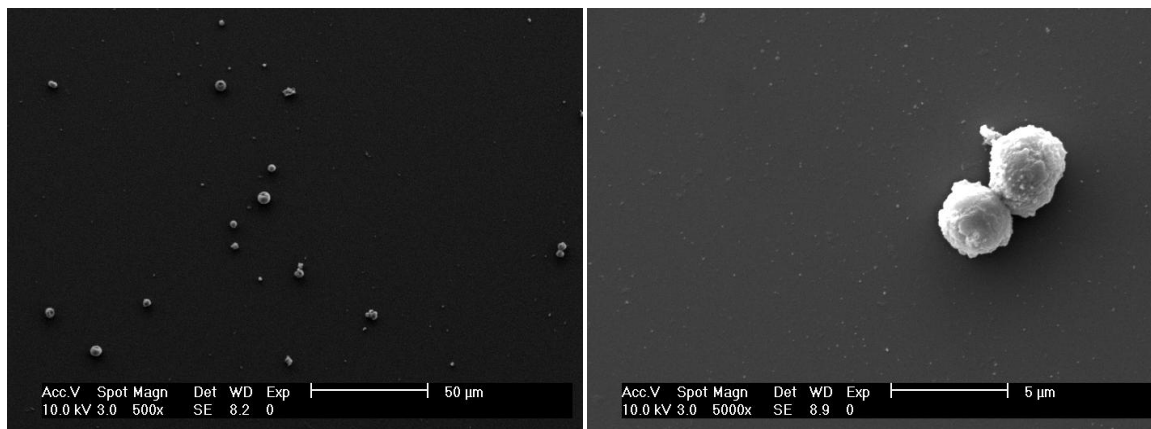


Figura 3.14. Micrografias da superfície PA11 após 14 dias de testes *in vitro* .

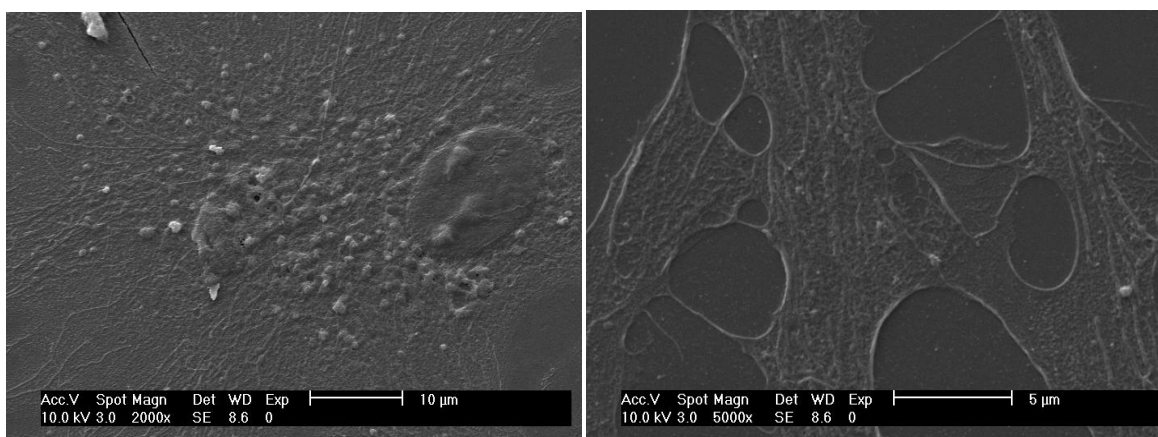


Figura 3.15. Micrografias da superfície PA6 após 14 dias de testes *in vitro* .

Os núcleos das células neuronais foram marcados com o corante Hoechst 33342, que corresponde a um corante fluorescente, que após ser excitado, emite uma radiação fluorescente azul, que possibilita a observação dos núcleos das células por microscopia de fluorescência. Esta técnica torna possível quantificar o número de células que aderiram às superfícies e avaliar se estas se encontram ou não num estado apoptótico.

O comportamento das células neuronais nas superfícies escolhidas para os testes *in vitro* (Figura 3.16) pode ser comparado com o comportamento destas células em superfícies revestidas com PLL (Figura 3.17). Esta caracterização permite observar que nas superfícies PA 4, 5 e 11, a quantidade de células nas superfícies é muito inferior ao número de células presentes na superfície revestida com PLL, como seria expectável após a caracterização por SEM.

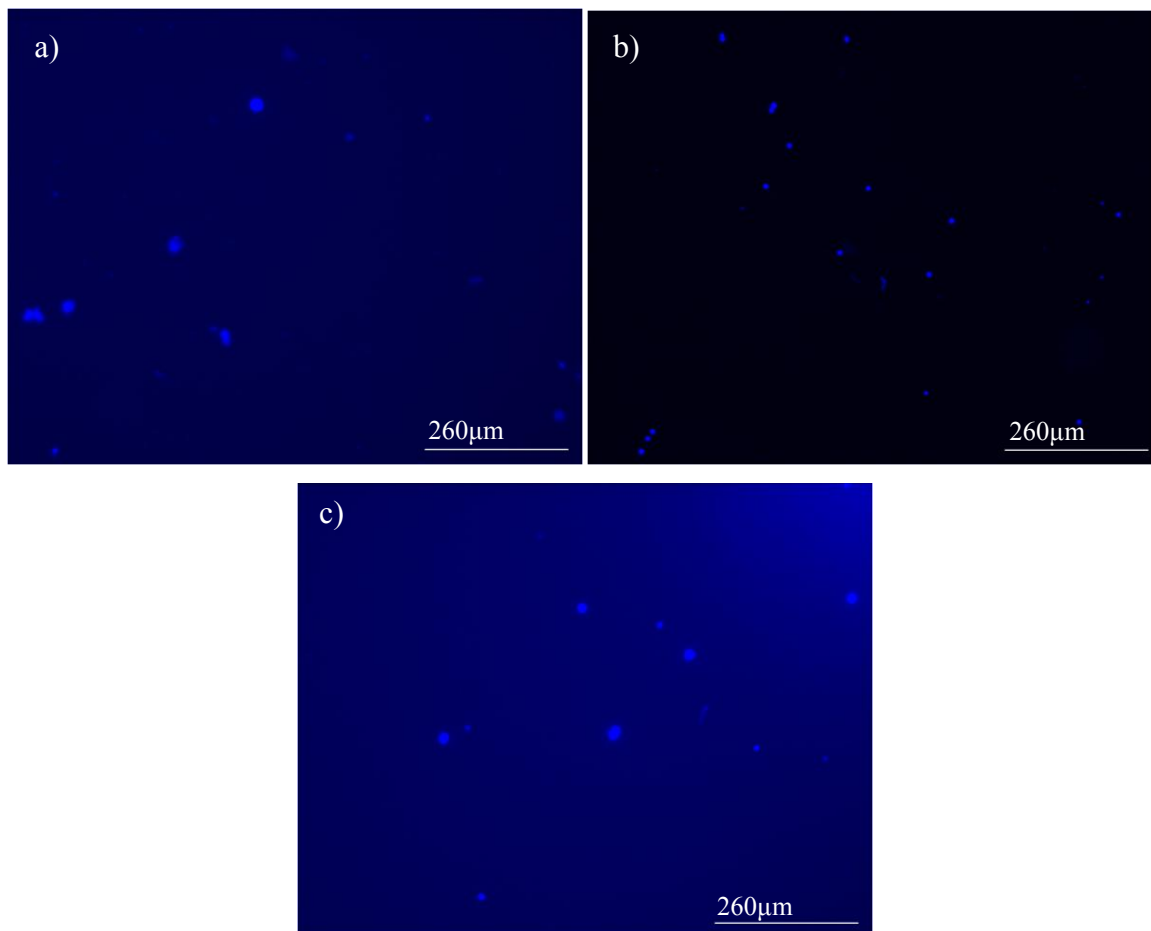


Figura 3.16. Microscopia de fluorescência das superfícies PA4 a), PA5 b) e PA11c) após 14 dias de testes *in vitro*.

No que concerne a sobrevivência das células é visível que nas mesmas superfícies quase todas as células se apresentam num estado apoptótico, representado pelos pequenos círculos azuis bem definidos, contrariamente ao que acontece quando é usada a poli-L-lisina (Figura 3.17 c). No caso, particular da superfície PA 11, é visível que a taxa de mortalidade celular é claramente superior as restantes superfícies, o que está de acordo com o observado na análise por SEM.

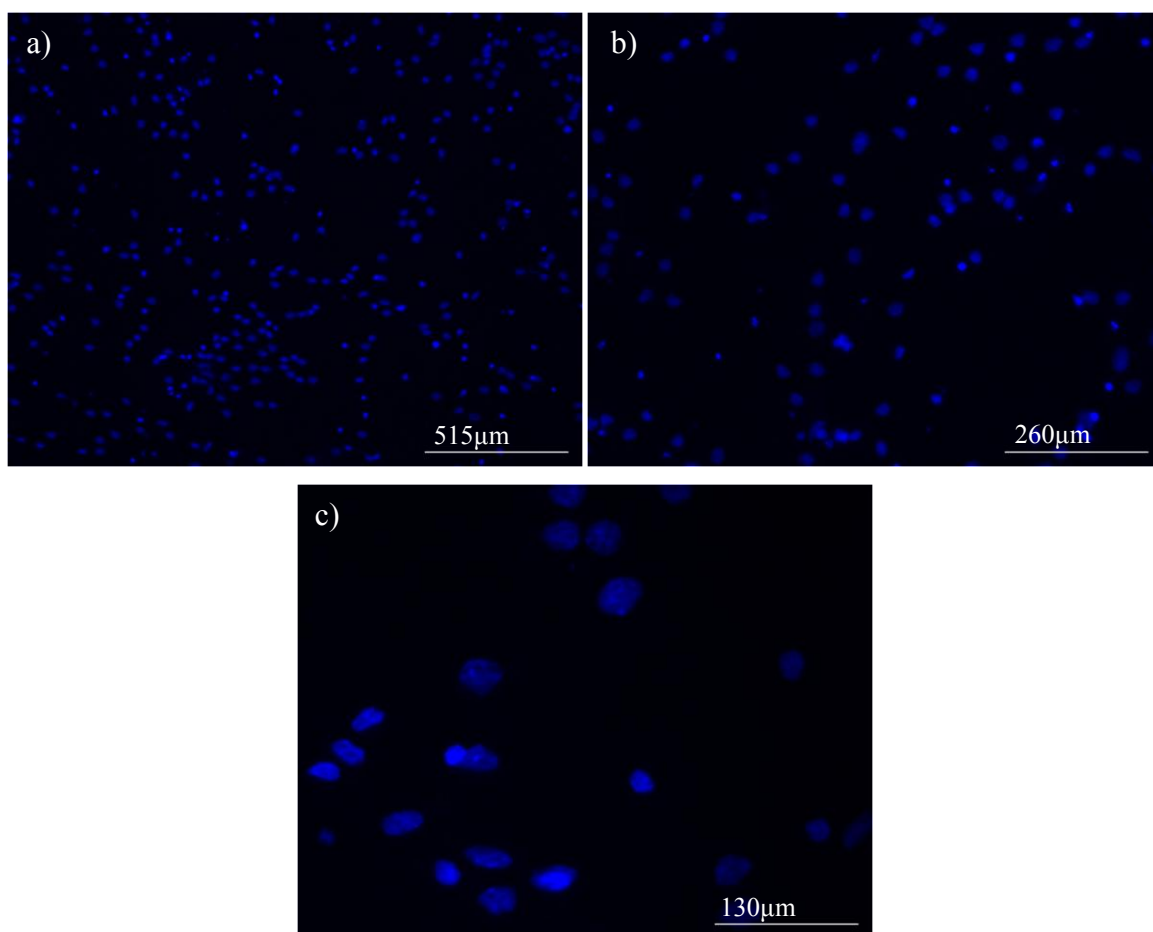


Figura 3.17. Microscopia de fluorescência de superfície modificada com PLL após 14 dias de testes *in vitro*.

Estes resultados evidenciam que as superfícies não são de todo favoráveis á adesão e proliferação celulares das células neuronais.

No caso da superfície PA 6, não foi possível caracterizar as células por microscopia de fluorescência, possivelmente devido à cor mais escura desta superfície, em relação às anteriormente referidas, como é visível na Figura 3.18. Este facto pode estar relacionado com a interferência da cor do filme fino com a fluorescência do corante utilizado.



Figura 3.18. Fotografia digital das superfícies utilizadas nos testes *in vitro*.

Deste modo a superfície PA6 foi observada em microscopia óptica, como apresentado na Figura 3.19.

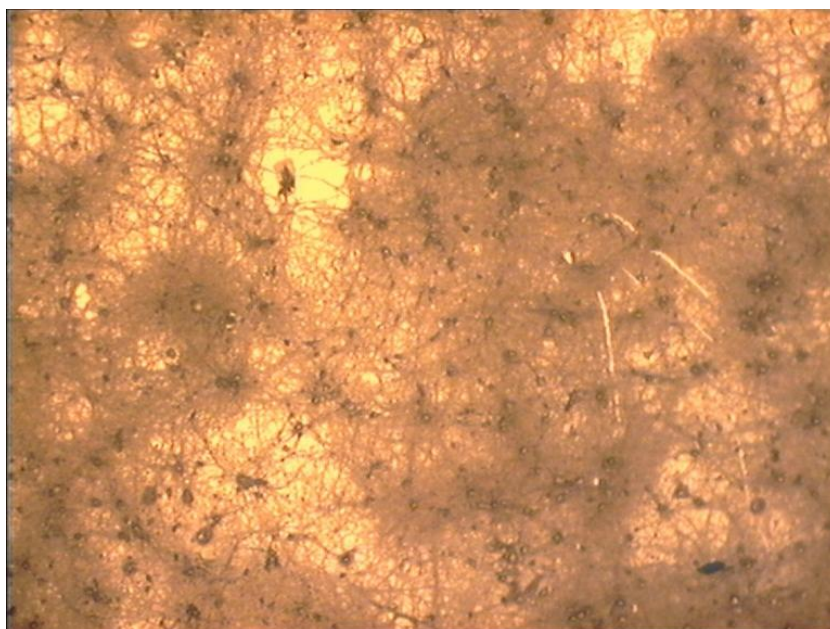


Figura 3.19. Microscopia óptica da superfície PA6 após 14 dias de testes *in vitro*.

A imagem permite a observação de um elevado número de células neuronais aderidas à superfície, uma boa diferenciação celular com um desenvolvimento significativo de axónios, e a formação de uma rede neuronal com algum grau de complexidade.

Estes resultados são concordantes com o que foi observado por SEM e sugerem que uma carga superficial positiva é efetivamente essencial para que ocorram níveis de adesão e proliferação celulares semelhantes aos observados na superfície modificada com poli-L-lisina.

CONCLUSÕES

O objetivo do presente estudo consistiu na modificação permanente de superfícies, por pulverização catódica r.f magnetron com poliamida 6,6, a sua caracterização e a avaliação do comportamento de células do córtex de embrião de rato nas superfícies produzidas.

Do trabalho desenvolvido as principais conclusões podem ser sumariadas como se segue:

- a pulverização catódica r.f magnetron possibilita a deposição de revestimentos a partir de um alvo de poliamida 6,6, tanto em atmosfera inerte como em atmosfera reativa;
- os filmes finos são todos caracterizados pela ausência de ordem estrutural e pela incorporação de grupos químicos funcionais distintos dos do material maciço;
- a molhabilidade, avaliada pelo ângulo de contacto estático com água, é muito semelhante para todas as superfícies e apenas ligeiramente inferior à avaliada no material maciço;
- as concentrações relativas dos grupos químicos funcionais presentes nas superfícies desenvolvidas conferem-lhes cargas superficiais muito distintas que variam entre -80mV e +16 mV;
- os testes *in vitro* com células do córtex de embrião de rato mostraram uma relação evidente com a carga superficial, pois apenas se observou a formação de uma rede neuronal na superfície com carga superficial positiva;
- a modificação por pulverização catódica das lamelas de vidro é permanente para as condições testadas e com desempenho semelhante ao de superfícies modificadas com PLL utilizadas na cultura de células em Neurociências.

Como complemento ao trabalho desenvolvido, e num estudo futuro, seria interessante reproduzir os filmes finos que conduziram aos melhores resultados nos testes *in vitro* mas sem a cor que os mesmos apresentaram e que impediram a caracterização por imunocitoquímica (PA6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kam, L., Shain, W., Turner, J. N., Bizios, R., (2001), “Axonal outgrowth of hippocampal neurons on micro-scale networks of polylysine-conjugated laminin”, *Biomaterials* 22, pp. 1049-1054
- [2] Lakard, S., *et. al.* (2004), “Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials”, *Bioelectrochemistry* 62, pp. 19– 27
- [3] Sun, Y., *et. al.* (2012), “Surface Coating as a Key Parameter in Engineering Neuronal Network Structures In Vitro”, *Biointerphases* 7, pp. 29
- [4] Vogt, A., Lauer, L., Knoll, W., Offenhäusser, A., (2003), “Micropatterned Substrates for the Growth of Functional Neuronal Networks of Defined Geometry”, *Biotechnology Progress*, 19, pp. 1562-1568
- [5] Jun, S., (2007), “Low-density neuronal networks cultured using patterned poly-l-lysine on microelectrode arrays”, *Journal of Neuroscience Methods* 160, pp. 317–326
- [6] Heiduschka, P., (2001), “Defined adhesion and growth of neurones on artificial structured substrates”, *Electrochimica Acta* 47, pp. 299–307
- [7] Chu, P., Saito, H., Abe, K., (1995), “Polyamines promote regeneration of injured axons of cultured rat hippocampal neurons”, *Brain Research* 673, pp. 233-241
- [8] Lakard, S., *et. al.* (2005), “Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications”, *Biosensors and Bioelectronics* 20, pp. 1946–1954

-
- [9] Vogt, A., Lauer, L., Knoll, W., Offenhäusser, A., (2003) “Micropatterned Substrates for the Growth of Functional Neuronal Networks of Defined Geometry”, *Biotechnology Progress*. 19, pp. 1562-1568
- [10] Young, Tai-Horng., Hu, Wei-Wen., (2003), “Covalent bonding of lysine to EVAL membrane surface to improve survival of cultured cerebellar granule neurons”, *Biomaterials* 24, pp. 1477–1486
- [11] Kim, Y., Lee, Y., (2012), “Differential Expressions of Synaptogenic Markers between Primary Cultured Cortical and Hippocampal Neurons”, *Experimental Neurobiology*, 2, pp. 61-67.
- [12] Young, T., Chang, H., Lin, D., Cheng, L., (2010), “Surface modification of microporous PVDF membranes for neuron culture”, *Journal of Membrane Science* 350, pp. 32–41
- [13] Li, H., *et. al.* (2013), “The Effect of Amino Density on the Attachment, Migration, and Differentiation of Rat Neural Stem Cells In Vitro”, *Molecules Cells* 35, pp. 436-443
- [14] Feng, X., *et. al.* (2003), “The RF plasma polymer of lysine and the growth of human nerve cells on its surface”, *Surface & Coatings Technology* 171, pp. 96–100
- [15] Young, T., Lin, C., Cheng, L., Hsieh, C., (2001), “Preparation of EVAL membranes with smooth and particulate morphologies for neuronal culture”, *Biomaterials* 22, pp.1771-1777
- [16] Bayliss, S.C., Buckberry, L.D., Tobin, M.J., Fletcher, I., (1999), “The culture of neurons on silicon”, *Sensors and Actuators Sensors and Actuators A: Physical* 74, pp. 139–142
- [17] Anderson, J. M., McNally, A., (2011), “Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage Interactions”, *Semin Immunopathol* 33, pp.221–233

-
- [18] Ruardij, T., Goedbloed, M., Rutten, W., (2000), “Adhesion and Patterning of Cortical Neurons on Polyethylenimine- and Fluorocarbon Coated Surfaces”, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol. 47, pp. 12
- [19] Yoshida, S., Hagiwara, K., Hasebe, T., Hotta, A., (2013), “Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release”, Surface & Coatings Technology 233, pp. 99–107
- [20] Artemenko, A., *et. al.* (2011), “Deposition of amino-rich coatings by RF magnetron sputtering of Nylon: Investigation of their properties related to biomedical applications”, Surface & Coatings Technology 205, pp. S529-S533
- [21] Finke, B., *et. al.* (2011), “Plasma processes for cell-adhesive titanium surfaces based on nitrogen-containing coatings”, Surface & Coatings Technology 205, pp. S520–S524
- [22] Cestelli, A., Savettieri, G., Salemi, G., Liegro, I., (1992), “Neuronal Cell Cultures: A Tool for Investigations in Developmental Neurobiology”, Neurochemical Research, Vol 17, No. 12, pp. 1163-1180
- [23] Sorribas, H., Braun, D., Leder, L., Sonderegger, P., (2001), “Adhesion proteins for a tight neuron–electrode contact”, Journal of Neuroscience Methods 104, pp. 133–141
- [24] Crompton, K.E., *et.al.* (2007), “Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering”, Biomaterials 28, pp. 441–449
- [25] Young, T., *et. al.* (2008), “Immobilization of l-lysine on dense and porous poly(vinylidene fluoride) surfaces for neuron culture”, Desalination 234, pp. 134–143
- [26] Sigma-Aldrich, “Poly-L-lysine”, acessado em maio de 2014 <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/poly-lysine.html>
-

[27] MicroSurfaces, Inc, “Application note: high density polylysine coated surfaces for immobilization of DNA or cells”, acessado em maio de 2014 <http://www.proteinslides.com/polylysine.html>

[28] Matsunami Glass IND., LTD., “PLL(Poly-L-Lysine) coated glass slide”, acessado em maio de 2014 http://www.matsunami-glass.co.jp/english/life/clinical_g/data14.html

[29] Kousal, J., *et. al.* (2009), “In Situ Diagnostics of RF Magnetron Sputtering of Nylon”, *Plasma Processes and Polymers*, 6, S803–S807

[30] Hanûs, J., Ceccone, G., Rossi, F., (2012), “Amino-rich Plasma Polymer Films Prepared by RF Magnetron Sputtering”, *Plasma Processes and Polymers*.

[31] DuPont, “Product guide and properties”, acessado em maio de 2014 <http://plastics.dupont.com/plastics/pdflit/europe/zytel/ZYTPPe.pdf>

[32] DuPont Nylon, “Nylon 66 Polymer for industrial, textile and furnishing applications”, acessado em maio de 2014 <http://home.comcast.net/~roadska/nylon66.pdf>

[33] Li, L., Chen, G., Liu, W., Li, J., Zhang, S., (2009), “The anti-dripping intumescent flame retardant finishing for nylon-6,6 fabric”, *Polymer Degradation and Stability* 94, pp. 996–1000

[34] Kisner, A., *et. al.* (2013), “Chemical functionalization of polyamide 6.6 fabrics”, *Reactive & Functional Polymers* 73, pp. 1349–1356

[35] Tušek, L., Nitschke, M., Werner, C., Stana-Kleinschek, K., Ribitsch, V., (2001), “Surface characterisation of NH₃ plasma treated polyamide 6 foils”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 195, pp. 81–95

-
- [36] MatWeb Material Property Data, “ GEHR Plastics Pa 66”, acessado em maio de 2014 <http://www.matweb.com/search/datasheettext.aspx?matguid=576fc5a54ec14050adfb7f456c3b057e>
- [37] <http://www.reocities.com/Vienna/choir/9201/polimeros.htm> acessado em maio de 2014
- [38] Park, J., Lakes, R.S., (2007), “Biomaterials: An introduction”, Springer, New York, 3, 174-205, pp. 292-302
- [39] Kylián, O., *et. al.* (2009), “Deposition of amino-rich thin films by RF magnetron sputtering of nylon”, Journal of Physics D: Applied Physics. 42
- [40] Artemenko, A., *et. al.* (2012), “Effect of sterilization procedures on properties of plasma polymers relevant to biomedical applications”, Thin Solid Films 520, pp. 7115–7124
- [41] Alonso, J., Goldmann, W., (2003), “Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology”, Life Sciences 72, pp. 2553–2560
- [42] Ramé-hart, “Information on contact angle”, acessado em abril de 2014 <http://www.ramehart.com/contactangle.htm>
- [43] Bukšek, H., Luxbacher, T., Petrinić, I., (2010), “Zeta Potential Determination of Polymeric Materials Using Two Differently Designed Measuring Cells of an Electrokinetic Analyzer”, Acta Chimica Slovenica, 57, pp. 700–706
- [44] Lin, W., *et. al.* (2009), “Tuning the surface potential of gold substrates arbitrarily with self-assembled monolayers with mixed functional groups”, Physical Chemistry Chemical Physics, 11, pp. 6199–6204

- [45] Kylián, O., *et. al.* (2011), “Deposition of amino-rich coatings by RF magnetron sputtering of Nylon: In-situ characterization of the deposition process”, *Surface & Coatings Technology* 205, pp. S558-S561
- [46] Karam, L., (2013), “Study of nisin adsorption on plasma-treated polymer surfaces for setting up materials with antibacterial properties”, *Reactive & Functional Polymers* 73, pp. 1473–1479
- [47] Finke, B., Schröder, K., Ohl, A., (2009), “Structure Retention and Water Stability of Microwave Plasma Polymerized Films from Allylamine and Acrylic Acid”, *Plasma Processes and Polymers*. 6, pp. S70–S74
- [48] Nebe, B., *et. al.* (2007), “Improved initial osteoblast functions on amino-functionalized titanium surfaces”, *Biomolecular Engineering* 24, pp. 447–454
- [49] Truica-Marasescu, F., Wertheimer, M., (2008), “Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films for Biomedical Applications”, *Plasma Processes. Polymers*, 5, pp. 44–57
- [50] Král, M., Ogino, A., Nagatsu, M., (2008), “Effect of hydrogen on amino group introduction onto the polyethylene surface by surface-wave plasma chemical modification”, *Journal of Physics D: Applied Physics* 41, pp. 105213
- [51] Choukourov, A., *et. al.* (2004), “Properties of Amine-Containing Coatings Prepared by Plasma Polymerization”, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 92, pp. 979–990
- [52] Siow, K., Britcher, L., Kumar, S., Griesser, H., (2006), “ Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review”, *Plasma Processes and Polymers*. 3, pp. 392–418
- [53] LaSurface Database, “XPS: Element or energy”, acessado em junho 2014 <http://www.lasurface.com/database/elementxps.php>

[54] Mahdi, H., (2010), “An FTIR Study of Characterization of Neat and UV Stabilized Nylon 6, 6 Polymer Films”, *Global Journal of Pure and Applied Sciences* vol.24

[55] Arfin, T., Falch, A., Kriek, R.,(2012), “ Evaluation of charge density and the theory for calculating membrane potential for a nano-composite nylon-6,6 nickel phosphate membrane”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14, pp. 16760–16769

[56] Gashti, M., Assefipour, R., Kiumarsi, A., (2013) “Enzymatic Surface Hydrolysis of polyamide 6,6 with mixtures of proteolytic and lipolytic enzymes”, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43:8, pp. 798-814

[57] Sengupta, R., Bandyopadhyay, A., Sabharwal, S., Chaki, T., (2005), “Polyamide-6,6/in situ silica hybrid nanocomposites by sol–gel technique: synthesis, characterization and properties”, *Polymer* 46, pp. 3343–3354

[58] Oliveira, F., Zille, A., Souto, P., (2014), “Dyeing mechanism and optimization of polyamide 6,6 functionalized with double barrier discharge (DBD) plasma in air”, *Applied Surface Science* 293, pp. 177– 186

[59] Cooper, S., Coogan, M., Everall, N., Priestnall, I., (2001) “A polarized μ -FTIR study on a model system for nylon 6,6: implications for the nylon Brill structure”, *Polymer* 42, pp. 10119-10132

[60] Ramazani,S., Morshed, M., Ghane, M., (2001), “ Effect of service temperature on structure and mechanical properties of polyamide 6& 66 tyre cords”, *Journal of Polymer Research*, 18, pp. 781-792.

[61] Tang, C., Kwon,Y., Leckie, J., (2009), “ Effect of membrane chemistry and coating layer on physiochemical properties of thin film composite polyamide RO and NF membranes - I. FTIR and XPS characterization of polyamide and coating layer chemistry”, *Desalination* 242, pp. 149–167

-
- [62] Herrero, M., *et. al.* (2010), “Structural characterization and thermal properties of polyamide 6.6/Mg, Al/adipate-LDH nanocomposites obtained by solid state polymerization”, *Journal of Solid State Chemistry* 183, pp. 1645–1651
- [63] Parvinzadeh, M., Assefipour, R., Kiumarsi, A., (2009), “Biohydrolysis of nylon 6,6 fiber with different proteolytic enzymes”, *Polymer Degradation and Stability* 94, pp. 1197–1205
- [64] Guerrini, L., Branciforti, M., Canova, T., Bretas, R., (2009), “Electrospinning and Characterization of Polyamide 66 Nanofibers with Different Molecular Weights”, *Materials Research*, Vol. 12, No. 2, pp. 181-190
- [65] Bessada, R., Silva, G., Paiva, M., Machado, A., (2011), “Functionalization of PET and PA6.6 woven fabrics”, *Applied Surface Science* 257, pp. 7944–7951
- [66] LIM, L., Britt, I., Tung, M., (1999), “Sorption and Transport of Water Vapor in Nylon 6,6 Film”, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 71, pp. 197–206
- [67] “Handbook of Chemistry and Physics”, David R. Lide Editor-in-chief, 85th edition, CRC Press, Florida, 2004
- [68] Kumar, B., RAO, T., (2012), “AFM studies on surface morphology, topography and texture of nanostructured zinc aluminium oxide thin films”, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, vol.7, pp. 1881-189.
- [69] Piedade, A. P. (2001), “A Pulverização Catódica e os Biomateriais”, Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra
- [70] Teisala, H., Tuominen, M., Kuusipalo, J., (2013), “ Superhydrophobic Coatings on Cellulose-Based Materials: Fabrication, Properties, and Applications”, *Advanced Materials Interfaces*.

[71] Nitta, Y., (2008), “Diamond-like carbon thin film with controlled zeta potential for medical material application”, *Diamond & Related Materials* 17, pp. 1972–1976

[72] Bauman, M., Kosab, A., Lobnika, A., Petrinić, I., Luxbacher, T., (2013), “Nanofiltration membranes modified with alkoxy silanes: Surface characterization using zeta-potential”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 422, pp. 110– 117

[73] Myllymaa, S., *et. al.* (2010), “Surface characterization and in vitro biocompatibility assessment of photosensitive polyimide films”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76, pp. 505–511

APÊNDICES

APÊNDICE A - XPS

Desconvolução dos espectros de alta resolução de XPS

Revestimento PA4

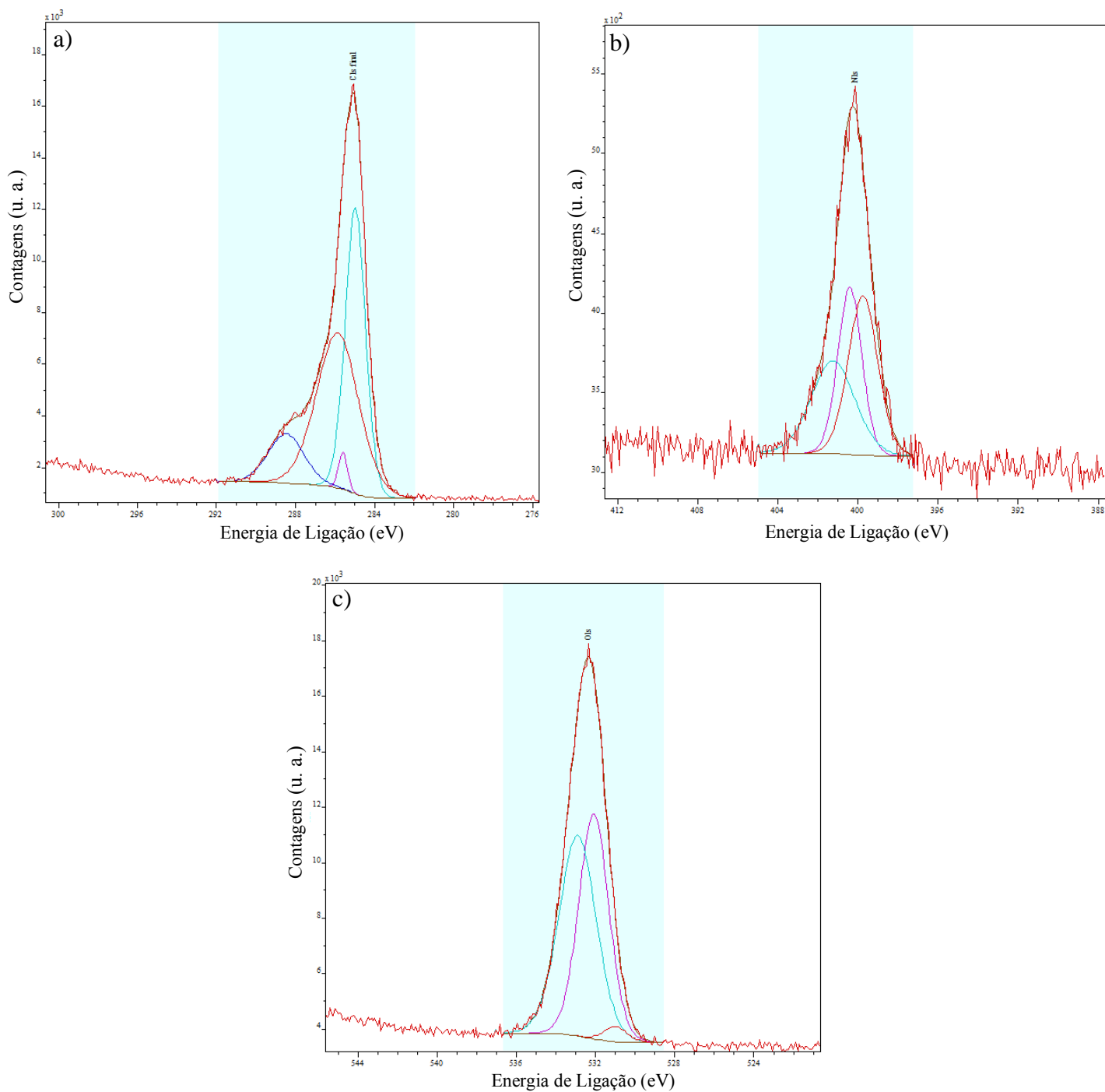


Figura A.1. Desconvolução dos espectros XPS da superfície PA4: C1s a), N1s b) e O1s c)

Revestimento PA5

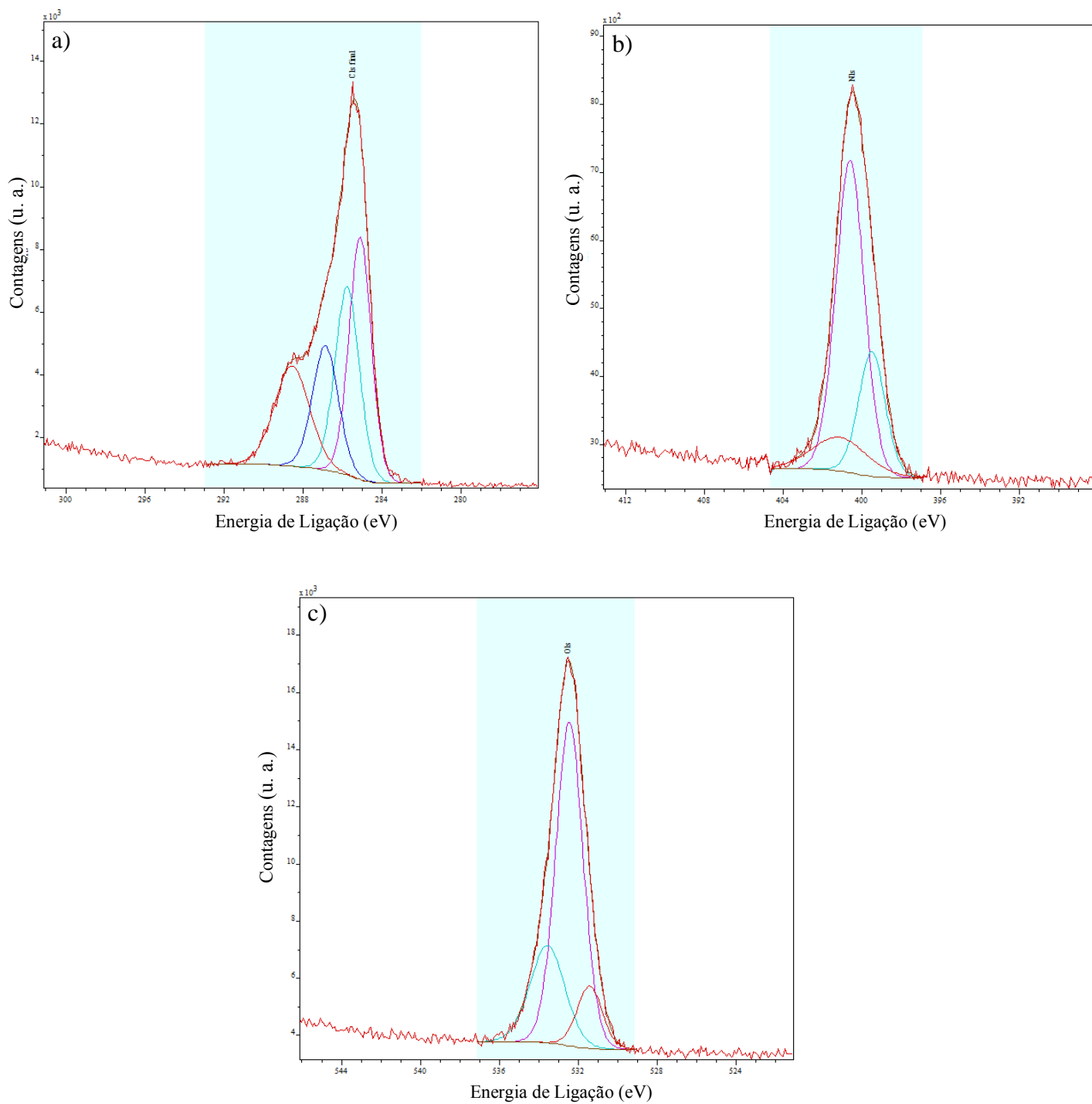


Figura A.2. Desconvolução dos espectros XPS da superfície PA5: C1s a), N1s b) e O1s c)

Revestimento PA6

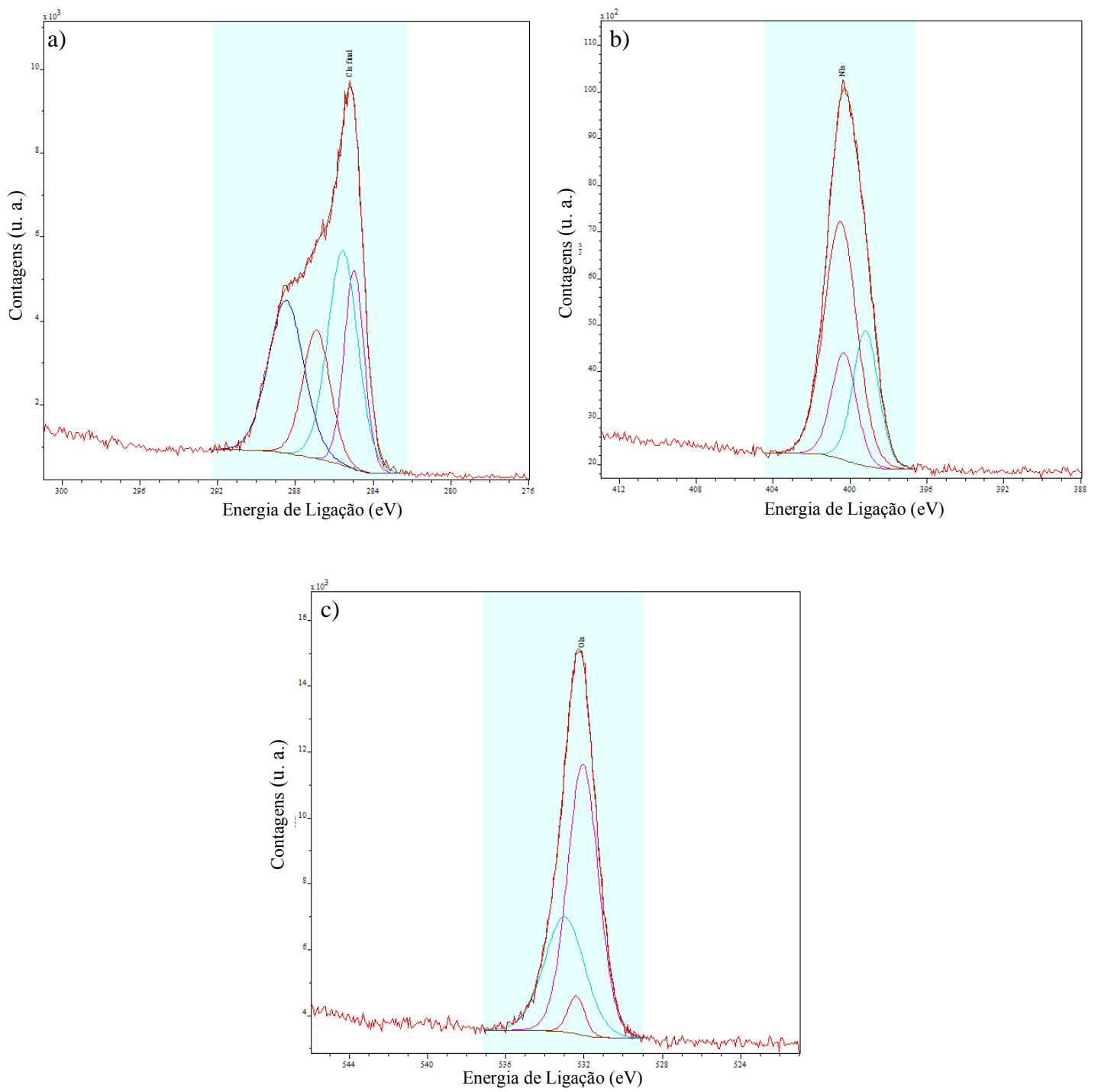


Figura A.3. Desconvolução dos espectros XPS da superfície PA6: C1s a), N1s b) e O1s c)

Revestimento PA7

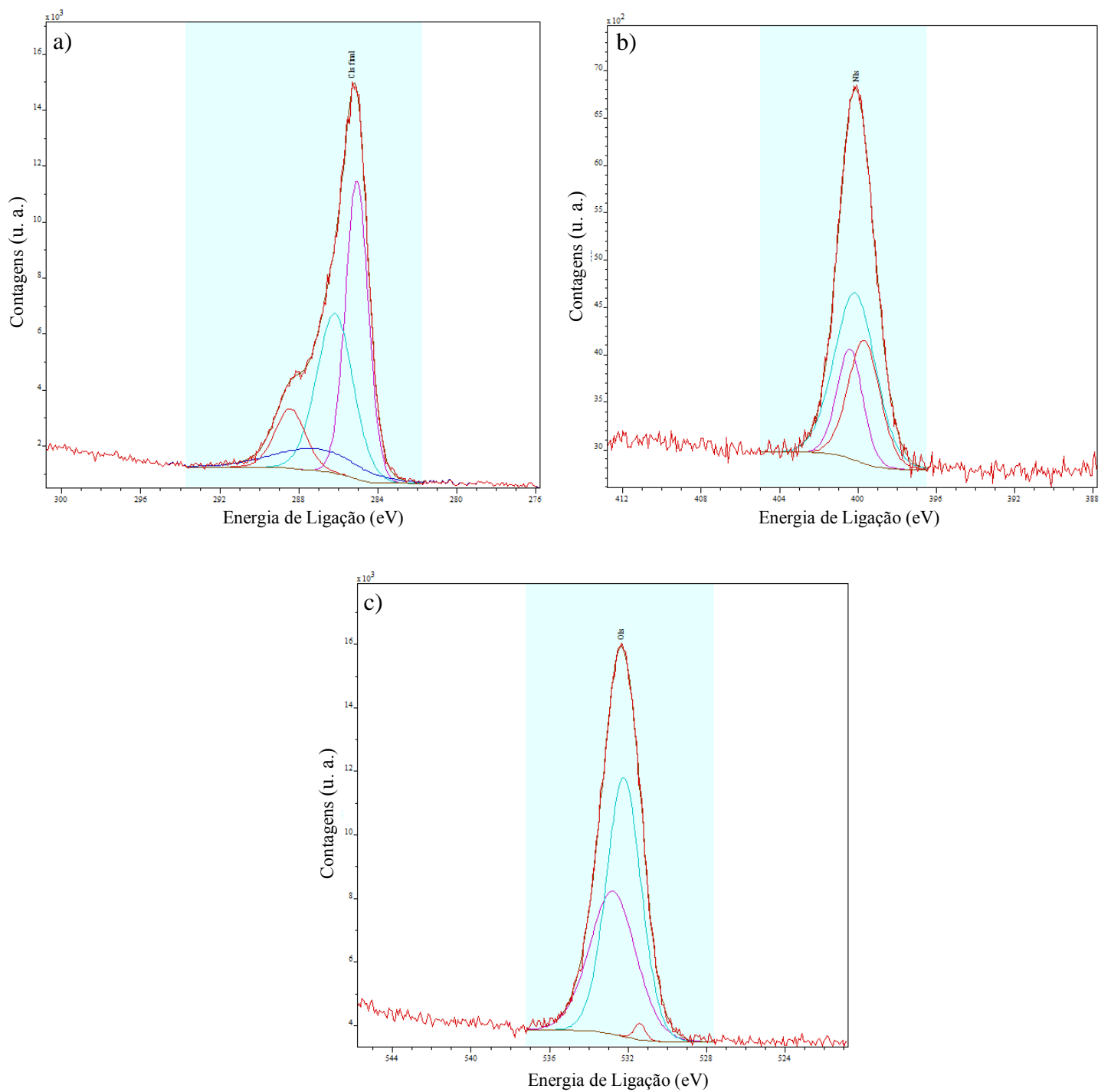


Figura A.4. Desconvolução dos espectros XPS da superfície PA7: C1s a), N1s b) e O1s c)

Revestimento PA9

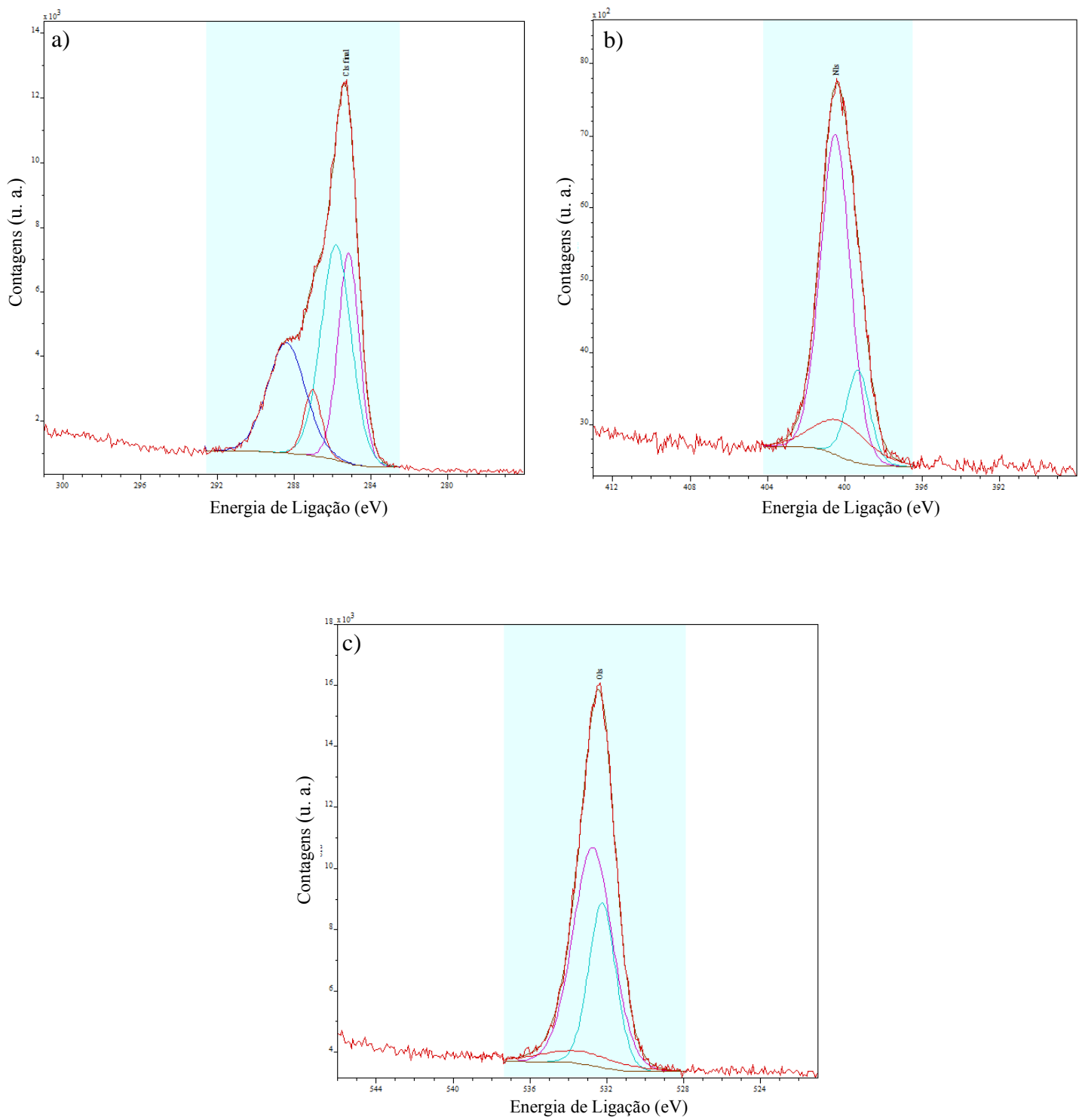


Figura A.5. Desconvolução dos espectros XPS da superfície PA9: C1s a), N1s b) e O1s c)

Revestimento PA10

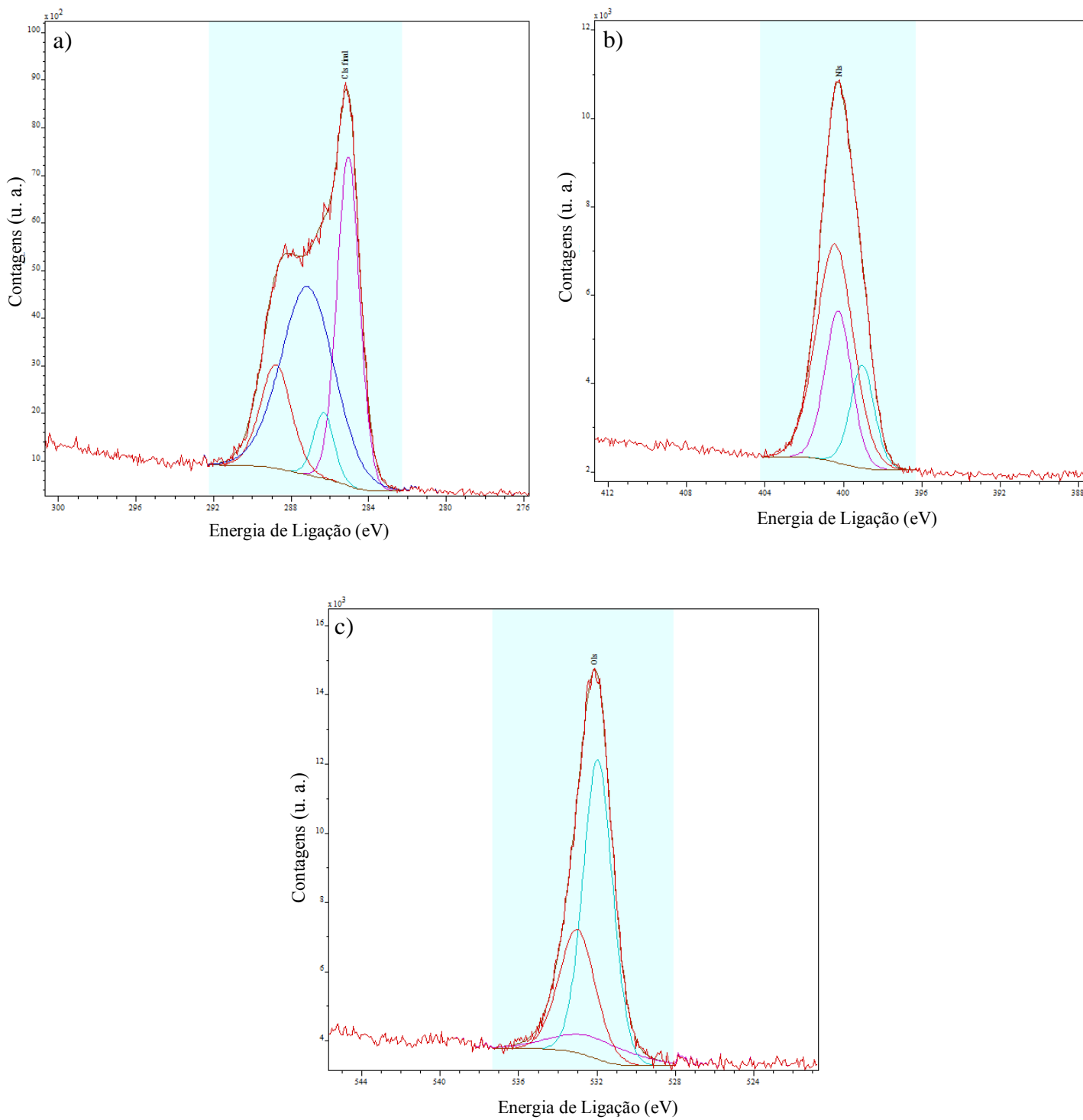


Figura A.6. Desconvolução dos espectros XPS da superfície PA10: C1s a), N1s b) e O1s c)

Revestimento PA11

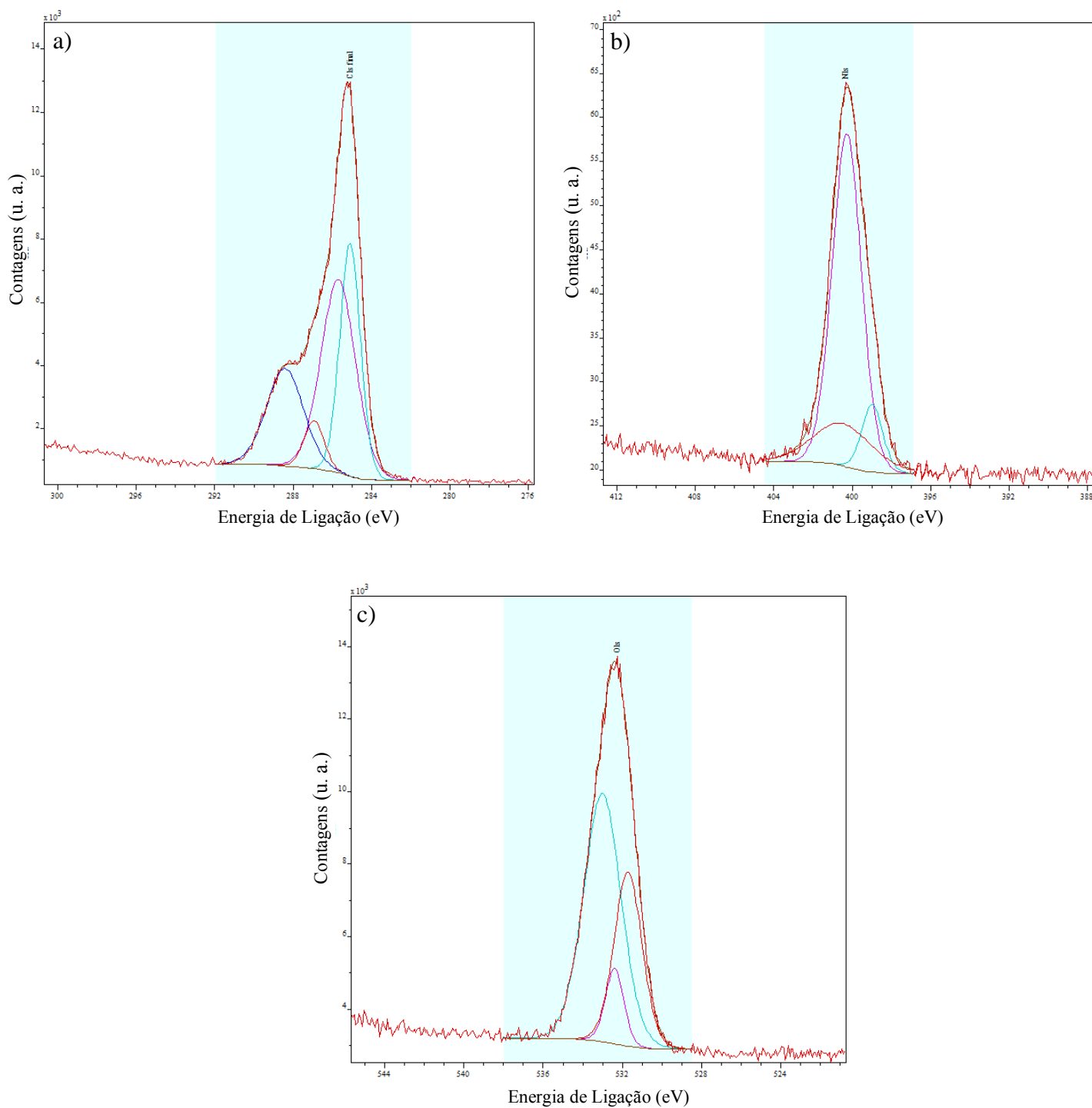


Figura A.7. Desconvolução dos espectros XPS da superfície PA11: C1s a), N1s b) e O1s c)

APÊNDICE B - FTIR

Espectros de FTIR

Revestimento PA4

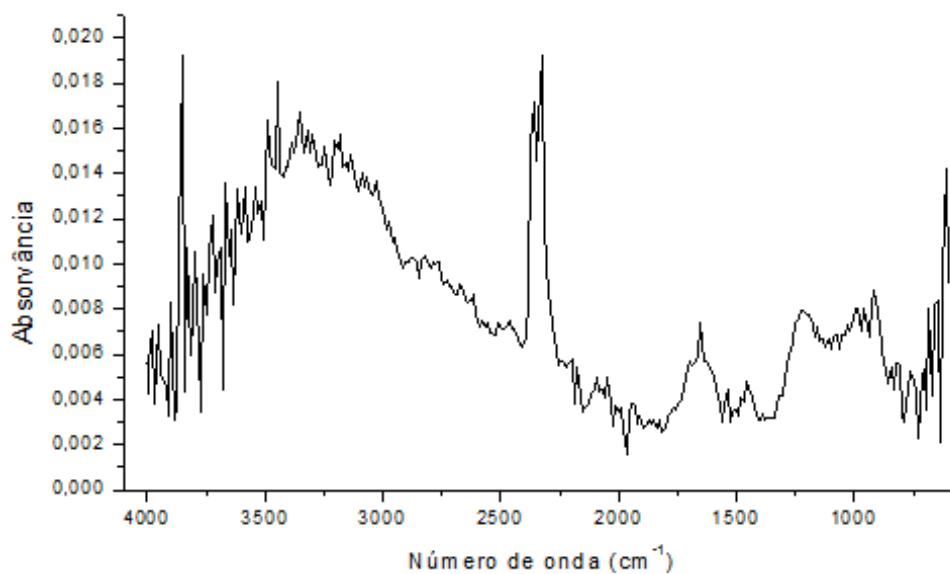


Figura B.1. Espectro de FTIR do filme fino PA4

Revestimento PA5

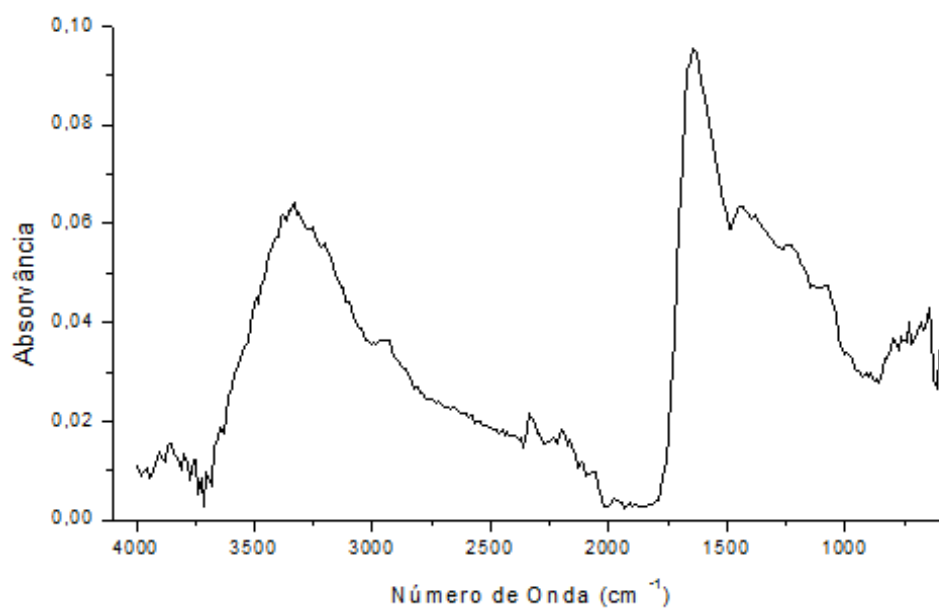
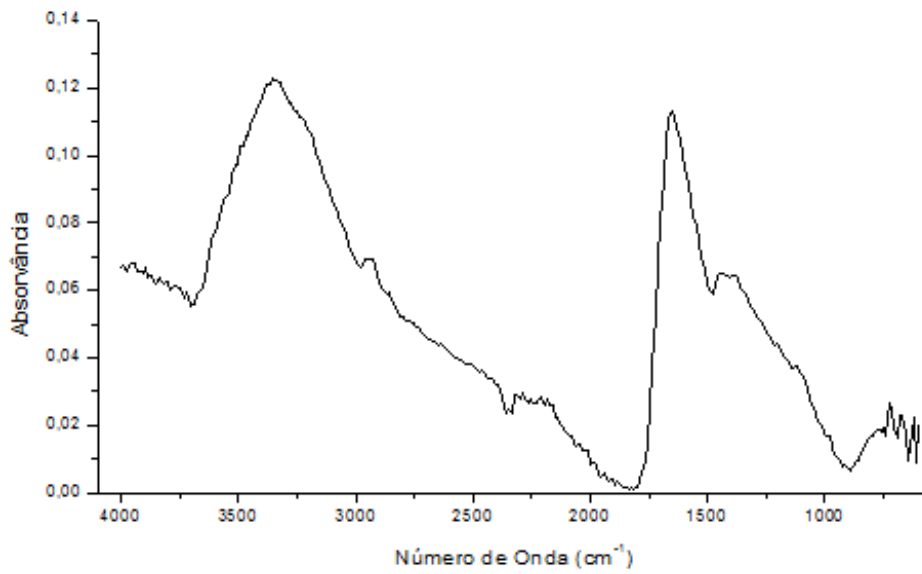
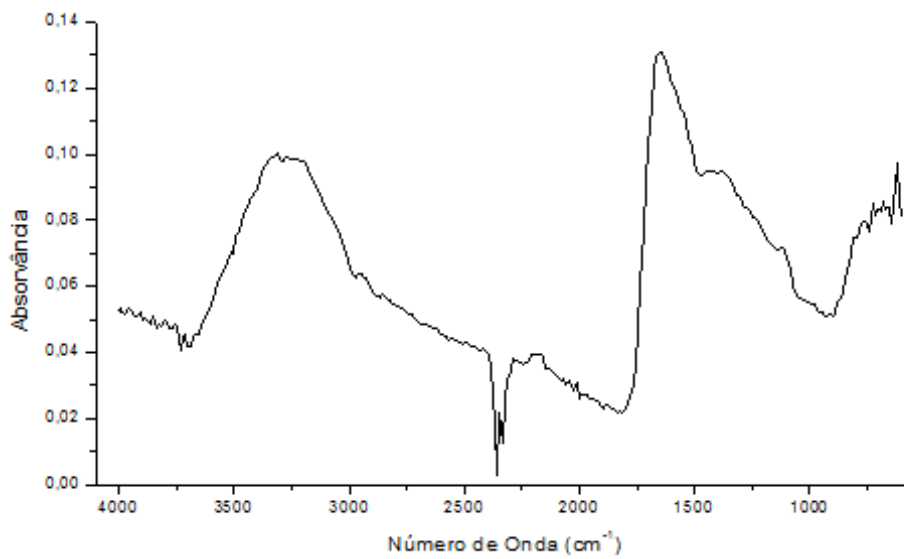


Figura B.2. Espectro de FTIR do filme fino PA5

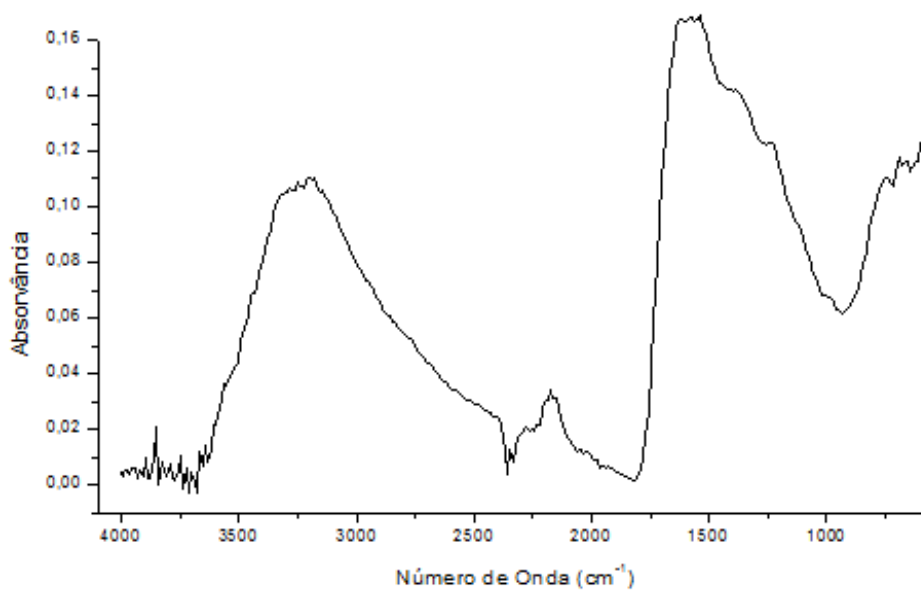
Revestimento PA7

**Figura B.3.** Espectro de FTIR do filme fino PA7

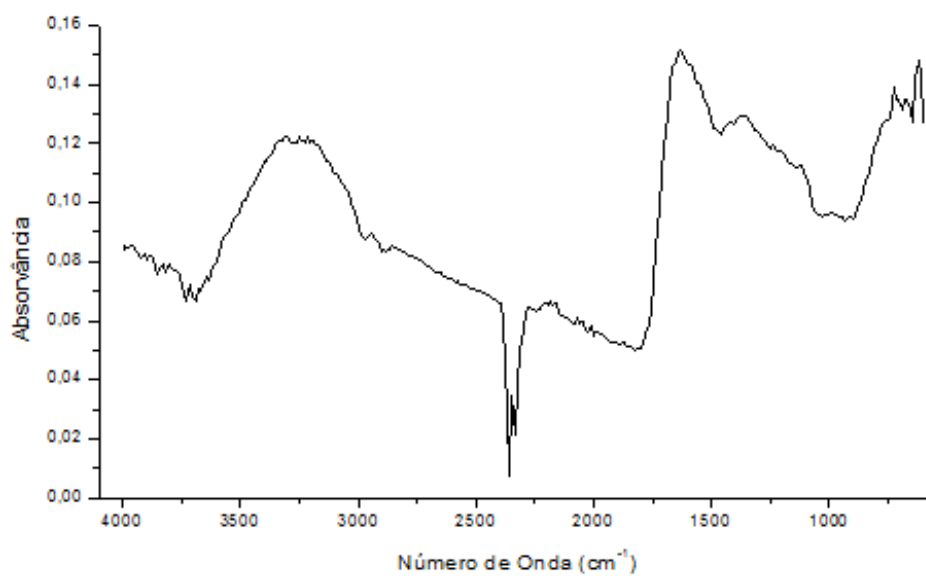
Revestimento PA9

**Figura B.4.** Espectro de FTIR do filme fino PA9

Revestimento PA10

**Figura B.5.** Espectro de FTIR do filme fino PA10

Revestimento PA11

**Figura B.6.** Espectros de FTIR do filme fino PA11

Revestimento PA13

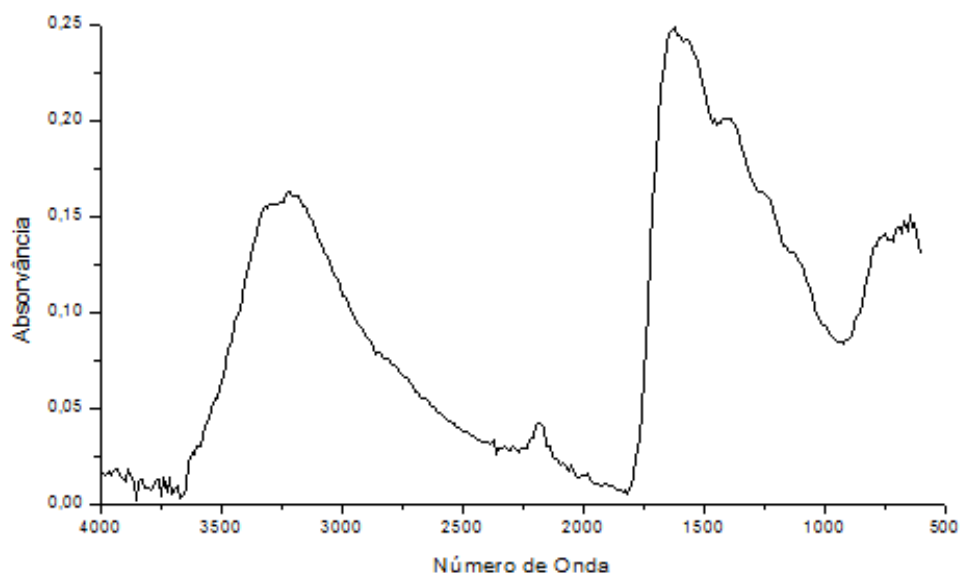


Figura B.7. Espectros de FTIR do filme fino PA13

APÊNDICE C - SEM

Resultados de SEM

Revestimento PA4

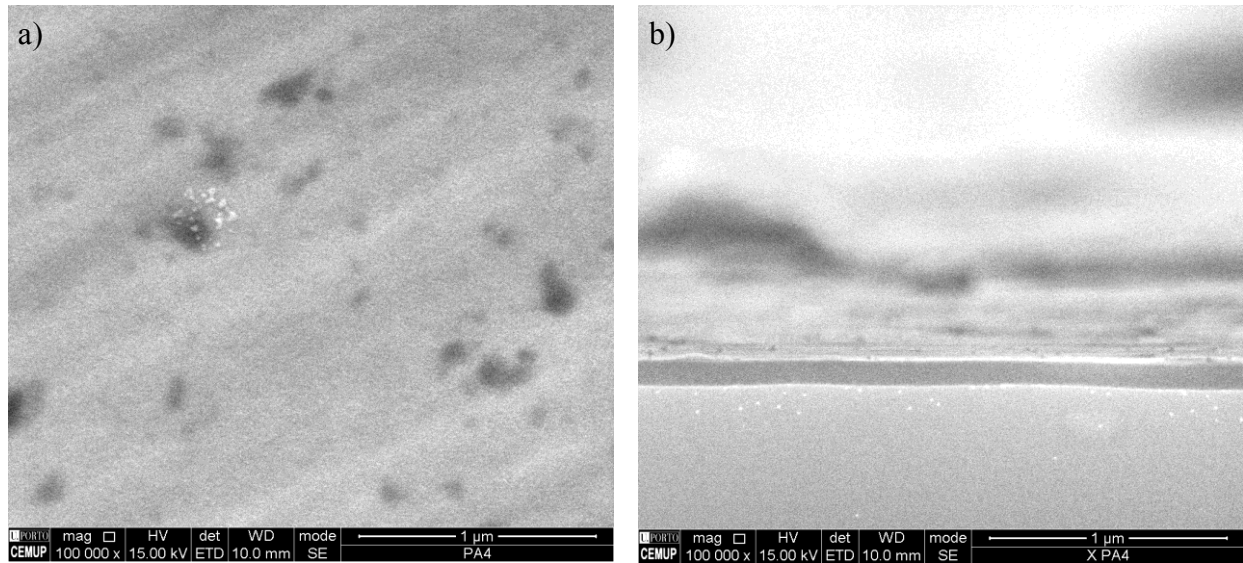


Figura C.1. Micrografias de superfície a) e de secção transversal b) do filme fino da superfície PA4.

Revestimento PA5

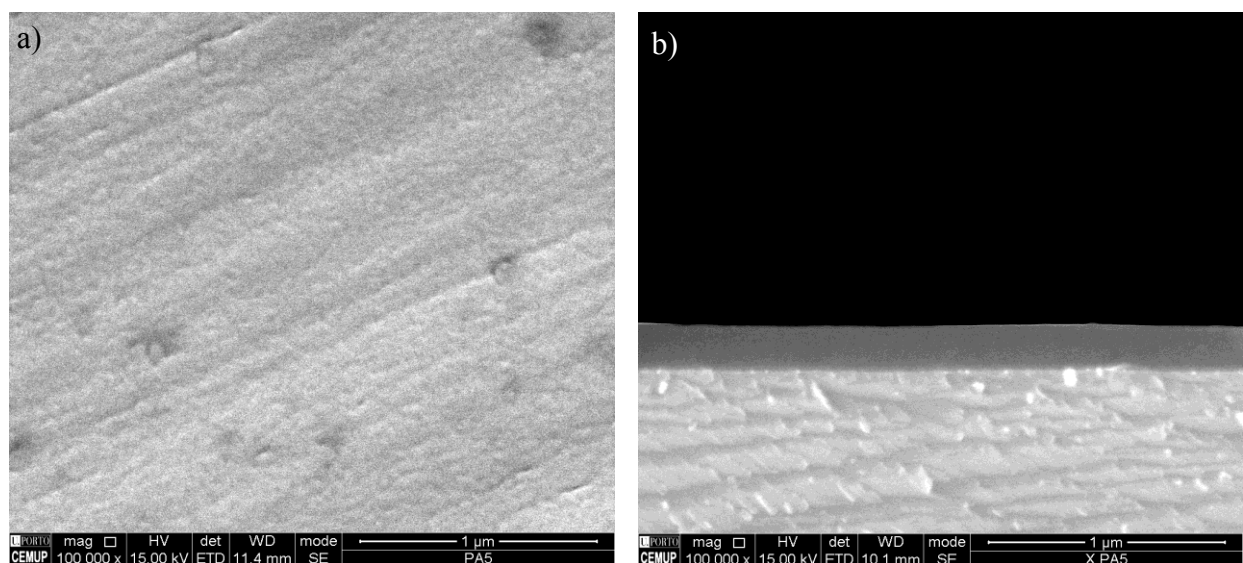


Figura C.2. Micrografias de superfície a) e de secção transversal b) do filme fino da superfície PA5.

Revestimento PA6

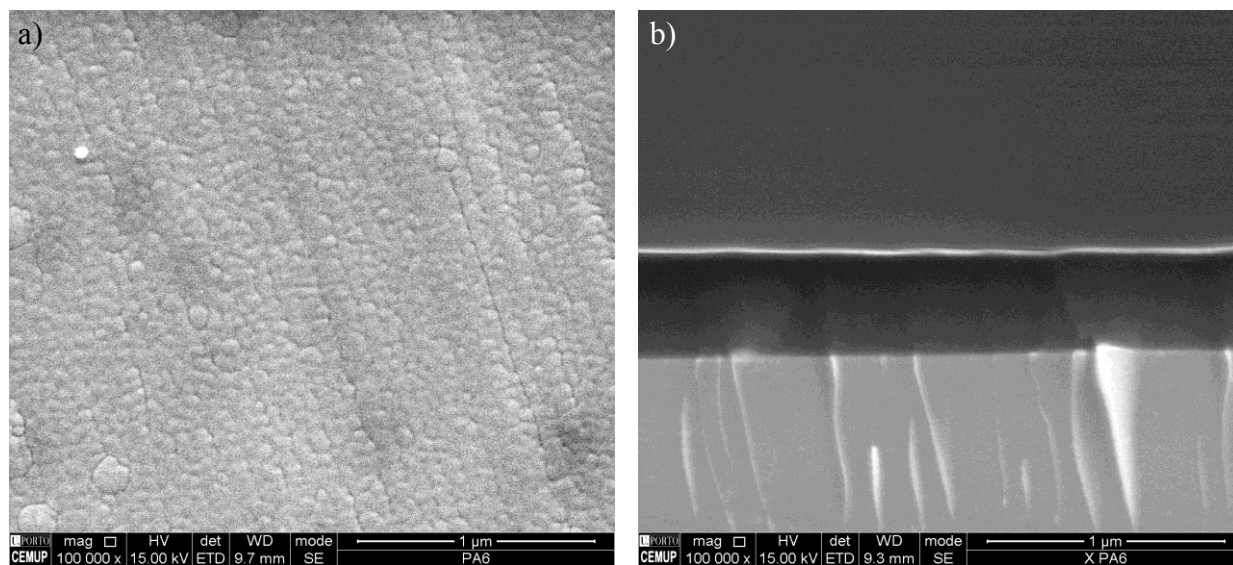


Figura C.3. Micrografias de superfície a) e de secção transversal b) do filme fino da superfície PA6.

Revestimento PA7

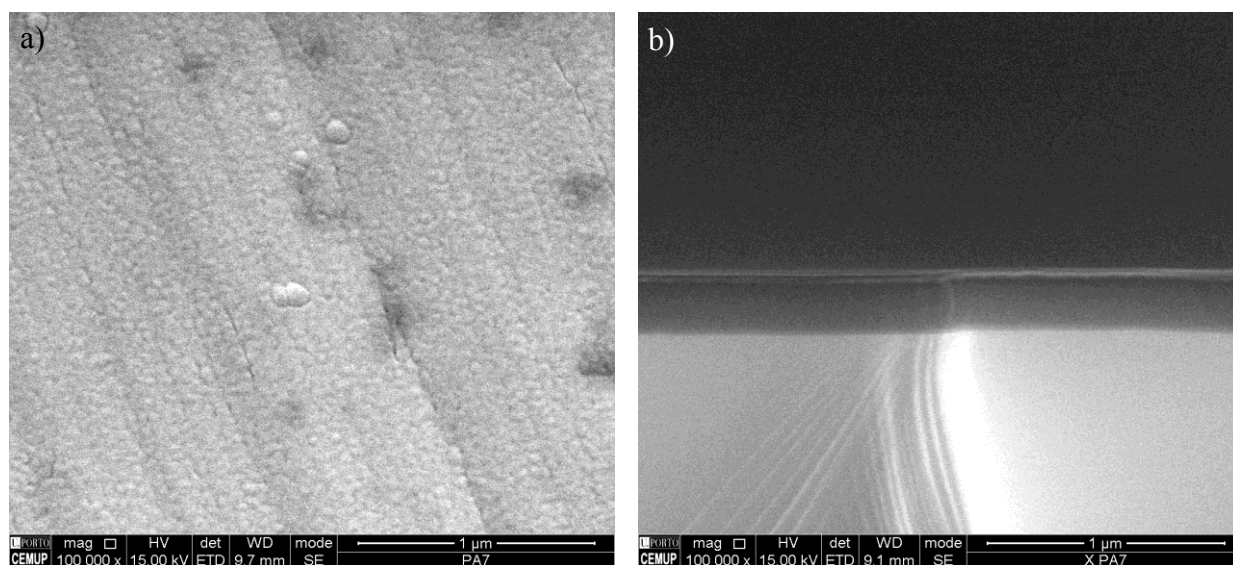


Figura C.4. Micrografias de superfície a) e de secção transversal b) do filme fino da superfície PA7.

Revestimento PA9

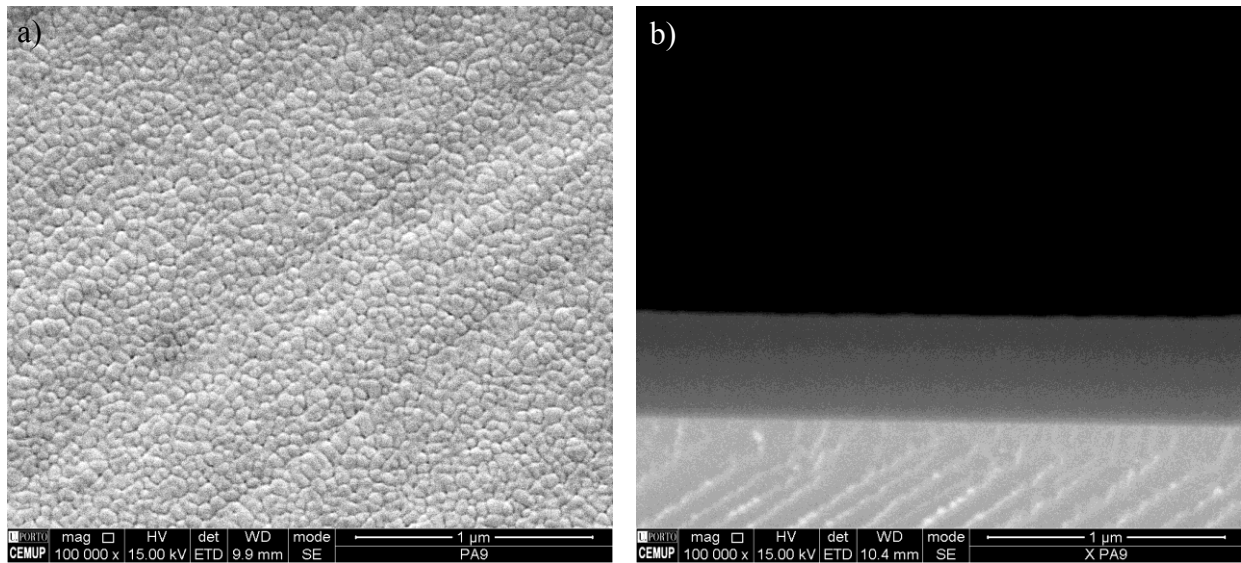


Figura C.5. Micrografias de superfície a) e de secção transversal b) do filme fino da superfície PA9.

Revestimento PA10

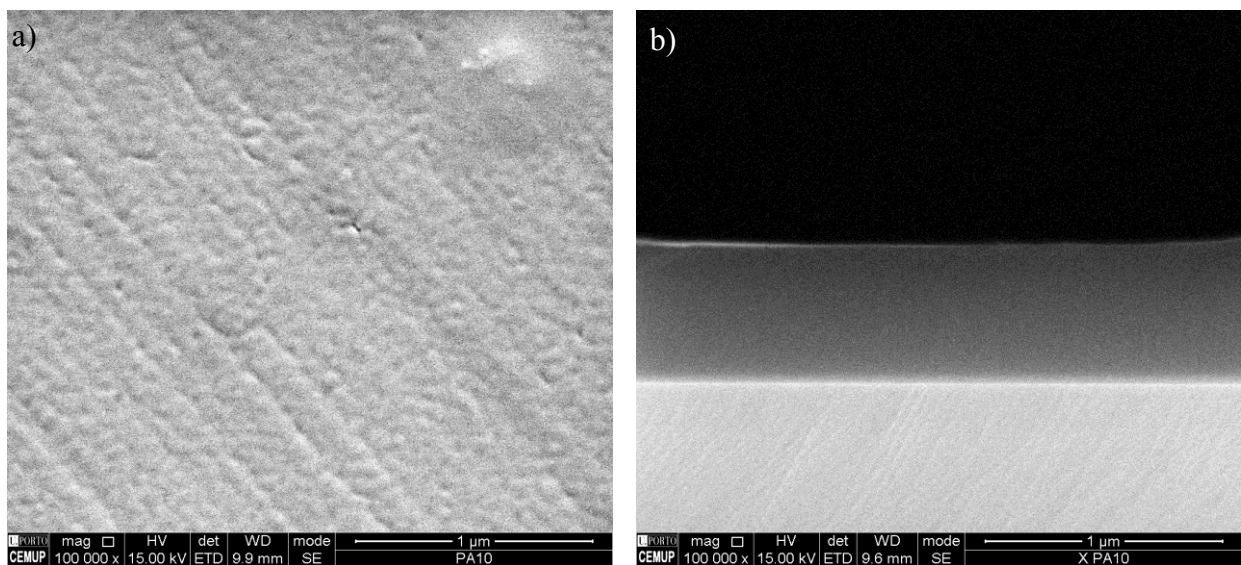


Figura C.6 Micrografias de superfície a) e de secção transversal b) do filme fino da superfície PA10.

Revestimento PA11

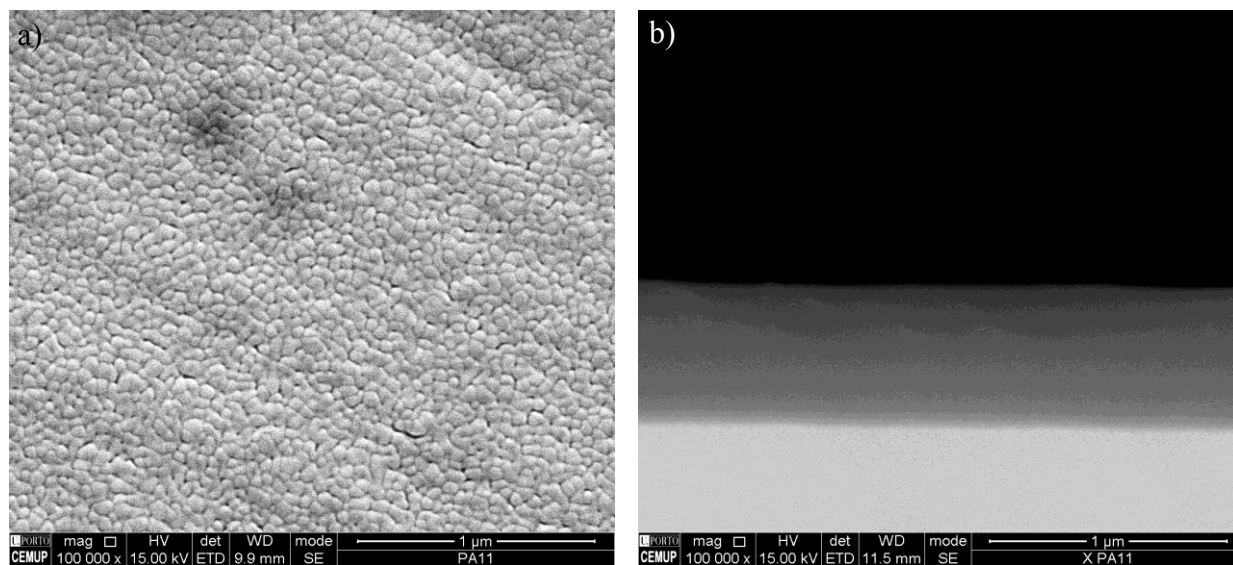


Figura C.7. Micrografias de superfície a) e de secção transversal b) do filme fino da superfície PA11.

Revestimento PA12

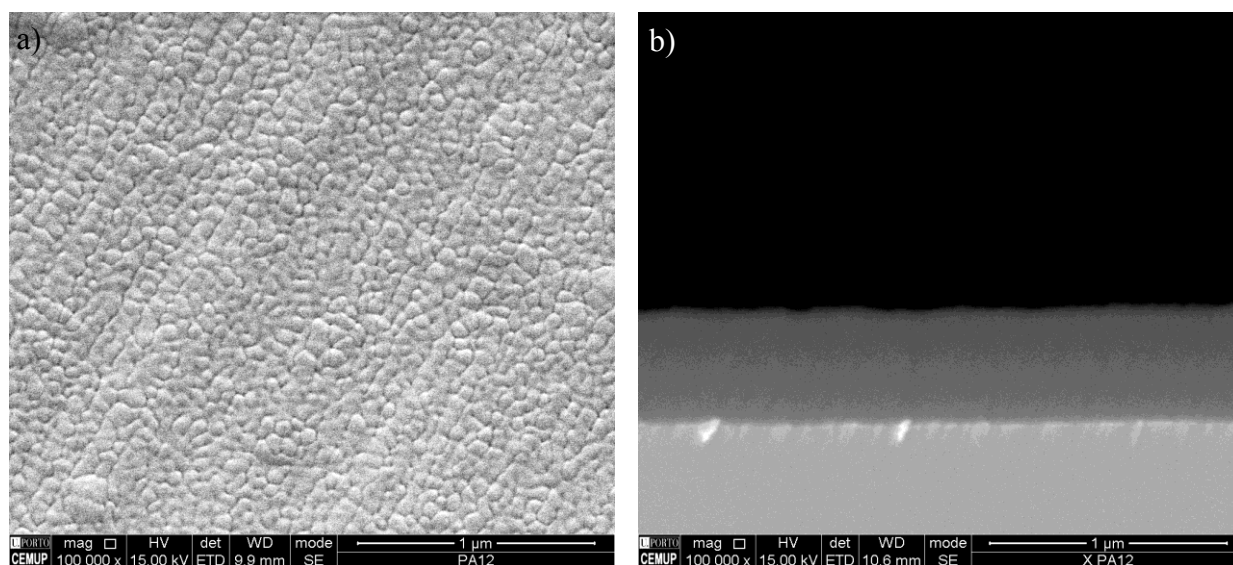


Figura C.8. Micrografias de superfície a) e de secção transversal b) do filme fino da superfície PA12.

APÊNDICE D - AFM

Imagens de AFM

Revestimento PA5

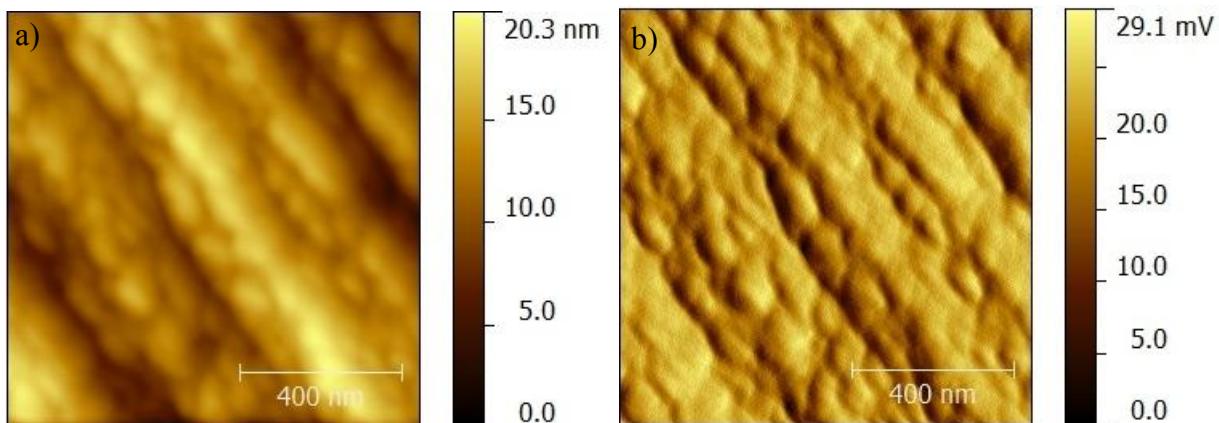


Figura D.1. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA5

Revestimento PA6

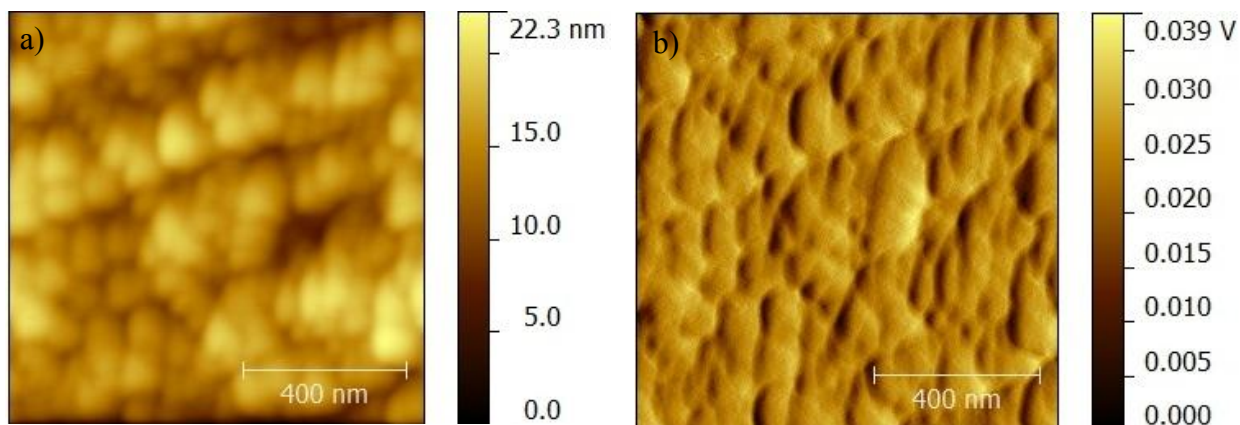


Figura D.2. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA6.

Revestimento PA7

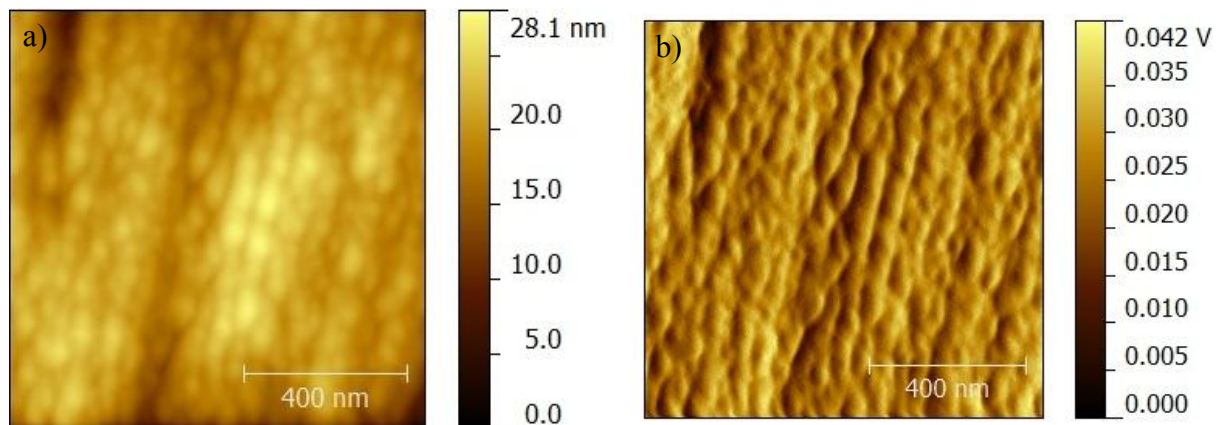


Figura D.3. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA7

Revestimento PA9

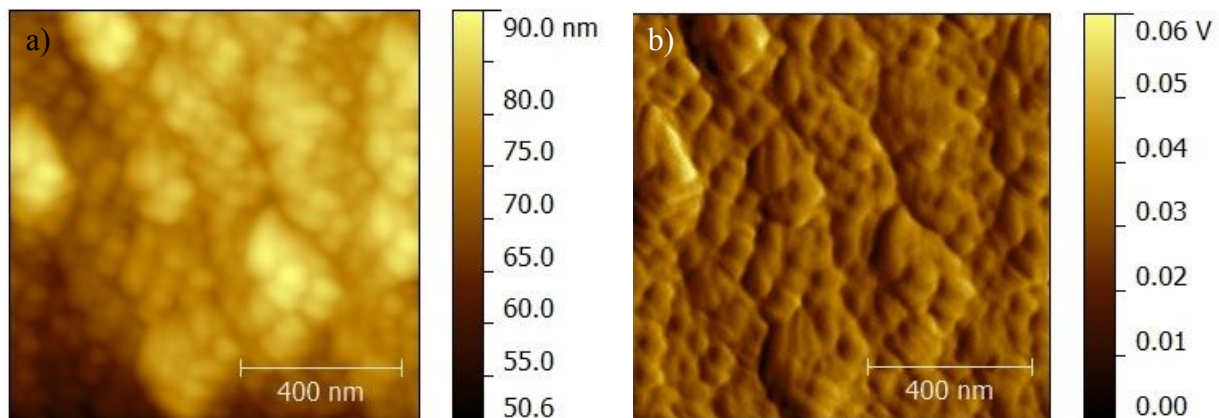


Figura D.4. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA9

Revestimento PA11

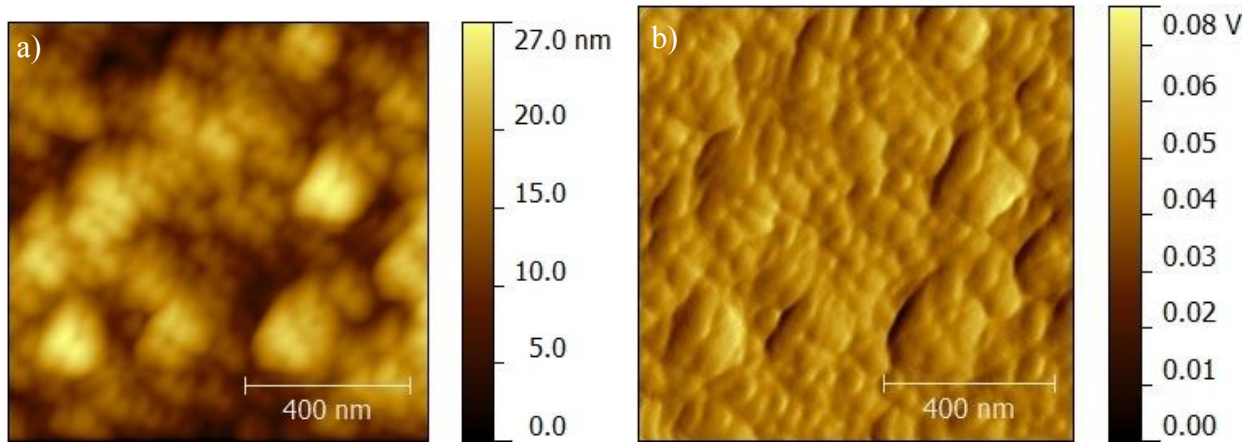


Figura D.5. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA11.

Revestimento PA12

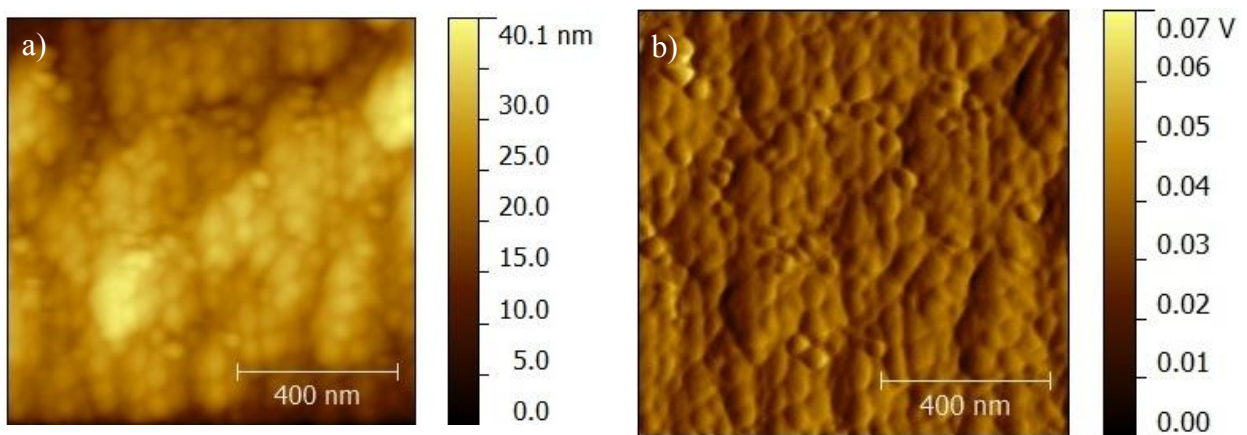


Figura D.6. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA12.

Revestimento PA13

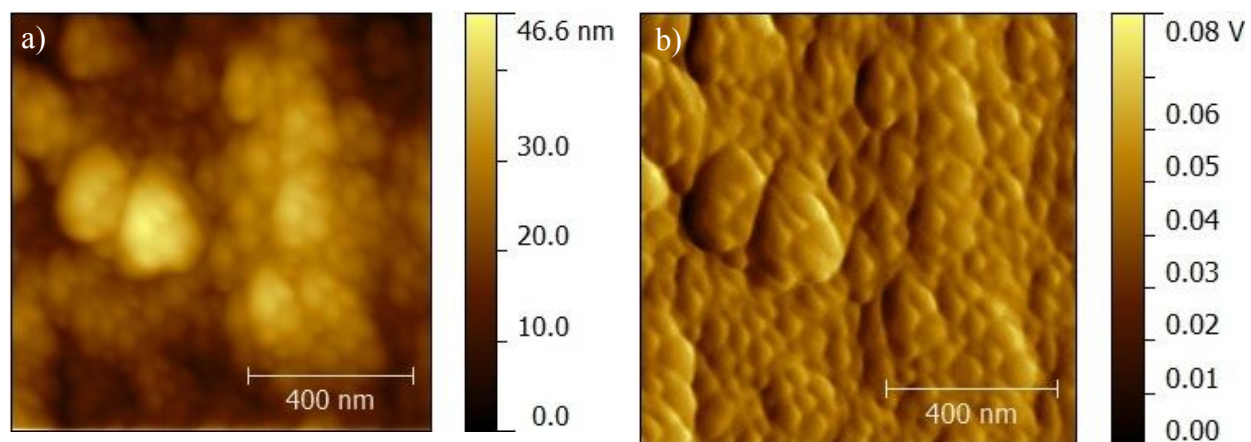


Figura D.7. Imagens topográfica (a) e de amplitude (b) da superfície PA13