



Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
Engenharia Biomédica

Modificação de superfícies para controlo da adesão celular

Áurea Alexandra Craveiro Teixeira de Jesus Matias

Coimbra, Junho de 2007



Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
Engenharia Biomédica

Modificação de superfícies para controlo da adesão celular



Trabalho realizado por: Áurea Alexandra Craveiro Teixeira de Jesus Matias

Trabalho orientado por: Prof. Doutora Helena Gil

Coimbra, Junho de 2007

Imagem retirada de [1]

Agradecimientos

“A amizade é o único cimento capaz de manter o mundo unido.”

Começo por agradecer à Prof. Doutora Helena Gil por ter aceite a minha candidatura para este projecto, que me fez crescer intelectualmente. Pela simpatia com que sempre me recebeu e pelo exemplo de dedicação e competência.

À Engenheira Patrícia, pela orientação, pelo constante apoio, disponibilidade e cooperação.

A todos os elementos do grupo de polímeros pela forma com que me acolheram, em especial à Rose, minha colega de curso, pelo apoio prestado em todo o processo de adaptação e a todos os funcionários do Departamento de Engenharia Química.

Aos meus pais, irmãos e namorado pelo apoio, carinho, ajuda e compreensão.

Não poderia deixar de agradecer também a todas as pessoas com quem trabalhei no IBILI principalmente à Prof. Doutora Ana Cristina que desde o início se mostrou bastante interessada no meu trabalho, disponibilizou imenso tempo para realizar os testes que eu necessitava e utilizou os seus conhecimentos em prol do meu trabalho. O meu muito obrigado ao Prof. Doutor Emanuel Ponciano pelo tempo dispendido para me ajudar na elaboração deste trabalho. Agradeço ainda à Ana Rita, Sónia e Cláudia que fizeram imenso esforço para que fosse possível concretizar este trabalho.

A Todos o meu Muito Obrigado.

Resumo

O objectivo deste trabalho prendeu-se essencialmente com a modificação de duas poliuretanas, o *Elastollan 685A* e o *Elastollan 1180A50*. Pretende-se modificar estes materiais, que são inicialmente inertes, para controlar a adesão celular. Futuramente, estas modificações serão aplicadas na construção de um biosensor constituído por pilares, desejando-se que as células adiram no topo e sejam repelidas na lateral dos pilares.

Numa primeira fase revestiram-se pedaços dos polímeros com algumas soluções, tais como, acetato butirato de celulose em acetona, etilcelulose em diclorometano-metanol, acetato celulose em diclorometano, poliestireno em THF e *elastollan* dissolvido em dimetilformamida. Testaram-se também todos os solutos anteriormente referidos, excepto o último, dissolvidos em clorofórmio. Com estes estudos pretendia-se saber quais as soluções de polímeros que ao revestirem as placas não lhes retiravam a transparência, nem as degradavam e aumentavam a adesão celular.

Numa segunda fase modificaram-se os polímeros com grupos hidroxilo (-OH) e carboxilo (-COOH). Para ligar os últimos à placa usaram-se dois ácidos, o ácido acrílico (AA) e o ácido monocloroacético (MCA). O primeiro deixava as placas com um pH muito baixo. Foram testadas algumas modificações para que o pH subisse, no entanto, com nenhuma delas se obtiveram os resultados esperados. Enxertaram-se, ainda, os materiais com a polilisina D e a polilisina L, e um aminoácido, a lisina. As placas mantiveram o seu aspecto normal após as modificações. Realizaram-se então vários revestimentos com estas substâncias usando diversos métodos, ultra-violeta (UV), absorção às placas com e sem grupos -OH e ligação covalente.

Por último, realizaram-se testes de adesão às placas que tinham apresentado melhores resultados, dezasseis experiências em caixas de vinte e quatro poços. Esses testes foram efectuados no Instituto de Biofísica/Biomatemática, do Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem (IBILI) – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), com fibroblastos humanos. O método usado foi o do brometo de 3 – (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazólio (MTT) e a leitura era realizada num leitor de microELISA SLT.

Após a realização dos testes concluiu-se então que os melhores resultados surgiram quando se utilizou a polilisina D ou L e se efectuou o revestimento por UV.

Lista de abreviaturas

AA – Ácido Acrílico

CDI – Carbodiimidazol

DEQ – Departamento de Engenharia Química

DMEM – *MegaCell Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfoxido

DOS – Dioxano

FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

IBILI – Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem

LSD – *Leas Square Difference*

MCA – Ácido Monocloroacético

MTT – brometo de 3 – (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio

PDL – Polilisina D

PEG – Polietilenoglicol

PHBV – Polihidroxibutirato

PLL – Polilisina L

PLLA – Poli (ácido láctico)

PS – Poliestireno

PVA – Poli (álcool vinílico)

PVC – Poli (cloreto de vinilo)

SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento

THF – Tetrahidrofurano

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	VII
Abreviaturas	XI
Índice	XV
Índice de Figuras	XXI
Índice de Tabelas	XXVII
Índice de Quadros	XXXI
Índice de Gráficos	XXXV

Capítulo I

1. Introdução	1
1.1. Poliuretanas	3
1.2. Métodos de modificação de superfícies	4
1.3. Estudos biológicos	8
1.4. Biosensor	14
1.5. Processamento de materiais	14
1.6. Técnicas de caracterização	16
1.6.1. SEM	16
1.6.2. Ângulos de contacto e Energias de Superfície	17
1.6.3. Capacidade de Absorção de Humidade (<i>Swelling</i>)	21
1.6.4. Degradação	21

Capítulo II

2. Reagentes	23
--------------------	----

Capítulo III

3. Procedimentos	29
3.1. Revestimento das placas por <i>Spin Coating</i>	31
3.1.1. Testes de solubilidade e Revestimentos das placas com soluções	31
3.2. Activação da superfície do material por enxerto	37
3.2.1. Modificação da superfície com grupos hidroxilo	37
3.2.2. Modificação da superfície com grupos carboxilo	38
3.2.3. Análise da Capacidade de Absorção de humidade (<i>Swelling</i>)	40
3.2.4. Análise da Degradação	40
3.2.5. Optimização das reacções com grupos carboxilos	41

3.2.6. Processamento das placas -----	43
3.2.7. Fotopolimerização do estireno e do ácido acrílico -----	43
3.2.8. Ligação de um aminoácido ou proteína às placas -----	43
3.2.8.1. Ligação da glicina -----	43
3.2.8.2. Ligação da lisina e das Polilisinas D e L -----	44
3.2.8.2.1. Modificação por UV -----	45
3.2.8.2.2. Modificação por absorção -----	45
3.2.8.2.3. Modificação por ligação covalente -----	46
3.3. Testes de adesão celular -----	46
3.3.1. Realização dos testes de adesão -----	49
3.3.2. Métodos -----	57
3.3.3. Análise Estatística -----	58

Capítulo IV

4. Resultados e Discussão-----	59
4.1. Revestimento das placas por <i>Spin Coating</i> -----	61
4.1.1. Testes de solubilidade e Revestimentos das placas com soluções -----	61
4.1.2. Tensões Superficiais das soluções -----	67
4.1.3. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície das modificações -----	68
4.2. Activação da superfície do material por enxerto -----	69
4.2.1. Modificação da superfície com grupos hidroxilo -----	69
4.2.2. Modificação da superfície com grupos carboxilo -----	69
4.2.3. Análise da Capacidade de Absorção de humidade (<i>Swelling</i>) -----	70
4.2.4. Análise da Degradação -----	72
4.2.5. Análise dos ângulos de contacto -----	81
4.2.6. Optimização das reacções com grupos carboxilos -----	82
4.2.7. Processamento das placas -----	86
4.2.8. Fotopolimerização do estireno e do ácido acrílico -----	87
4.2.9. Ligação de um aminoácido ou proteína às placas -----	87
4.2.9.1. Ligação da glicina -----	87
4.2.9.2. Ligação da lisina e das Polilisinas D e L -----	87
4.2.9.2.1. Modificação por UV -----	87
4.2.9.2.2. Modificação por absorção -----	88
4.2.9.2.3. Modificação por ligação covalente -----	88
4.2.10. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície das modificações -----	88

4.3. Testes de adesão celular -----	90
Capítulo V	
Conclusões -----	99
Trabalho Futuro -----	103
Referências Bibliográficas ¹ -----	105
Anexos -----	109
Anexo A – Frases de Risco e Segurança dos reagentes utilizados -----	111
Anexo B – Cálculos para a preparação da solução NaOH 6M e de NaCl 0,1M -----	114
Anexo C – Preparação da solução de PBS 1M -----	115
Anexo D – Cálculos para a obtenção dos resultados do estudo de otimização da reacção com o MCA -----	116
Anexo E – Ângulos de Contacto e Energias de Superfície das modificações -----	117
Anexo F – Análise da variação da absorvância em função do tempo de incubação, das bases e dos revestimentos -----	122

¹ Referências Bibliográficas elaboradas segundo as regras de Harvard.

Índice de figuras

Figura 1 – Representação do grupo uretana ^[3] . -----	3
Figura 2 – Formação de uma poliuretana de cadeia linear ^[3] . -----	3
Figura 3 – Moldagem por compressão ^[12] . -----	15
Figura 4 – Moldagem por injeção ^[12] . -----	15
Figura 5 – Esquema representativo de um ângulo de contacto ^[17] . -----	17
Figura 6 – Esquema representativo dos diferentes tipos de comportamento consoante o valor de θ ^[14] . -----	18
Figura 7 – Gota na superfície de um sólido ^[18] . -----	19
Figura 8 – <i>Spin Coating</i> . -----	31
Figura 9 – Fórmula do poli (ácido láctico) (PLLA) ^[19] . -----	36
Figura 10 – Enxerto de grupos hidroxilo na placa. -----	38
Figura 11 – Enxerto de grupos carboxilo na placa. -----	39
Figura 12 – Esquema representativo das colunas de purificação para retirar o inibidor ao AA. -----	42
Figura 13 – Fórmula química da L-lisina etil éster. -----	44
Figura 14 – Disposição das experiências nas placas de 24 poços, para os tempos da primeira fase. -----	49
Figura 15 – Esquema representativo dos movimentos de raspagem das caixas de cultura de células. -----	51
Figura 16 – Disposição das experiências nas placas de 24 poços, para os tempos T ₂ e T ₃ da segunda fase. -----	54
Figura 17 – Disposição das experiências na placa de 24 poços, para o tempo T ₁ da segunda fase. -----	55
Figura 18 – Elastollan 1180A50 revestido com acetato de celulose em acetona. -----	62
Figura 19 – Elastollan 685A revestido com acetato de celulose em acetona. -----	62
Figura 20 – Elastollan 1180A50 modificado com etilcelulose em diclorometano – metanol numa proporção de 1:1. -----	62
Figura 21 – Elastollan 685A modificado com etilcelulose em diclorometano – metanol numa proporção de 1:1. -----	62
Figura 22 – Elastollan 1180A50 revestido com acetato butirato de celulose em diclorometano. -----	63
Figura 23 – Elastollan 685A revestido com acetato butirato de celulose em diclorometano. -----	63
Figura 24 – Elastollan 1180A50 modificado com Elastollan 1180A50 em DMF. -----	63
Figura 25 – Elastollan 685A modificado com Elastollan 1180A50 em DMF. -----	63
Figura 26 – Elastollan 1180A50 revestido com poliestireno em tetrahydrofurano (THF). -----	64
Figura 27 – Elastollan 685A revestido com poliestireno em THF. -----	64
Figura 28 – Revestimento de uma placa de vidro com poliestireno dissolvido em DMF. -----	66
Figura 29 – Imagens SEM do Elastollan 685A. -----	72

Modificação de superfícies para controlo da adesão celular

Figura 30 – Imagens SEM do Elastollan 685A depois de 14 dias em DMEM. -----	73
Figura 31 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com H ₂ O ₂ durante 2 h. -----	73
Figura 32 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com H ₂ O ₂ durante 2 h depois de 14 dias em DMEM. -----	74
Figura 33 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com H ₂ O ₂ durante 4h. -----	74
Figura 34 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com H ₂ O ₂ durante 4 h depois de 14 dias em DMEM. -----	75
Figura 35 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com AA. -----	75
Figura 36 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com AA depois de 14 dias em DMEM. -----	76
Figura 37 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50. -----	77
Figura 38 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 depois de 14 dias em DMEM. -----	77
Figura 39 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com H ₂ O ₂ durante 2 h. -----	78
Figura 40 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com H ₂ O ₂ durante 2 h depois de 14 dias em DMEM. -----	78
Figura 41 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com H ₂ O ₂ durante 4h. -----	79
Figura 42 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com H ₂ O ₂ durante 4 h depois de 14 dias em DMEM. -----	79
Figura 43 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com AA. -----	80
Figura 44 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com AA depois de 14 dias em DMEM. -----	80
Figura 45 – Placas produzidas na prensa. -----	86
Figura 46 – Fotografia digital de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase – a) e b) imagens da experiência de controlo às 80 h visualizadas com MTT (ampliação 200 ×) e c) imagem da experiência de controlo às 80 h visualizada sem coloração (ampliação 200 ×). ---	90
Figura 47 – Fotografia digital de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase – a) imagem do Elastollan 685A às 80 h visualizada sem coloração (ampliação 200 ×) e b) imagem do Elastollan 1180A50 às 80 h visualizada sem coloração (ampliação 200 ×). -----	90
Figura 48 – Fotografias digitais de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase às 80 h visualizadas sem coloração (ampliação 200×) – a) Elastollan 1180A50 dissolvido em DMF, b) PEG 300 dissolvido em DMF e c) poliestireno dissolvido em THF. -----	91
Figura 49 – Fotografias digitais de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase às 80 h visualizadas sem coloração (ampliação 200×) – a) Elastollan 1180A50 revestido com Elastollan 1180A50 dissolvido em DMF, b) Elastollan 1180A50 revestido com poliestireno dissolvido em THF. -----	91
Figura 50 – Fotografias digitais de placas de incubação às 80 h visualizadas com MTT (a), b) e c)). -----	92
Figura 51 – Fotografias digitais de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase aos 7 dias visualizadas com MTT (ampliação 100×) – a) Elastollan 685A revestido com polilisina L por absorção, b) Elastollan 1180A50 com grupos –OH revestido com polisina L por absorção, c) Elastollan 1180A50 revestido com polisina L por ligação covalente e d) Controlo. -----	92

Figura 52 – Fotografias digitais de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase aos 14 dias visualizadas sem coloração (ampliação 400×) – a) Controlo, b) Elastollan 1180A50 revestido com lisina por ligação covalente e c) Elastollan 1180A50 revestido com Elastollan 1180A50 dissolvido em DMF. ----- 93

Índice de tabelas

Tabela 1 – Concentrações das soluções de DMF e DOS. -----	32
Tabela 2 – Cálculos para a preparação das soluções de poliestireno e Elastollan 1180A50 ambos em DMF. -----	35
Tabela 3 – Programa usado no <i>Spin Coating</i> . -----	35
Tabela 4 – Resultados de algumas modificações com derivados da celulose e do poliestireno. -----	61
Tabela 5 – Tensões Superficiais das soluções. -----	67
Tabela 6 – Ângulos de Contacto e Energia de Superfície do Elastollan 1180A50 em DMF. -----	68
Tabela 7 – Ângulos de Contacto e Energia de Superfície do PEG 300 em DMF. -----	68
Tabela 8 – Ângulos de Contacto e Energia de Superfície do Poliestireno em THF. -----	68
Tabela 9 – Quantidade de grupos –OH existentes em ambas poliuretanas modificadas com H ₂ O ₂ durante 4h. -----	69
Tabela 10 – Quantidade de grupos –COOH existentes em ambas poliuretanas modificadas com AA e MCA. -----	70
Tabela 11 – Análise da degradação do Elastollan 685A modificado com H ₂ O ₂ durante 2 e 4h e com AA. -----	72
Tabela 12 – Análise da degradação do Elastollan 1180A50 modificado com H ₂ O ₂ durante 2 e 4h e com AA. -----	76
Tabela 13 – Ângulos de contacto e Tensões Superficiais das modificações com grupos –OH e –COOH. -----	81
Tabela 14 – Medições do pH induzido no meio pelo Elastollan 685A e 1180A50 modificados com o AA. ---	82
Tabela 15 – Massas e quantidade de grupos –COOH existentes nas placas modificadas com AA com e sem inibidor. -----	83
Tabela 16 – Ângulos de Contacto e Tensões Superficiais do Elastollan 685A sem qualquer modificação e modificado com lisina, polilisina D e polilisina L. -----	88
Tabela 17 – Ângulos de Contacto e Tensões Superficiais do Elastollan 1180A50 sem qualquer modificação e modificado com lisina, polilisina D e polilisina L. -----	89
Tabela I – Cálculos para a obtenção dos resultados do estudo de optimização da reação com o MCA. -----	116
Tabela II – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PDL por UV. -----	117
Tabela III – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PDL por UV. -----	117
Tabela IV – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PLL por UV. -----	117

Modificação de superfícies para controlo da adesão celular

Tabela V – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PLL por UV. -----	117
Tabela VI – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PDL por Absorção. -----	118
Tabela VII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PDL por Absorção. -----	118
Tabela VIII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PLL por Absorção. -----	118
Tabela IX – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PLL por Absorção. -----	118
Tabela X – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com –OH e PDL por Absorção. -----	119
Tabela XI – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com –OH e PDL por Absorção. -----	119
Tabela XII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com –OH e PLL por Absorção. -----	119
Tabela XIII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com –OH e PLL por Absorção. -----	119
Tabela XIV – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PDL. -----	120
Tabela XV – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PDL. -----	120
Tabela XVI – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PLL. -----	120
Tabela XVII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PLL. -----	120
Tabela XVIII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com Lisina. -----	121
Tabela XIX – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com Lisina. -----	121
Tabela XX – Teste LSD a três factores com medidas repetidas em 1 factor. -----	122

Índice de Quadros

Quadro 1 – Caracterização da Lisina ^[10] . -----	13
Quadro 2 – Reagentes utilizados. -----	25
Quadro 3 – Esquema representativo da disposição das experiências, da primeira fase, na placa de 96 poços. -----	53
Quadro 4 – Esquema representativo da disposição das experiências, para T ₁ e T ₃ da segunda fase, na placa de 96 poços. -----	56
Quadro 5 – Valores de pH induzidos no meio pelas placas modificadas com AA com e sem inibidor. -----	84
Quadro 6 – Condições e resultados do estudo para optimização da reacção com o MCA. -----	84
Quadro 7 – Quantificação dos grupos carboxilo existentes em algumas modificações. -----	85
Quadro 8 – Volume de HCl adicionado a modificações com diferentes quantidades de MCA. -----	85
Quadro 9 – Análise da Variância de 3 factores com medidas repetidas em 1 factor. -----	93
Quadro 10 – Análise da variância de 3 factores com medidas repetidas em 1 factor. -----	95
Quadro 11 – Análise da variância de 2 factores na hora 80. -----	97

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Análise da Capacidade de Absorção de humidade do Elastollan 685A sem qualquer modificação e com grupos –OH e –COOH. -----	70
Gráfico 2 – Análise da Capacidade de Absorção de humidade do Elastollan 1180A50 sem qualquer modificação e com grupos –OH e –COOH. -----	71
Gráfico 3 – Análise da variação da absorvância em função dos revestimentos. -----	94
Gráfico 4 – Análise da variação da absorvância em função do tempo, das bases e dos revestimentos. -----	95
Gráfico 5 – Análise da variação da absorvância em função dos revestimentos com polilisina. -----	96
Gráfico 6 – Análise da variação da absorvância em função das bases e dos revestimentos às 80 horas. -----	97

Capítulo I

Introdução

Este projecto consiste na modificação de superfícies de modo a controlar a adesão celular. Com as superfícies modificadas pretende-se estudar o comportamento de células biológicas. Estas modificações poderão ser, posteriormente, aplicadas na área dos biomateriais, mais propriamente, em biosensores. Os materiais que serão modificados são poliuretanas.

1.1. Poliuretanas

As poliuretanas são um exemplo típico da polimerização por adição. Como as poliureias, as poliuretanas são derivadas dos ácidos carbónicos. Um termo mais antigo para a sua definição é *polycarbamate*, originado do ácido carbónico (RNHCO₂H) [2].

Quimicamente as poliuretanas são caracterizadas pela presença de ligação uretana (Figura 1) a qual aparece repetida várias vezes, mas não necessariamente de uma forma regular, formando a poliuretana. Para além do grupo uretana, podem fazer parte da molécula do polímero outros grupos funcionais, tais como os grupos éster, éter, alofanato, ureia, amida, etc [3].

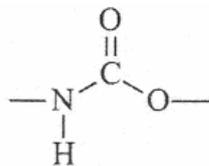


Figura 1 – Representação do grupo uretana [3].

As poliuretanas são utilizadas numa vasta variedade de produtos, incluindo as fibras (sobretudo numa variedade de elásticos), elastómeros, esponjas, revestimentos e adesivos.

São dois os métodos principais para formar poliuretanas: a reacção dos bis-cloroformato (produzido dos compostos di-hidroxícos com excesso de fosgénio) com diaminas e, mais importante da vertente industrial, a reacção dos di-isocianatos com os compostos di-hidroxícos, que têm a vantagem de não produzir produtos derivados (Figura 2) [2].

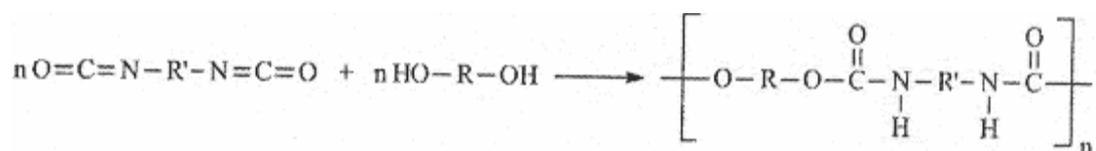


Figura 2 – Formação de uma poliuretana de cadeia linear [3].

As poliuretanas que serão usadas neste trabalho são o Elastollan 685A e o Elastollan 1180A50. Estas são inertes por isso têm que se modificar para ficarem reactivas e interagirem assim com as células. Elastollan é uma poliuretana termoplástica de base poliéter (TPU). Exibe uma excelente resistência à abrasão, dureza, transparência, baixas propriedades de temperatura, estabilidade hidrolítica e resistência a fungos [4]. Estas poliuretanas são um produto da BASF que se apresenta sob a forma de *pellets*. Este material é posteriormente processado por moldagem por injeção. Depois de processados, estes materiais não são lisos mas sim rugosos, como se poderá visualizar nas imagens recolhidas por *Scanning Electronic Microscope (SEM)*, que serão mostradas posteriormente. Apesar de serem da mesma família, estes materiais apresentam características distintas.

1.2. Métodos de modificação de superfícies

Como já foi referido, anteriormente, os materiais base, usados neste trabalho, eram inertes, por isso foram realizados vários revestimentos.

Os revestimentos de superfícies têm uma longa história em produtos médicos, começaram como identificadores em pílulas e mais tarde tornaram-se em modos de modificação das propriedades dos dispositivos médicos e implantes.

Um recente desenvolvimento foi a modificação dos invólucros ou próprios medicamentos de modo a tornar a entrega do fármaco, no organismo, direccionada.

Hoje em dia, a selecção de materiais, para a construção da grande maioria dos dispositivos biomédicos, é baseada nas propriedades mássicas e nas propriedades da superfície que determinam o sucesso ou fracasso do dispositivo.

Existe, assim, uma crescente necessidade de métodos eficientes de modificação de superfícies para aplicações biomédicas. Uma modificação de superfície caracteriza-se por alterar as características da superfície de um material para uma aplicação específica sem afectar prejudicialmente as propriedades mássicas.

Geralmente uma modificação de superfícies insere-se numa das duas categorias: **1)** modificação da actual superfície, isto é, por *etching* ou modificando quimicamente ou **2)** cobrindo a superfície com um material diferente, por exemplo, deposição por plasma ou enxerto de polímeros. Estas modificações podem ser usadas afectando uma vasta gama de

propriedades: humedecimento, permeabilidade, bioestabilidade, inércia química, adesão, biocompatibilidade, topografia, características eléctricas, ópticas e de fricção.

Enquanto as técnicas de modificação de superfícies complicadas e caras podem ser aplicadas em pesquisa, podem não ser práticas ao considerar uma aplicação comercial. Qualquer modificação de superfície deve ser física, química e biologicamente caracterizada.

São três os métodos de modificação de superfícies: modificação de superfícies baseadas em técnicas por radiação, por plasma e por química húmida.

As técnicas de modificação de superfícies baseadas em radiação, inclusive gama, ultravioleta (UV), laser, electrões, feixe de iões, podem ser usadas para modificar uma superfície para poder ser usadas em materiais biomédicos. Estas técnicas dividem-se em técnicas de feixes de iões e técnicas de radiação laser, UV e gama.

As técnicas de feixes de iões podem ser divididas em duas categorias: **1)** formação de filmes, por exemplo, acelerador de electrões (IBAD) e **2)** modificadores químicos de superfícies, por exemplo, implantação de iões.

Em ambas as categorias é usada uma fonte de iões para produzir as espécies ionizadas apropriadas que são então separadas e subsequentemente aceleradas num campo eléctrico. Os iões alcançam a superfície com uma energia entre os 20 e 200 KeV, que permitem ao feixe de iões emitido induzir modificações na estrutura das macromoléculas por libertação de gás, formação de ligações duplas, cisões da cadeia, e reticulação da camada superior correspondente à profundidade de penetração dos iões.

Quanto às técnicas de radiação laser, UV e gama, a exposição controlada de uma superfície a um laser excímero e lâmpadas UV pode produzir várias modificações químicas à superfície inclusive *etching*, deposição e polimerização. Tratamentos com laser e UV demonstraram a introdução de espécies que contém oxigénio à superfície expandida de politetrafluoroetileno e tereftalato de polietileno. Isto melhora o humedecimento da superfície e muda a morfologia da superfície e tem como vantagem o aumento da proliferação da célula e o crescimento de superfícies que exibiam um baixo crescimento.

As técnicas de modificação de superfície por plasma dividem-se em métodos de implantação de plasma iónico e modificação de plasma e métodos de polimerização.

Plasmas consistem em espécies atómicas, moleculares, iónicas e radicais altamente excitadas. A excitação pode ser alcançada usando gás, fontes metálicas e laser. O ambiente

gasoso resultante é muito reactivo e capaz de extrair uma gama de interacções entre o plasma e a superfície, até mesmo em materiais inertes como a cerâmica. Tratamentos baseados em plasma permitem que adesivos metálicos, cerâmicas e revestimentos poliméricos possam ser aplicados numa gama de materiais. Em formatos específicos eles podem ser usados para *etching*, reticular e oxidar materiais, introduzindo assim funcionalidade química específica à interface entre os materiais. Estes factores fazem as técnicas de plasma particularmente úteis para a modificação de superfícies de materiais biomédicos.

As técnicas de implantação de plasma iónico dividem-se em implantação de plasma como fonte de iões (PSII) e implantação de plasma como imersão de iões (PHI). Estas são capazes de introduzir elementos na superfície sem constrangimento das propriedades termodinâmicas da mesma. Estas técnicas têm uma vantagem em relação aos métodos de implantação standards. Eles não são providos de técnicas de ponta, um factor que os incapacita de modificar formas complexas comumente encontradas em aplicações biomédicas.

Na modificação de plasma e métodos de polimerização, um campo eléctrico a uma frequência de rádio aplicado do outro lado de uma câmara cheia de vapor de gás, vai ionizar uma fracção das moléculas, e gerar electrões, iões, radicais livres, fotões e moléculas em estados excitados dentro do plasma do gás. Os plasmas podem ser usados para modificar superfícies por *etching* ou revestimento de superfícies por deposição. No caso de modificar a superfície a interacção entre o plasma e o substrato conduz a duas reacções competitivas, modificação e degradação. Quando a degradação é notória, pode acontecer *etching* sobre a superfície do polímero. A razão do dano dos materiais depende da energia de ambos os plasmas e da natureza polimérica do substrato. *Etching* por plasma ou limpeza é normalmente usada para remover os contaminantes da superfície e melhorar as propriedades de adesão de ambos os metais e polímeros. Em todos os tratamentos de plasma há possibilidade das reacções da superfície resultarem em inesperadas confinações de espécies à superfície. A selecção do tratamento a gás e das condições do plasma é crítica na protecção dos produtos da reacção que não são reabsorvidos na limpeza da superfície. Em alguns casos, a fase específica da construção do material pode ser mais susceptível para o plasma.

No regime de modificação, espécies químicas são introduzidas na superfície do material. Estes *non-depositing plasmas* usam tipicamente gases inertes como o árgon, amónia, oxigénio, nitrogénio, ar e água para influenciar a superfície química e topográfica. A aplicação comum destes tipos de modificações químicas são como um passo de pré- activação

para a copolimerização de polímeros no qual o plasma cria radicais nas cadeias poliméricas que podem ser usados para iniciar a polimerização quando colocada em contacto com os monómeros em fase líquida ou gasosa e forma enxertos copoliméricos na superfície.

No caso dos *surface-depositing plasmas* o processo de deposição envolve a volatilização do monómero líquido para dentro de uma câmara por um processo de evacuação. A excitação do monómero resulta numa colisão de espécies reactivas numa superfície dentro da zona plasma, o que cria sítios reactivos que podem ser utilizados para ligações covalentes de outras espécies. O processo resulta na deposição da película polimérica a partir da fase de vapor.

A química húmida divide-se em modificação de superfícies através do enxerto de polímeros, nas *Self Assembled Monolayers (SAMs)* e enxerto de biomoléculas e superfícies biomiméticas.

O enxerto de polímeros proporciona uma maior e mais versátil aproximação à modificação de superfícies.

Superfícies enxertadas podem ser produzidas por junção directa de moléculas poliméricas existentes nas superfícies que contêm grupos funcionais ou polimerização de enxerto de monómeros.

Os métodos de polimerização de enxerto incluem polimerização de enxerto química e enxertos usando radiação de alta energia.

Os factores conhecidos que afectam as propriedades da camada de polímero enxertada incluem o peso molecular do polímero, a extensão da cadeia ramificada, a densidade de grupos funcionais e carregados em ambos os substratos e polímeros, e a solubilidade do polímero.

As SAMs também proporcionam uma aproximação flexível à criação de uma superfície funcionalmente química e biológica. As SAMs são altamente ordenadas, formando espontaneamente camadas de superfícies em certos substratos. As SAMs podem também ser formadas pelas interacções de clorosilanos com superfícies oxidadas terminadas em -OH e com vários ácidos em superfícies metálicas oxidadas.

Camadas que incorporam moléculas biologicamente activas e/ou inactivas para gerar respostas específicas, previsíveis e controladas no ambiente biológico foram consideradas interessantes na recente pesquisa de biomateriais. Estes também denominados materiais inteligentes são projectados para promover sinais específicos que resultam em superfícies

biologicamente funcionais. Uma extensa gama de bio-moléculas incluindo proteínas, peptídeos, polissacarídeos, líquidos e oligonucleótidos foram imobilizados em superfícies com o propósito de extrair respostas biológicas, previsíveis e controladas. Foi de particular interesse no campo dos biomateriais a incorporação de sequências peptídicas (por exemplo RGD) para promover a adesão celular.

Uma extensa gama de técnicas de modificação de superfícies pode ser usada para provocar alterações nas propriedades das superfícies dos biomateriais, mantendo as propriedades mássicas.

A maioria destas técnicas de modificação encontram aplicação em dispositivos comerciais e irão continuar a ser usados durante um tempo considerável. Contudo, o centro de modificação de superfícies é crescentemente dirigido para as superfícies que surgem da bioengenharia e que podem extrair e controlar respostas biológicas [5].

1.3. Estudos biológicos

Considerando que o Elastollan 685A e o 1180A50, modificados, podem ser utilizados em biosensores, torna-se importante fazer alguma referência aos tecidos e células em que estes serão aplicados.

Os animais, seres multicelulares, são constituídos por diferentes **tecidos**, ou seja, conjuntos de células com a mesma origem e que desempenham funções idênticas. Cada tecido é funcionalmente especializado e caracterizado pela forma, dimensão e estrutura das respectivas células.

Podem considerar-se quatro tipos básicos de tecidos:

-  tecido epitelial;
-  tecido conjuntivo;
-  tecido muscular;
-  tecido nervoso.

Neste trabalho ir-se-á dar especial atenção ao tecido conjuntivo, dado que as células que serão utilizadas para realizar os testes de adesão celular, são os fibroblastos.

O **tecido conjuntivo** pode apresentar-se segundo vários sub-tipos. A sua origem é mesodérmica e representam um suporte estrutural e metabólico para outros tecidos e órgãos do corpo. Estes são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da forma do corpo. Este

papel mecânico é dado por um conjunto de moléculas (matriz) que conecta e liga as células e órgãos, dando, desta maneira, suporte ao corpo [6].

A derme, os ligamentos, os tendões, as cartilagens, os ossos são, entre outros, exemplos de tecidos conjuntivos.

Em todos os tecidos conjuntivos existem os mesmos três constituintes básicos: as células, fibras e substância fundamental.

Uma diferença entre os tecidos conjuntivos e os restantes (epitelial, muscular e nervoso), é que o primeiro é formado principalmente por matriz extracelular enquanto que os outros são constituídos maioritariamente por células.

As matrizes extracelulares consistem em diferentes combinações de proteínas fibrosas e de substância fundamental. Substância fundamental é um complexo viscoso e altamente hidrofílico de macromoléculas aniónicas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas multiadesivas (laminina, fibronectina, entre outras) que se ligam a proteínas receptoras (integrinas) presentes na superfície das células bem como outras componentes da matriz, fornecendo, desse modo, tensão e rigidez à matriz.

Além de desempenhar uma evidente função estrutural, a grande variedade de moléculas do tecido conjuntivo desempenham importantes papéis biológicos, como, por exemplo, o de ser importante reserva para muitas hormonas que controlam o crescimento e a diferenciação celular.

A matriz do tecido conjuntivo serve também como meio para troca de nutrientes e catabolitos entre células e absorção sanguínea dos mesmos.

A ampla variedade de tecidos conjuntivos reflecte a variação na composição e na quantidade dos seus três componentes (células, fibras e substância fundamental), os quais são responsáveis pela notável diversidade estrutural, funcional e patológica do tecido conjuntivo. Fibras, predominantemente compostas por colagénio, constituem tendões, aponeuroses (qualquer placa constituída por fibras conjuntivas densas que envolve um músculo, que serve de meio de inserção a um músculo largo ou que forma uma separação entre certos planos musculares [7]), cápsulas de órgãos, e placas que envolvem o sistema nervoso central (meninges). As fibras também constituem trabéculas e paredes que existem dentro de vários órgãos, formando o componente mais resistente do estroma (tecido de sustentação) dos órgãos [8].

Nos tecidos conjuntivos surgem vários tipos de células, cada um com características funcionais próprias. Entre essas células podem citar-se os fibroblastos, os fibrócitos, os macrófagos, os mastócitos, os plasmócitos, células adiposas e leucócitos.

Os **fibroblastos** são células com prolongamentos irregulares, que lhes conferem, por vezes, um aspecto estrelado e que são responsáveis pela produção e manutenção dos componentes extracelulares, fibras e substância fundamental.

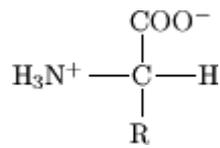
Os fibroblastos sintetizam as proteínas de colagénio e elastina, além das glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Essas células estão também envolvidas na produção de factores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e são capazes de modular a sua capacidade metabólica, a qual se vai reflectir na sua morfologia. As células com intensa actividade de síntese são denominadas fibroblastos, enquanto que as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos.

Os fibroblastos possuem citoplasma abundante, com muitos prolongamentos. O seu núcleo é ovóide, grande e pouco corado, com cromatina fina e nucléolo proeminente. O citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso, e o aparelho de Golgi é bem desenvolvido.

Os fibrócitos são menores do que os fibroblastos e tendem a ter um aspecto fusiforme. Possuem poucos prolongamentos citoplasmáticos e o núcleo é menor, mais escuro e mais alongado do que o do fibroblasto. O seu citoplasma é acidófilo, com pouca quantidade de retículo endoplasmático rugoso ^[6].

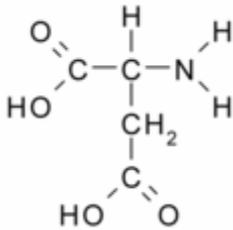
Os fibroblastos raramente se dividem nas pessoas adultas, excepto quando o organismo requer fibroblastos adicionais.

As proteínas são compostos nitrogenados orgânicos complexos, presentes em todas as células vivas, formados fundamentalmente por carbono (C), hidrogénio (H), oxigénio (O) e azoto (N). Contém ainda alguns deles enxofre (S), fósforo (P), cobre (Cu) entre outros. Os compostos nitrogenados que entram na formação das proteínas são conhecidos como aminoácidos (a.a.), são compostos orgânicos que contêm um grupo ácido (carboxílico) e um grupo amínico. Estes compostos apresentam a seguinte estrutura:

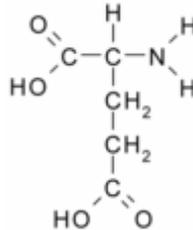


Existem vinte aminoácidos que se encontram apresentados seguidamente ^[9]:

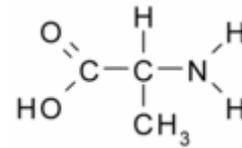
Ácido Aspártico (**Asp**)



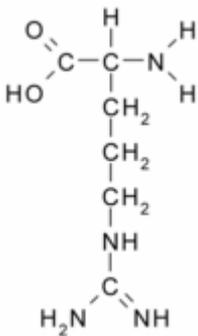
Ácido Glutâmico (**Glu**)



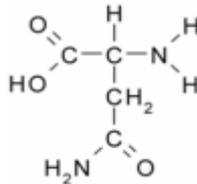
Alanina (**Ala**)



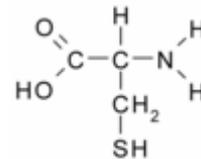
Arginina (**Arg**)



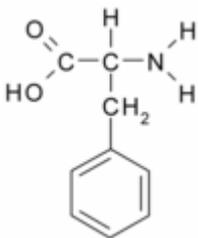
Asparagina (**Asn**)



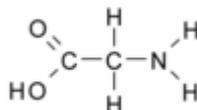
Cisteína (**Cys**)



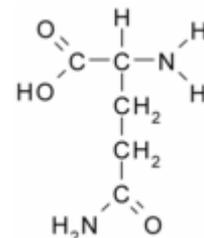
Fenilalanina (**Phe**)



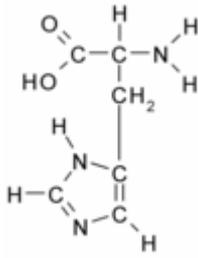
Glicina (**Gly**)



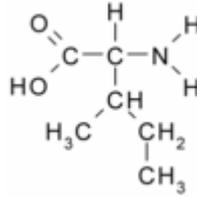
Glutamina (**Gln**)



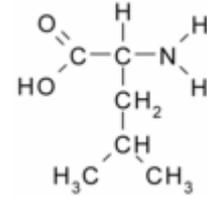
Histidina (**His**)



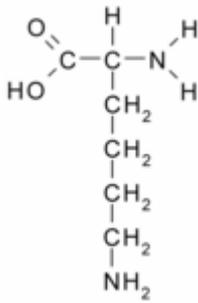
Isoleucina (**Ile**)



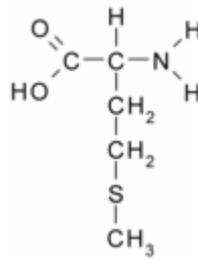
Leucina (**Leu**)



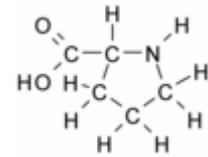
Lisina (**Lys**)



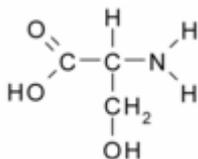
Metionina (**Met**)



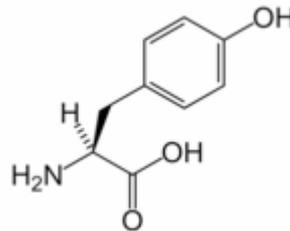
Prolina (**Pro**)



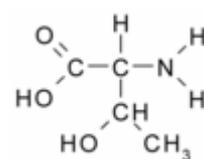
Serina (**Ser**)



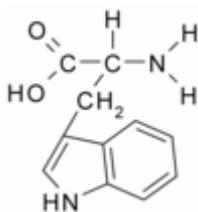
Tirosina (**Tyr**)



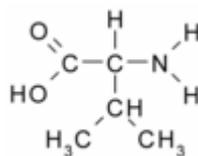
Treonina (**Thr**)



Triptófano (**Trp**)



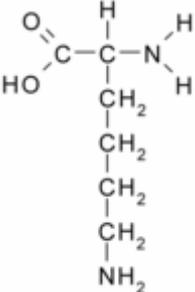
Valina (**Val**)



Neste trabalho ir-se-á dar especial atenção a um dos vinte aminoácidos, a lisina (Quadro 1).

A **lisina** é um aminoácido com cadeia lateral muito polar, que a torna altamente hidrófila. A lisina tem carga positiva em pH neutro. A cadeia lateral da lisina e da arginina são as mais longas no conjunto dos vinte aminoácidos ^[10].

Quadro 1 – Caracterização da Lisina ^[10].

Nomenclatura	Lisina
Símbolo	Lys, Lis ou K
Nome químico	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Classificação	Aminoácido básico
Estrutura	
Estrutura Tridimensional	

A lisina é um dos vários aminoácidos que o corpo precisa para o crescimento e restauração dos tecidos. Ela é classificada como um dos nove aminoácidos “essenciais”, pelo facto do ser humano necessitar de a obter recorrendo a fontes externas, tal como alimentos ou suplemento. Como todos os aminoácidos, a lisina funciona como um dos blocos que constroem a proteína, a polilisina. Ela também tem um papel principal na produção de várias enzimas, hormonas e anticorpos que combatem doenças. Muitos alimentos contêm lisina, mas as fontes mais ricas até agora são as carnes, peixes, e laticínios (leite, ovos, queijo). Os investigadores estão a explorar o valor da lisina na nossa alimentação e o consumo de alimentos ricos em lisina para diminuir o colesterol, melhorar a *performance* atlética, e realçar

a recuperação após uma cirurgia. A lisina compete com a arginina para a absorção e entrada na células dos tecidos. Alimentos ricos em arginina incluem o chocolate, amendoim, sementes, amêndoas, grãos de cereais, gelatina, e passas. A aplicação mais promissora da lisina é o seu uso na prevenção contra herpes doloroso, bastante inestético, causado pelo vírus *Herpes simplex* (HSV) [10].

1.4. Biosensor

As poliuretanas modificadas poderão ser aplicadas, posteriormente, em biosensores.

Um biosensor é um dispositivo que pode analisar continuamente um ou mais sistemas/soluções no organismo. É qualquer sensor que se coloca no organismo. É um sensor que tem na sua constituição um composto biológico que vai detectar algo que será posteriormente amplificado por um transdutor e interpretado. Este sensor usa moléculas biológicas, tecidos, organismos ou princípios. Consoante os princípios utilizados os biosensores poderão ser electroquímicos, ópticos, cristais piezoeléctricos ou calorimétricos.

Para a construção de um biosensor existem várias exigências que deverão ser cumpridas tais como, o alto grau de selectividade, boa estabilidade nas condições de trabalho (temperatura, pH, entre outros), boa retenção da actividade, estabilidade, reprodutibilidade, não contaminar a amostra, rigor ou também chamado de precisão, uma velocidade de resposta inferior a dez minutos, boa resolução, ser biocompatível e ter um custo baixo [11].

1.5. Processamento de materiais

Os materiais que foram usados neste projecto são vendidos na forma de *pellets*, tendo por isso que ser processados, antes da sua utilização.

Os polímeros são mais comumente processados por uma das três técnicas básicas: moldagem, extrusão ou fusão. Estas técnicas são efectuadas a temperaturas mais baixas que as necessárias para a moldagem do aço, alumínio ou vidro e portanto, a energia eficiente é uma das características mais atractivas do processamento de polímeros. Os polímeros têm, entretanto, uma desvantagem, eles têm uma condutividade térmica baixa e fundem-se lentamente. Para minimizar este problema é usada um parafuso que roda de modo a

transportar o polímero aquecendo-o uniformemente através da combinação entre aquecedores externos e o calor por fricção gerado durante o transporte.

Neste trabalho, o material base usado foi processado por moldagem por injeção ou por compressão.

Existem dois processos de moldagem fundamentais: a moldagem por compressão e a moldagem por injeção. A moldagem por compressão usa calor e pressão para forçar o polímero a fundir, introduzindo estes factores entre as superfícies em contacto com o molde móvel, para formar o polímero fundido.

Na moldagem por injeção o polímero fundido é comprimido dentro de uma cavidade fechada do molde ^[12].

Estes dois métodos são mostrados esquematicamente nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

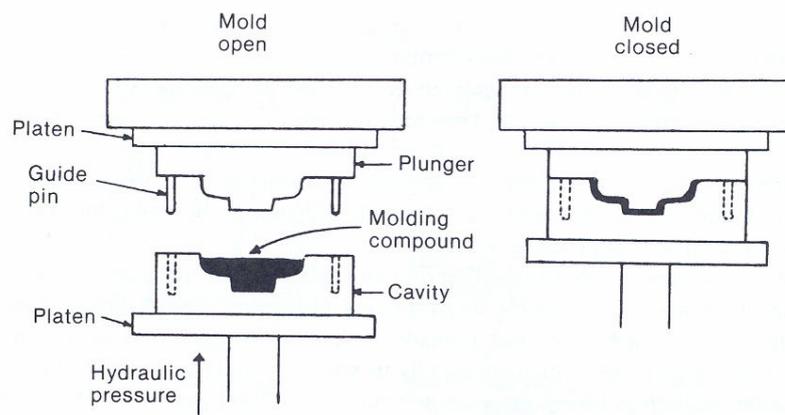


Figura 3 – Moldagem por compressão ^[12].

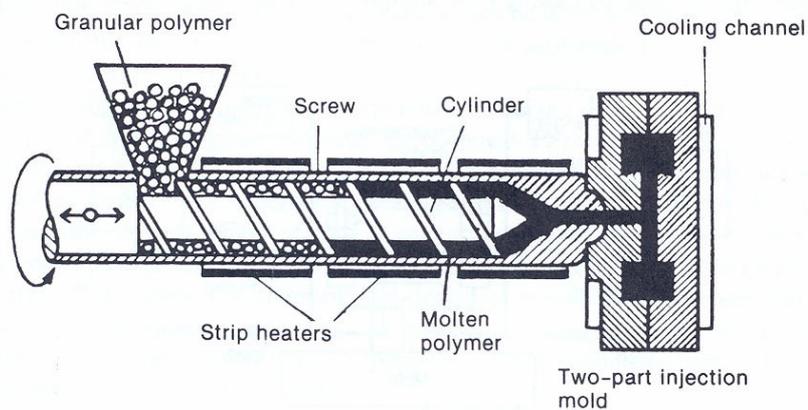


Figura 4 – Moldagem por injeção ^[12].

1.6. Técnicas de caracterização

Após a realização de várias modificações é essencial saber quais as características do material que foram alteradas, por isso utilizaram-se algumas técnicas de caracterização neste trabalho, tais como, microscopia electrónica de varrimento, ângulos de contacto e energias de superfície, capacidade de absorção de humidade e degradação.

1.6.1. Microscopia Electrónica de Varrimento

A microscopia electrónica de varrimento denomina-se, em inglês, *Scanning Electronic Microscope*, o que faz com que o aparelho seja muitas vezes denominado por SEM.

O aparelho possui três partes principais: uma coluna eletro-óptica que gera e colima o feixe electrónico. Um sistema de vácuo que inclui a câmara onde fica a amostra. E a parte de detecção do sinal e o sistema onde é gerada a imagem. Uma amostra submetida a um feixe de electrões apresenta diversos tipos de sinais, propiciando a cada um deles um modo particular de operação. No caso particular do SEM, o princípio de operação baseia-se fundamentalmente na quantificação dos electrões secundários emitidos por uma amostra como resposta a uma excitação electrónica incidente. Esta medição dos electrões secundários (ES) permite uma definição qualitativa da morfologia e topografia da amostra. O feixe de electrões que se origina em cada cátodo geralmente de tungsténio é aquecido por uma corrente eléctrica, I_f . Os electrões emitidos são acelerados desde o cátodo através de uma grade e um ânodo aterrado (V_{gn}). Este sistema de eléctrodos é chamado de canhão de electrões. Posteriormente, um sistema de lentes reduzem o diâmetro do feixe de electrões a aproximadamente 100 Å. A redução é realizada usando duas ou mais lentes magnéticas em série, cada uma capaz de reduzir o diâmetro do feixe de electrões de um factor de 20 a 100 vezes. Uma corrente ajustável (I_{cd}), é aplicada a uma bobine de deflexão para mover o feixe de electrões através da amostra. A razão desta corrente com a corrente I_d na bobine de deflexão do tubo de raios catódicos, determina a ampliação do microscópio. Quando os electrões primários alcançam a amostra, a interacção destes com os átomos do material, dá origem a electrões secundários. O número de electrões secundários emitidos, varia de acordo com a geometria e outras propriedades da amostra. Os electrões secundários são colectados por um detector, produzindo imagem. Os electrões *backscattered* (retroespalhados) e fotões emitidos pela amostra, pela acção do feixe de electrões podem também ser usados para produzir imagens.

Outras classes de imagens podem ser produzidas por electrões transmitidos (TEM) e por correntes induzidas na amostra.

O SEM é uma ferramenta padrão para inspecção e análise em diversas áreas de pesquisa desde a área de materiais até a área biológica. Particularmente na indústria semicondutora, em medidas de caracterização para microelectrónica, existe um conjunto de métodos que oferecem alta resolução e alta precisão. Estes métodos são baseados fundamentalmente na interacção da matéria com os electrões incidentes, e a emissão de ondas ou partículas (fotões, electrões, iões, átomos, neutrões, entre outros) ^[13].

Através da análise de um SEM consegue-se, assim, saber se a modificação que foi realizada alterou ou não a superfície da placa.

O SEM é utilizado para uma grande gama de estudos e aplicações de polímeros incluindo superfícies rugosas, adesivos com deficiências, superfícies fracturadas, redes e fronteiras entre misturas de fases ^[14].

1.6.2. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície

Ao colocar uma gota de um líquido sobre a superfície de uma amostra, forma-se um ângulo de contacto, θ , na interacção entre o líquido e o substrato. A interacção entre ambos pode ser caracterizada pelo ângulo de contacto estático se a gota não penetrar no substrato, ou seja, se a superfície for suave e homogénea. Caso o líquido penetre ou se espalhe sobre a superfície da amostra, a interacção pode ser caracterizada pelo ângulo de contacto dinâmico em função do tempo. Neste trabalho apenas se calcularam ângulos estáticos.

O ângulo de contacto, Figura 5, é uma função da tensão superficial e da energia livre da superfície do substrato ^{[15] [16] [17]}.

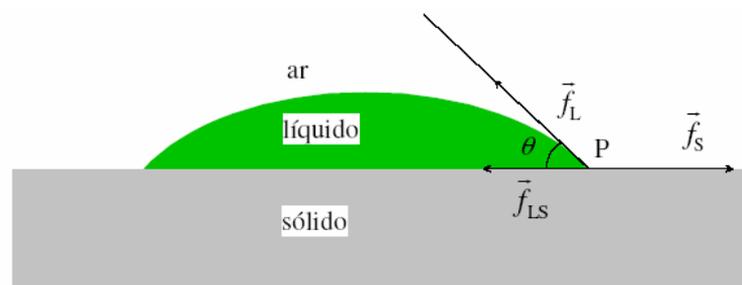


Figura 5 – Esquema representativo de um ângulo de contacto ^[17].

Onde:

- ✓ Θ – ângulo de contacto
- ✓ f_L, f_S, f_{LS} – forças aplicadas no ponto P e sobre uma linha de tamanho l arbitrariamente pequeno

A partir da figura anterior pode-se deduzir que:

$$f_L \cos \theta = f_S - f_{LS} \quad (1)$$

Como ilustrado na Figura 6, valores distintos de θ podem conduzir a diferentes tipos de comportamento ^[14].

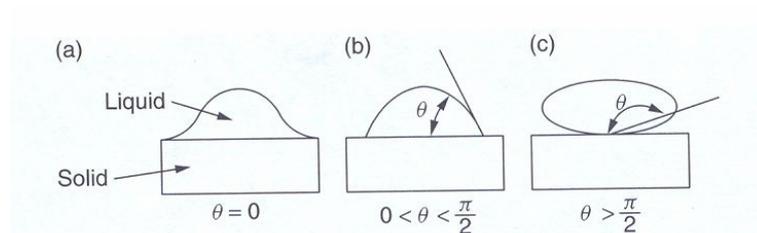


Figura 6 – Esquema representativo dos diferentes tipos de comportamento consoante o valor de θ ^[14].

- a) $\theta = 0$, o líquido molha o sólido e espalha-se sobre a superfície,
- b) $0 < \theta < \pi/2$, o líquido espalha-se na superfície sobre uma área limitada,
- c) $\theta > \pi/2$, o líquido não molha a superfície e tem tendência a afastar-se do sólido.

A energia de superfície, também denominada por tensão superficial, resulta de um desequilíbrio das forças coesivas e moleculares à superfície do material.

Normalmente, a energia de superfície de superfícies sólidas e planas de polímeros é determinada pela medição do ângulo de contacto (θ) formado entre a superfície e o líquido. Esse tipo de experiências envolve a medição deste ângulo com uma série de líquidos com tensão superficial conhecida (γ_L) ^[14].

Define-se tensão superficial, γ , como a energia por unidade de área, ou como a força por unidade de comprimento que uma superfície exerce sobre um corpo, com o qual a superfície está em contacto. Estas definições são descritas pelas seguintes fórmulas ^[16]:

$$\gamma = \frac{W}{\Delta A} \quad (2)$$

$$\gamma = \frac{f}{l} \quad (3)$$

Já no começo do último século Young percebeu, que o equilíbrio de forças na extremidade de uma gota em repouso pode ser descrito pelas energias interfaciais das superfícies correspondentes. A situação geométrica é mostrada na Figura 7.

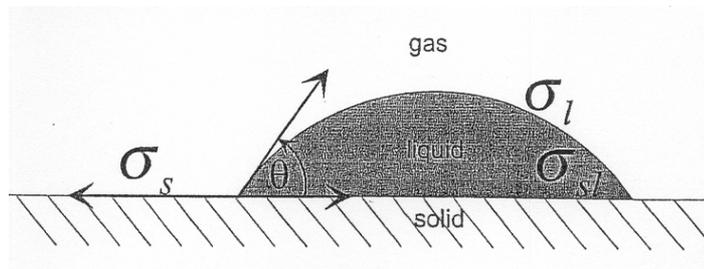


Figura 7 – Gota na superfície de um sólido ^[18].

Do equilíbrio das forças obtém a partir das tensões superficiais e interfaciais:

$$\sigma_s = \sigma_{ls} + \sigma_l \cdot \cos \theta \quad (4)$$

Aqui σ_s , σ_{ls} e σ_l representam as tensões de superfície entre o sólido e o vapor saturado do líquido, a tensão interfacial entre a gota e o sólido e a tensão superficial da gota contra o vapor saturado.

Experimentalmente na maioria dos casos a energia de superfície do sólido é de interesse, enquanto inicialmente não se conhece a tensão interfacial entre o líquido e o sólido. A energia de superfície do sólido é igual a sua tensão superficial por causa da dureza do sólido. Assume-se que se conhece a tensão superficial do líquido. Adicionalmente, dependendo do método, devem ser conhecidas as componentes da tensão de superficial (polar e dispersa) do líquido usado.

O método de análise de Owens, Wendt, Rabel e Kaelble é o usado neste trabalho.

Owens, Wendt, Rabel e Kaelble desenvolveram primeiramente a ideia que a tensão interfacial pode ser separada de acordo com as interações subjacentes entre moléculas. Eles distinguiram entre interações dispersas e interações polares. Aqui, interações polares contêm interações de Coulomb entre dipolos permanentes e entre dipolos permanentes e induzidos. A interação devida ao tempo das flutuações da distribuição de carga dentro das moléculas é chamada interação dispersa. Contribuições polares e dispersas para a energia de

superfície e tensão de superfície são combinadas respectivamente formando a soma de ambas as partes. Então obtém-se:

$$\sigma_l = \sigma_l^d + \sigma_l^p \quad (5) \quad \sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p \quad (6)$$

Aqui σ_l^d e σ_l^p representam as partes dispersas e polares do líquido, enquanto σ_s^d e σ_s^p representam as contribuições respectivas do sólido. A energia interfacial pode ser calculada de acordo com Owens, Wendt, Rabel e Kaelble através das contribuições do líquido e do sólido fazendo a média geométrica.

Para σ_{sl} obtém-se:

$$\sigma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l - 2 \left(\sqrt{\sigma_s^d \cdot \sigma_l^d} + \sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p} \right) \quad (7)$$

Substituindo na equação (4) (pág. 19) este termo por σ_{sl} e resolvendo para as quantidades desconhecidas dá uma equação de uma recta:

$$y = a \cdot x + b \quad (8)$$

com

$$\begin{aligned} y &= \frac{1 + \cos\theta}{2} \cdot \frac{\sigma_l}{\sqrt{\sigma_l^d}} & x &= \sqrt{\frac{\sigma_l^p}{\sigma_l^d}} \\ a &= \sqrt{\sigma_s^p} & b &= \sqrt{\sigma_s^d} \end{aligned} \quad (9)$$

Então, através do gráfico xy retira-se σ_s^p do declive da recta e σ_s^d da intersecção com o eixo vertical. Para alcançar isto, deve ser determinado o ângulo de contacto de pelo menos dois líquidos no sólido desconhecido.

Num programa de computação satisfatório é possível calcular a solução em fracções de segundo após ter inserido os ângulos de contacto medidos e dados de tensão superficial dos líquidos. Usando bancos de dados satisfatórios com dados de líquidos o procedimento é mais simplificado [18].

1.6.3. Capacidade de Absorção de Humidade (*Swelling*)

O *Swelling* pode ser definido como o aumento do volume, do material em estudo, causado pela absorção espontânea de água/ humidade.

Quando se modifica uma superfície podem-se alterar as suas características, tal como a capacidade de absorção de humidade, uma vez que a superfície se pode tornar mais porosa facilitando assim a entrada de água. Se a modificação alterar ainda a hidrofobicidade do material poderá também variar esta propriedade, daí a importância do seu estudo.

1.6.4. Degradação

Nesta secção o termo degradação denota a variação de peso molecular. São dois os tipos gerais de processos de degradação de polímeros que correspondem aproximadamente aos dois tipos de polimerização, de reacção gradual e de adição.

Degradação ao acaso é análoga à polimerização de reacção gradual. Neste caso a ruptura da cadeia ou cisão acontece em pontos aleatórios ao longo da cadeia, deixando fragmentos que são usualmente grandes em comparação com uma unidade do monómero.

Despolimerização em cadeia envolve a libertação de unidades do monómero do fim da cadeia numa despropagação ou reacção de abertura que é essencialmente o inverso da polimerização de adição.

Estes dois tipos podem acontecer separadamente ou combinados, pode ser iniciado termicamente ou por luz UV, oxigénio, ozono ou outro agente alheio e pode ocorrer completamente ao caso ou preferencialmente nos finais da cadeia ou outras ligações fracas na cadeia.

É possível a distinção entre os dois processos em alguns casos ao acompanhar o peso molecular do resíduo como uma função da extensão da reacção.

O peso molecular cai rapidamente com o proceder da degradação ao acaso, mas pode ficar constante na despolimerização em cadeia, como as moléculas completas são reduzidas a monómeros para escapar da amostra residual como um gás. O teste dos produtos de degradação também distingue entre os dois processos: o produto final da degradação ao acaso é provavelmente uma mistura dispersa dos fragmentos do peso molecular até várias centenas enquanto a despolimerização em cadeia dá grandes quantidades de monómero ^[12].

Capítulo II

Reagentes

Ao longo deste trabalho foram utilizados vários reagentes, as suas características estão descritas no Quadro 2, no entanto, as frases de risco e segurança dos mesmos encontram-se no Anexo A.

Quadro 2 – Reagentes utilizados.

Reagente	Pureza/ Massa Molecular/Densidade	Fabricante
Acetato butirato de celulose	Butyryl content 17%	Aldrich Chemical Company
Acetato de celulose		Sigma
Acetato de etilo		José M. Vaz Pereira, S.A.
Acetona Pura		José M. Vaz Pereira, S.A.
Ácido Acrílico (C₃H₄O₂)	99% d= 1,051	Sigma - Aldrich
Ácido Aspártico (NH₂CH(COOH)CH₂COOH)	98,5% FW=133,11	Biochemical
Ácido Clorídrico	M=36,46 g/mol d=1,2 g/mL	Pronalab José M. Vaz Pereira, S.A.
Ácido Cloroacético (C₂H₃ClO₂)	99% M=94,50 g/mol	Merck - Schuchardt
Ácido Perclórico HClO₄	70 – 72%	Merck
Ácido Sulfúrico		
Anidrido Acético ((CH₃CO)₂O)	≥ 98,5% M= 102,09 g/mol	Merck
Carbodiimidazol (CDI) (C₇H₆N₄O)		Sigma
Ciclohexano (C₆H₁₂)	M=84,16 g/mol	Merck

Reagente	Pureza/ Massa Molecular/Densidade	Fabricante
Cloreto de potássio	99%	Merck
Cloreto de sódio (NaCl)	99% d= 2,165 FW= 58,44	Aldrich
Clorofórmio		José M. Vaz Pereira, S.A.
Diclorometano (CH₂Cl₂)	≥ 98,0% M= 84,93 g/mol	Fluka
Dimetilformamida		José M. Vaz Pereira, S.A.
Dimetilsulfoxido (DMSO) C₂H₆OS	≥ 99,0% M _r = 78,13	Fluka
Dioxano	99% d= 1,034	Sigma - Aldrich
Etilcelulose	d= 1,140	Aldrich
Estireno	99+% d= 0,909	Aldrich
Fenolftaleína C₆H₄COOC(C₆H₄-4-OH)₂	p.m.= 318,31	ACS Reagente puro Erba (RPE)
Glicina (C₂H₅NO₂)	99%	Sigma
Hidrogenofosfato de potássio		Merck
Hidrogenofosfato de sódio	99,5%	Riedel-deHaën
Hidróxido de potássio (KOH)	85,5%	EKA Kemi
Hidróxido de sódio (NaOH)	98%	Pronalab José M. Vaz Pereira, S.A.
Irgacure		Ciba Specialty Chemicals Inc.

Reagente	Pureza/ Massa Molecular/Densidade	Fabricante
Isopropanol (CH₃)₂CHOH	99,5+% d= 0,785	Sigma- Aldrich
L-lisina etil éster	95%	Sigma
Metanol		José M. Vaz Pereira, S.A.
Peróxido de hidrogénio H₂O₂	30% M= 34,01 g/mol	Riedel- de Haën
Piridina C₅H₅N	M= 79,10 g/mol	Merck
Poli (ácido láctico) (PLLA)	Sintetizado no DEQ	
Poli (álcool vinílico) (PVA)	98%	Sigma Aldrich
Poli (cloreto de vinilo) (PVC)	Sintetizado na Cires	
Poliestireno		
Polietilenoglicol (PEG) 300		Aldrich
Polietilenoglicol 2000		Fluka
Polietilenoglicol 20000		Merck- Schuchardt
Polihidroxibutirato (PHB-HV)	99,77%	PHB Industrial S/A
Polilisina D		Sigma
Polilisina L		Sigma
Polimetacrilato de metilo	M _w = 45 200	GMBH Chemische Fabrik
Sulfato de ferro		
Tetrahidrofurano (THF) (C₄H₈O)	99,9% M=72,11 g/mol	Riedel-deHaën
Vermelho de metilo C₁₅H₁₅N₃O₂	M= 269,31 g/mol	Merck

Capítulo III

Procedimientos

3.1. Revestimento das placas por *Spin Coating*

Para efectuar os revestimentos das placas recorreu-se a um equipamento, o *Spin Coating* (Figura 8).



Figura 8 – *Spin Coating*.

Um solvente, para ser usado no *Spin Coating*, deve ser volátil para que seja praticamente eliminado durante o processo e não afectar o estudo.

A volatilidade de uma substância está relacionada com os seus grupos funcionais e o tipo de ligações que estes estabelecem. Este é o factor mais importante, no entanto existem outros como o tamanho/ comprimento do composto, o tamanho dos átomos que o constituem e a forma como estes se dispõem. Uma molécula linear tem mais superfície de contacto logo é menos volátil.

Quanto menor for o ponto de ebulição, maior é a volatilidade, ou seja, a capacidade da molécula em passar do estado líquido ao gasoso. Se se trabalhar à temperatura ambiente quer-se uma molécula com um ponto de ebulição menor.

A tensão superficial é a propriedade de um líquido que o faz comportar-se como se a sua superfície estivesse revestida por uma pele elástica, isto é, uma tendência para ‘aderir’ ao ar.

3.1.1. Testes de solubilidade e Revestimentos das placas com soluções

O trabalho prático iniciou-se com um teste para encontrar um solvente para o Elastollan 1180A50. Este teste foi realizado com o intuito de preparar uma solução para revestir a poliuretana de modo a proporcionar uma adesão mais eficaz, uma vez que a

superfície do material (poliuretana) iria sofrer alguma dissolução proporcionando assim uma interacção mais eficaz entre a superfície e a solução que a revestisse.

Para tal prepararam-se onze soluções de dimetilformamida (DMF) e dioxano (DOS) com as concentrações, referidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações das soluções de DMF e DOS.

Copo	DMF (ml)	DOS (ml)
1	100% - 20	0% - 0
2	0% - 0	100% - 20
3	10% - 3	90% - 27
4	20% - 6	80% - 24
5	30% - 9	70% - 21
6	40% - 12	60% - 18
7	50% - 15	50% - 15
8	60% - 18	40% - 12
9	70% - 21	30% - 9
10	80% - 24	20% - 6
11	90% - 27	10% - 3

As primeiras soluções usadas no *Spin Coating* foram:

- ✓ acetato celulose + acetona
- ✓ etilcelulose + diclorometano - metanol 1:1
- ✓ acetato butirato de celulose + diclorometano
- ✓ poliestireno + THF
- ✓ 1180A +DMF (m= 0,5 g e V= 6 ml)

Na preparação de todas estas soluções, excepto a última, o volume usado foram 10 ml e a massa 0,5 g tendo assim as soluções uma concentração de 5%. Esperou-se algum tempo e no final as soluções mais viscosas foram a etilcelulose e o acetato celulose.

Após a preparação das soluções realizou-se o revestimento das placas durante 60 segundos com um programa constituído por apenas um passo em que a velocidade era de 1500 rpm, a aceleração de 100 rpm/s.

Posteriormente prepararam-se algumas soluções. A composição, das mesmas, encontra-se descrita de seguida:

- ✓ PHBV + clorofórmio
 $\rho_{\text{PHBV}} = 50 \text{ mg/ml}$
 $m = 2,5 \text{ g}$
 $V = 50 \text{ ml}$
 $T = 40^\circ\text{C}$ (num banho)
 $t = 24 \text{ h}$

- ✓ Acetato celulose + clorofórmio
 $m = 1 \text{ g}$
 $V = 20 \text{ ml} + 20 \text{ ml}$

- ✓ Etilcelulose + clorofórmio
 $m = 1 \text{ g}$
 $V = 20 \text{ ml}$

- ✓ Acetato butirato de celulose + clorofórmio
 $m = 2 \text{ g}$
 $V = 10 \text{ ml}$

- ✓ Polimetacrilato de metilo + clorofórmio
 $m = 3 \text{ g}$
 $V = 10 \text{ ml}$

- ✓ Poliestireno + clorofórmio
 $m = 2 \text{ g}$
 $V = 10 \text{ ml}$

- ✓ Elastollan 1180A50 + clorofórmio
 $m = 1 \text{ g}$
 $V = 30 \text{ ml}$

- ✓ PEG 300 + DMF
m=2 g → V=3,56 ml
V=8,22 ml

- ✓ PEG 300 (F217) + clorofórmio (C111)
m=2 g → V=3,56 ml
V=8,22 ml

- ✓ PEG 2000 (F214) + DMF (C112)
m=4 g
V=10 ml

- ✓ PEG 2000 + clorofórmio
m=4 g
V=10 ml

- ✓ PEG 20 000 + DMF
m=4 g
V=10 ml

- ✓ PEG 20 000 + clorofórmio
m=4 g
V=10 ml

Uma vez que o clorofórmio e o tetrahydrofurano não podem ser usados no *Spin-Coating* tentou-se arranjar outros solventes então prepararam-se as seguintes soluções: 1180A50, poliestireno e PEG 300 todos dissolvidos em dimetilformamida (DMF).

Em seguida revestiram-se ambas as placas de Elastollan, 1180A50 e 685A por *Spin Coating* com as três soluções.

Posteriormente, prepararam-se soluções de poliestireno em DMF e de Elastollan 1180A50 em DMF com diferentes percentagens (5%, 20%, 30%, 50%).

A densidade do poliestireno é ρ (poliestireno) = 1,05 g/cm³ e no final quer-se um volume $V_f = 20$ ml. Para uma concentração 5% temos $20 \times 0,05 = 1$ ml de poliestireno e 19 ml de DMF. Como $\rho = \frac{m}{V}$ então 1ml de poliestireno é 1,05ml uma vez que $m = \rho \times V = 1,05 \times 1$. Seguindo o mesmo raciocínio e sabendo que a ρ (1180A50) = 1,11 g/cm³ surgem os valores expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Cálculos para a preparação das soluções de poliestireno e Elastollan 1180A50 ambos em DMF.

Para 20 ml de solução	Quantidade de Poliestireno a usar (g)	Quantidade de Elastollan 1180A50 a usar (g)	Volume de DMF (ml)
5% → 1 ml	1,05	1,11	19
20% → 4 ml	4,2	4,44	16
30% → 6 ml	6,3	6,66	14
50% → 10 ml	10,5	11,1	10

Passou-se a solução de poliestireno a 30% para uma concentração de 25%. Seguindo o raciocínio anterior, constata-se que é necessário dissolver 5,55 g de Elastollan em 18 ml de DMF, para obter uma concentração de 25%. Assim, para alterar a concentração de 30% para 25% adicionaram-se 4 ml de DMF.

Contudo, surgiu um problema com a solução de poliestireno. Quando em contacto com água, forma uma película branca. Então para não se desperdiçarem placas testou-se a solução. Preparou-se uma placa numa placa de vidro e mergulhou-se a placa formada em água. Para eliminar todas as dúvidas revestiu-se uma placa por *Spin Coating* com a solução de poliestireno em DMF a 20%, preparada anteriormente.

O programa usado é constituído por cinco passos e está descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Programa usado no *Spin Coating*.

Step	1	2	3	4	5
Tempo	60	60	10	40	20
Velocidade	1000	3000	6000	5000	5
Aceleração	1000	1000	1000	1000	1000
Vácuo	x	x	x	x	x

Dado que o poliestireno dissolvido em DMF forma uma película branca, quando é colocado em contacto com a água, torna-se necessário encontrar outro solvente para este composto. Testaram-se outros solventes, nomeadamente a acetona e o ciclohexano, uma vez que a responsável pela cor da placa poderia ser a DMF. Preparou-se uma solução de poliestireno em acetona e outra de poliestireno dissolvido numa mistura acetona/ciclohexano (1:1).

Após a realização de alguns estudos, externos a este trabalho, constatou-se que as células não aderem à placa 685A, mas aderem à 1180A50. Pensou-se em revestir a placa de Elastollan 685A com o outro Elastollan dissolvido em DMF para ver se as células aderem. Então, revestiu-se o Elastollan 685A, com uma solução de Elastollan 1180A50 em DMF, a 10%.

Revestiram-se placas por *Spin Coating* com a solução a 10% de Elastollan 1180A50 em DMF usando o programa constituído pelos cinco passos, já descrito. Dado que esta placa ficou opaca, preparou-se uma outra a 5%.

Revestiu-se ainda, por *Spin Coating*, uma placa com uma solução de poliestireno em DMF a 1% (0,1 g de poliestireno em 10 ml de DMF).

Em seguida decidiu-se revestir as placas com poli (ácido láctico) (PLLA) uma vez que este contém um grupo hidroxilo numa ponta e na outra um carboxilo como se pode ver através da estrutura representada na Figura 9.

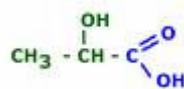


Figura 9 – Fórmula do poli (ácido láctico) (PLLA)^[19].

O PLLA é solúvel em clorofórmio no entanto, este não pode ser usado no *Spin Coating* então testou-se a DMF. A solução foi preparada a 30% por isso colocaram-se 3 g de PLLA e 7 ml de solvente, uma vez que se admitiu que a densidade do PLLA é 1 g/cm³. Deixou-se a solução a agitar durante uma noite.

A solução de PLLA em DMF ficou branca e formou uma pasta e não um líquido então teve de se diluir esta solução para 20%. Após a preparação da solução revestiu-se uma placa

por *Spin Coating* com a mesma. Preparou-se ainda o PLLA dissolvido em THF, a 30%, e usou-se a *bird* para formar uma película com a solução.

Em seguida revestiram-se duas placas com a *bird*, uma com uma solução de poliestireno em THF e outra de poli (cloreto de vinilo) (PVC) em THF.

Revestiram-se cinco placas, duas das quais eram Elastollan 1180A50 e as restantes três Elastollan 685A. As primeiras revestiram-se com Elastollan 1180A50 em DMF a 5% e poliestireno em DMF a 1%. As segundas revestiram-se com Elastollan em DMF a 5% e a 10% e poliestireno em DMF a 1%. Colocaram-se todas as placas depois de secas em água para ver se a película formada ficava branca e/ou se descolava.

3.2. Activação da superfície do material por enxerto

Após o término do revestimento de várias placas com algumas soluções, nesta parte do trabalho ir-se-á usar outro método, a enxertia de placas com grupos reactivos, através de vários processos.

3.2.1. Modificação da superfície com grupos hidroxilo

Nesta parte do trabalho, recorre-se à activação da superfície das poliuretanas pelo enxerto de grupos hidroxilo (-OH), uma vez que estes grupos são reactivos e permitem acoplar outros compostos com diferentes grupos terminais podendo assim atingir os objectivos desejados. O procedimento utilizado para o enxerto de grupos hidroxilo encontra-se esquematizado na Figura 10 e foi o seguinte:

- colocaram-se as placas de poliuretana em isopropanol nos ultrasons durante 15 minutos, para as limpar.
- Meteram-se as placas em peróxido de hidrogénio (H₂O₂), 5 ml/placa, num banho a 35°C com agitação e irradiaram-se com UV durante 4h (testaram-se outros tempos no entanto este foi o que deu melhores resultados) de modo a criar radicais tanto na poliuretana como no peróxido.
- Retiraram-se e lavaram-se com água destilada (dH₂O).

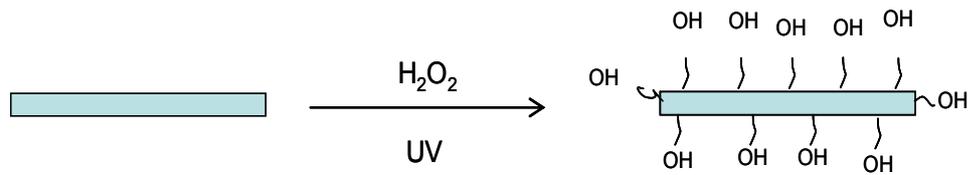


Figura 10 – Enxerto de grupos hidroxilo na placa.

O procedimento usado para a determinação dos grupos hidroxilo foi adaptado a partir do método de *Fritz e Schenk*.

Primeiro prepara-se o reagente de acetilação. Adicionam-se 13 ml de ácido perclórico a 845 ml de acetato de etilo. Em seguida, adicionam-se 30ml de anidrido acético e deixa-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. É arrefecido, posteriormente, até aos 5°C e adicionam-se 90 ml de anidrido acético, previamente arrefecido a 5°C. Deixa-se a solução, durante uma hora, a 5°C, e em seguida deixa-se aquecer até atingir a temperatura ambiente.

Pipetam-se, exactamente 20ml do reagente de acetilação para os balões de Erlenmeyer (um para cada amostra e um para a determinação do branco). Emerge-se uma placa Elastollan 1180A50 e 685A em cada frasco e deixa-se a reagir durante 1 hora. Depois adicionam-se 5ml de água e 20ml de uma mistura 3:1 de piridina-água. Deixam-se os balões em repouso durante 5 minutos. Em seguida, pipetam-se 50ml de potássio hidróxido metanólico 0,5 N para cada balão (inclusive o do branco). Finalmente, as soluções são tituladas com hidróxido potássio metanólico 0,5 N. O indicador usado é a fenolftaleína.

3.2.2. Modificação da superfície com grupos carboxilo

A modificação de superfícies pode ser realizada através da enxertia de grupos hidroxilo e carboxilo. Seguidamente explicar-se-á a enxertia de grupos carboxilo na membrana.

Para enxertar grupos carboxilos nas placas (Elastollan 685A e 1180A50) recorreu-se a dois monómeros, o ácido cloroacético ^[20], ou também chamado ácido monocloroacético e o ácido acrílico ^[21]. Os procedimentos para ambas as situações encontram-se esquematizados na Figura 11 e foram os seguintes:

- após foto-oxidação: enxertou-se ácido monocloroacético (MCA) por reacção de condensação.

1. Colocaram-se as placas de poliuretano num copo e adicionaram-se 5 ml/placa de NaCl 0,1 M.

2. Colocou-se o copo em agitação num banho de gelo e adicionou-se NaOH 6 M (ver Anexo B) até atingir os 15°C

3. De seguida retirou-se o copo do banho e adicionaram-se 2 ml/placa de ácido monocloroacético a 2%

4. Colocou-se a solução durante 70min sob agitação num banho a 25°C.

5. Tirou-se a solução do banho e lavaram-se as placas com NaCl 0,1 M (ver anexo B) 3 ou 4 vezes.

6. Por fim secaram-se as placas.

- Após foto-oxidação: enxertaram-se os grupos carboxilo do ácido acrílico (AA) através do reagente de Fenton.

- Colocaram-se as placas numa solução a 30% de AA em atmosfera inerte e adiciona-se 0,1 ml de 0,015 M FeSO₄ (sulfato de ferro) / 0,005 M H₂SO₄ (por placa) num banho a 60°C durante 2 h.

- Retiraram-se as placas do banho e lavaram-se com PBS (tampão fosfato numa solução salina) (ver Anexo C) e H₂O destilada:

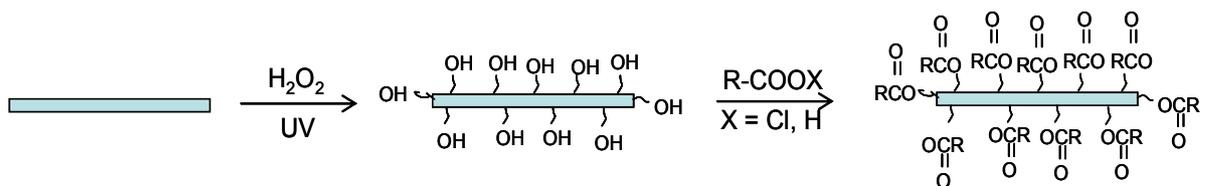


Figura 11 – Enxerto de grupos carboxilo na placa.

Para a determinação dos grupos carboxílicos, pipetam-se exactamente 20 ml de NaOH 0,005 M para os copos que irão ser usados. Um copo é reservado para a determinação do branco. Nos outros, é colocada uma placa modificada e deixa-se durante 24 horas. As placas são retiradas da solução de NaOH. Por último, as soluções finais e o branco são tituladas com HCl 0,005 M.

De modo a verificar a estabilidade do material ao longo do tempo, testou-se a capacidade de absorção de humidade (*swelling*) e a degradação.

3.2.3. Análise da Capacidade de Absorção de Humidade (*Swelling*)

Após se ter procedido a várias modificações nas placas foi necessário realizar algumas técnicas de caracterização, para verificar se as características do material se alteravam. A análise da capacidade de absorção de humidade foi uma das que teve que ser efectuada.

Colocaram-se as amostras para *swelling* num exsiccador, que contém uma solução saturada de sulfato de cobre. Este estudo foi realizado ao longo de 14 dias, tempo máximo que o biosensor poderá ser usado.

A capacidade de absorção de humidade pode ser calculada usando a seguinte fórmula:

$$S(\%) = \frac{W_f - W_i}{W_f} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

- ✓ S – *Swelling* (%)
- ✓ W_f – peso final (g)
- ✓ W_i – peso inicial (g)

3.2.4. Análise da Degradação

Tal como foi necessário analisar a capacidade de absorção de humidade, também se observou a degradação dos materiais, com e sem modificação.

No estudo da degradação colocou-se cada placa em 5ml do soro *MegaCell Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM).

A perda de massa por degradação pode ser calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (11)$$

Onde:

- ✓ W_f – peso final (g)
- ✓ W_i – peso inicial (peso seco) (g)

3.2.5. Optimização das reacções com grupos carboxilo

Após efectuar uma reacção é necessário optimizá-la, isto é, encontrar os parâmetros com os quais esta obtém melhores resultados.

As placas modificadas com ácido acrílico quando colocadas em contacto com as células, estas morrem. Então torna-se necessário encontrar a causa desta morte. Assim, colocaram-se as placas modificadas com ácido acrílico (AA) em água durante um dia para depois medir o pH. Uma vez que os valores obtidos foram muito baixos pensou-se que as placas não estivessem bem lavadas, pelo que se resolveu deixa-las em água durante mais tempo, por exemplo 3 dias, para ver se o pH aumentava ao longo do tempo.

Colocou-se uma placa de cada um dos Elastollan modificados com AA em água (20ml) para fazer uma posterior medição do pH. O pH que se mediu, foi o que estava a ser induzido ao meio que rodeia a placa modificada. O pH da água destilada que se foi usada rondava os oito.

Como os resultados obtidos com o procedimento anterior não foram os desejados, tentou-se alterar o procedimento, ou seja, utilizar uma menor concentração de ácido, talvez assim o pH da placa não se mantivesse baixo. Em vez de se preparar a solução de AA a 30% preparou-se a 10% e fez-se a modificação retirando ou não o inibidor ao ácido. As placas usadas foram apenas de Elastollan 1180A50 já modificadas com grupos hidroxilo.

Para retirar o inibidor ao AA recorreu-se a uma coluna de purificação feita com algodão, areia e alumina (Al_2O_3) como mostra o esquema da Figura 12.

O procedimento usado foi o mesmo que se utilizou anteriormente. No final da reacção retiraram-se as placas, lavaram-se muito bem com água destilada e depois deixaram-se a agitar em água durante a noite. Após essa noite retiraram-se as placas e mediu-se o pH das águas.

Uma vez que se modificaram duas placas com inibidor e duas sem, usou-se uma de cada para determinação dos grupos e as restantes duas mergulharam-se em água, que apresentava inicialmente um pH oito, para medir posteriormente o pH induzido pela placa ao meio circundante.

Após verificar que a reacção com o ácido acrílico não é viável para este estudo, uma vez que não reúne as condições desejáveis, é necessário optimizar a reacção com o ácido monocloroacético.



Figura 12 – Esquema representativo das colunas de purificação para retirar o inibidor ao AA.

Para otimizar a reacção com o MCA, isto é, para se encontrar as condições/parâmetros com os quais se obtêm melhores resultados variou-se o tempo e a concentração de ácido cloroacético.

O ácido cloroacético tem uma densidade $\rho_{CA} = 1,58 \text{ g/cm}^3$ e quer-se um $V_{\text{total}} = 10 \text{ ml}$ então para uma concentração a 4% ter-se-á $10 \times 0,04 = 0,4 \text{ ml}$ e $m = \rho \times V = 1,58 \times 0,4 = 0,632 \text{ g}$. Para as restantes concentrações ter-se-á:

Para 6% $m = 1,58 \times 0,6 = 0,948 \text{ g}$

Para 8% $m = 1,58 \times 0,8 = 1,264 \text{ g}$

Para 10% $m = 1,58 \times 1 = 1,58 \text{ g}$

Para 30% $m = 1,58 \times 3 = 4,74 \text{ g}$

O procedimento usado foi semelhante ao já descrito, variado apenas a concentração do ácido e o tempo da reacção (70 ou 90 min). Posteriormente quantificaram-se os grupos carboxilos.

3.2.6. Processamento das placas

As placas usadas neste projecto são feitas de uma poliuretana por *injection molding* na Alemanha, como já foi referido anteriormente. Uma vez que as placas demoram algum tempo a chegar pensou-se em fazer as placas na prensa, a partir de Elastollan em *pellets*.

Para produzir as placas de Elastollan 1180A50 deixou-se a máquina aquecer até aos 200°C, sob pressão. Colocaram-se os *pellets* de Elastollan 1180A50 nos moldes, meteram-se os moldes com o material na prensa e pressionou-se até aos 1000 *metric tons*. Deixou-se durante 1min nos 1000 *metric tons* e em seguida aliviou-se a pressão, repete-se este processo três vezes. Por fim pressionou-se até atingir a pressão máxima e deixou-se neste ponto durante 3 a 5 min. No final desligou-se a prensa para não haver aumento de temperatura e ligou-se o ar comprimido para arrefecer, sob uma pressão.

3.2.7. Fotopolimerização do estireno e do ácido acrílico

Fez-se fotopolimerização, com a lâmpada UV, do estireno e do ácido acrílico durante 4 horas. Prepararam-se soluções de ácido acrílico a 50% e de estireno também a 50%. Adicionaram-se 25 mg do fotoiniciador Irgacure.

Irradiaram-se placas cobertas com uma solução a 1% de estireno em água destilada para testar se era mesmo o estireno que estava a tornar as placas brancas ou se seria o facto da solução na experiência anterior com irradiação ter uma elevada concentração ou por conter muito iniciador. O estireno foi passado pelas colunas de purificação.

3.2.8. Ligação de um aminoácido ou proteína às placas

Antes de serem feitos os testes com células serão realizadas ainda algumas modificações, envolvendo aminoácidos e proteínas.

3.2.8.1. Ligação da glicina

Começou por se ligar aminoácidos aos grupos –OH com carbodiimidazol (CDI). Para tal pesaram-se 0,06 g de CDI e juntaram-se 15 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Numa caixa de seis poços colocaram-se três placas de cada Elastollan, adicionaram-se 5 ml da solução,

preparada anteriormente, a cada um dos poços e colocou-se a caixa numa estufa a 25°C durante 2 h. No final das duas horas retiraram-se as placas e passaram-se três vezes por água. Preparou-se uma solução de glicina em tampão fosfato numa solução salina (PBS) para tal pesaram-se 4.49mg de glicina e adicionou-se 1ml de PBS. Depois adicionou-se 0,1 ml (100µl) da solução de glicina em PBS e 4,9 ml (4900 µl) de PBS a cada uma das placas e deixou-se a reagir durante 18 h a 25°C.

Como os resultados com o DMSO não foram os melhores, decidiu-se então substituir este por outro solvente que dissolva a CDI. Testou-se então a acetona e o THF.

3.2.8.2. Ligação da lisina e das Polilisinas D e L

Ligar uma proteína ou um aminoácido à placa pareceu uma boa ideia então pesquisou-se e escolheu-se a polilisina pelas suas propriedades de adesão. Em todas as experiências que serão posteriormente esplanadas usaram-se sempre as duas polilisinas, polilisina D (PDL) e polilisina L (PLL). A diferença entre elas é que a polilisina D é uma substância dextrógira, ou seja, roda o plano de polarização para a direita e a polilisina L roda para a esquerda por isso designa-se levógira. Na ligação covalente usou-se também um aminoácido, a lisina. Foi escolhido este aminoácido (Figura 13) porque tem dois grupos amínicos, podendo assim um deles ligar-se ao grupo carboxilo e outro ficar livre para se ligar às células.

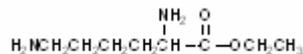


Figura 13 – Fórmula química da L-lisina etil éster.

Foram então realizadas modificações com a lisina e a polilisina D e L por vários processos, tais como, UV, absorção e ligação covalente.

3.2.8.2.1 Modificação por UV

Modificaram-se várias placas por fotopolimerização, adicionou-se H₂O₂ (10 ml/placa) e polilisina (2,5 ml/placa). Deixou-se a reagir durante 4 h com radiação UV, num banho a 35°C.

3.2.8.2.2. Modificação por absorção

Segundo o protocolo para a preparação de revestimentos usando a polilisina D e L ^[22], o procedimento é constituído por cinco passos, no entanto fez-se uma adaptação do mesmo, utilizando apenas três das etapas, seguidamente explicitadas:

1. Preparação Polilisina D e L

- Retirar 5 mg de Polilisina e deixar à temperatura ambiente até atingir a mesma.
- Adicionar 50 ml de água.
- Agitar bem e deixar entre ½ a 1 hora.
- Mexer novamente e guardar a 2-8°C ou -20°C (mas só usar depois mais uma vez).

2. Preparação da solução de Polilisina

- Colocar 142,5 ml de dH₂O num goblé plástico de 250 ml e adicionar 17,5 ml de PBS 1 M (ver Anexo C).
- Adicionar 15 ml da solução preparada de Polilisina.
- Agitar suavemente.

3. Preparação das placas

- Retirar as placas da solução de dH₂O.
- Usar recipientes de plástico, colocar as placas e encher com solução de Polilisina até submergir as placas.
- Colocar a agitar durante 60 a 90 minutos.
- Retirar da agitação, retirar as placas e submergir em dH₂O (lavar muito bem) e deixar em água no mínimo 30 minutos.
- Retirar as placas e coloca-las na estufa em vácuo a 50°C durante 20 minutos.

Neste procedimento foram impregnadas placas sem qualquer modificação e com grupos –OH.

3.2.8.2.3. Modificação por ligação covalente

Modificaram-se várias placas de cada Elastollan com grupos –OH e em seguida com ácido monocloroacético (MCA) para ficarem com grupos –COOH.

O processo que será seguido para a ligação covalente de ambas as polilisinas, D e L, e da lisina foi baseado no trabalho de N. R. Shenoy, J. M. Bailey, J. E. Shively^[23]. Começou-se por preparar uma solução de 250 ml de acetonitrilo a 50%. Retiraram-se 240 ml da solução anterior e adicionaram-se 0,5 mg de carbodiimidazol (CDI) por cada 5 ml de solução.

Após preparar esta solução colocaram-se as placas, com grupos –COOH, em placas de 6 poços e adicionaram-se 10 ml da solução a cada poço. Deixaram-se as placas numa estufa a 22°C durante 2 h, em seguida retiraram-se e lavaram-se com água destilada. Secaram-se na estufa de vácuo e depois cobriram-se com uma solução de polilisina L, D ou L-lisina etil éster e colocaram-se novamente na estufa durante 20 h.

3.3. Testes de Adesão Celular

Após a realização das várias experiências químicas iniciaram-se os testes de adesão celular das modificações realizadas no laboratório químico. As células usadas em estudos nesta área são os fibroblastos 3T3, no entanto, neste trabalho usaram-se fibroblastos normais humanos. Estes foram cedidos por uma investigadora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC). O meio de cultura usado foi o *HAM –F10* (Gibco. Referência 31550), com soro bovino fetal (FCS) a 15% (Gibco. Faetal Bovine Serum/ Heat inactivated Ref. 10500-064). A um frasco de 500 ml deste meio adicionaram-se 5 ml de uma solução de penicilina (P) (10.000 U) e estreptomicina (S) (10 mg/ml) (Sigma P0781), 5 ml de L – glutamina (Sigma G7513) e 1 ml de canamicina (Sigma K0254). A penicilina, a estreptomicina e a canamicina são antibióticos. Depois de misturar todas estas substâncias nas quantidades referidas o meio ficou completo e pronto para ser utilizado. Todos os reagentes são estéreis e foram manipulados em condições de esterilidade.

A Organização Internacional para a Padronização (ISO – International Organization Standardization) apresentou a norma ISO 10993 para orientar a apreciação biológica de dispositivos utilizados em Medicina. Esta norma tem aplicação em dispositivos que contactem directa ou indirectamente com o corpo ou com fluidos corpóreos. A primeira fase de avaliação é descrever o material a aferir, de acordo com a Parte 1 (ISO 10993 – 1:2003).

Os tempos sugeridos pelo artigo analisado ^[24] eram 24, 72, 120 e 168 h (7 dias). No entanto, como as placas modificadas poderão ser utilizadas num biosensor que será aplicado no ser humano durante 14 dias este será um tempo que deverá ser também testado. Perante tudo isto decidiu-se testar quatro tempos 24, 80, 168 h (7 dias) e 336 h (14 dias).

Para a realização deste trabalho utilizaram-se caixas de 24 poços (Well Cell Culture Cluster with flat bottom, Costar® Corning Incorporated 3524, NY 14831, USA), por isso os círculos de poliuretano deveriam ter um diâmetro de 1,4 cm. As placas foram cortadas com um tubo de ferro afiado num dos lados: colocou-se esta peça sobre o material, com o lado afiado virado para a placa, e martelou-se do lado oposto do tubo. Modificaram-se as placas de ambos os lados para garantir que se testava a face correcta, uma vez que seria difícil marcar a face não modificada, pois não é possível usar tintas devido à sua toxicidade.

As substâncias a testar, ou seja, as bases 1 e 2 e os revestimentos 3 a 14, foram os seguintes:

1. Elastollan 685A → A
2. Elastollan 1180A50 → B
3. Elastollan 1180A50 em DMF (5%) → líquido → C
4. PEG 300 em DMF (5%) → líquido → D
5. Poliestireno em THF (1%) → líquido → E
6. Polilisina D por UV
7. Polilisina L por UV
8. Polilisina D por absorção
9. Polilisina L por absorção
10. OH + Polilisina D por absorção
11. OH + Polilisina L por absorção
12. Polilisina D por ligação covalente
13. Polilisina L por ligação covalente
14. Lisina por ligação covalente

Esta enumeração será usada para a apresentação dos resultados. A esta lista será acrescentada a base 0, que representa a caixa de 24 poços, e o revestimento 15, que codifica o controlo, isto é, apenas fibroblastos.

Na primeira etapa do trabalho realizaram-se as seguintes experiências:

Experiência 1 → fibroblastos + 1 + 6	Experiência 9 → fibroblastos + 1 + 10
Experiência 2 → fibroblastos + 2 + 6	Experiência 10 → fibroblastos + 2 + 10
Experiência 3 → fibroblastos + 1 + 7	Experiência 11 → fibroblastos + 1 + 11
Experiência 4 → fibroblastos + 2 + 7	Experiência 12 → fibroblastos + 2 + 11
Experiência 5 → fibroblastos + 1 + 8	Experiência 13 → fibroblastos + 1 + 12
Experiência 6 → fibroblastos + 2 + 8	Experiência 14 → fibroblastos + 2 + 12
Experiência 7 → fibroblastos + 1 + 9	Experiência 15 → fibroblastos + 1 + 13
Experiência 8 → fibroblastos + 2 + 9	Experiência 16 → fibroblastos + 2 + 13

Antes de iniciar o trabalho laboratorial foi necessário esterilizar ^[25] o material, para tal aspergiu-se o aparelho de esterilização com álcool a 75° (U.V. Estéril, J.P. Selecta. S.A., watt.15, Nº 251897) e colocou-se na câmara de fluxo laminar (Holten LaminAir HB 2448), onde se ligou o U.V., quer do aparelho quer da câmara, durante aproximadamente 30 minutos, para obter um ambiente estéril.

Após este período ligou-se o fluxo da câmara durante alguns minutos.

De seguida colocaram-se 6 círculos de cada modificação, com uma pinça esterilizada, em tubos *Falcon* estéreis de 50 ml (Corning PQ – Premium quality, ref: 430829, México) sem ficarem sobrepostos. Os tubos *Falcon* foram aspergidos com álcool a 75° (BWR) antes de entrarem na câmara. Em seguida, puseram-se os tubos abertos e as tampas dentro do aparelho de esterilização. Para a esterilização ser eficaz ligou-se o U.V. do aparelho de esterilização e da câmara de fluxo laminar durante cerca de 2 h. No final deste tempo fecharam-se e selaram-se os tubos com *parafilm*.

A disposição das experiências nas placas apresenta-se através da Figura 14. Para cada tempo foram necessárias duas caixas de 24 poços. Uma vez que não existiam células suficientes para a realização dos quatro tempos, em simultâneo, prepararam-se apenas os três últimos, 80, 168 e 336 h (T₁, T₂ e T₃), respectivamente. Utilizaram-se, também, dois poços para controlo, apresentados com a letra C, colocando apenas por fibroblastos directamente na caixa.

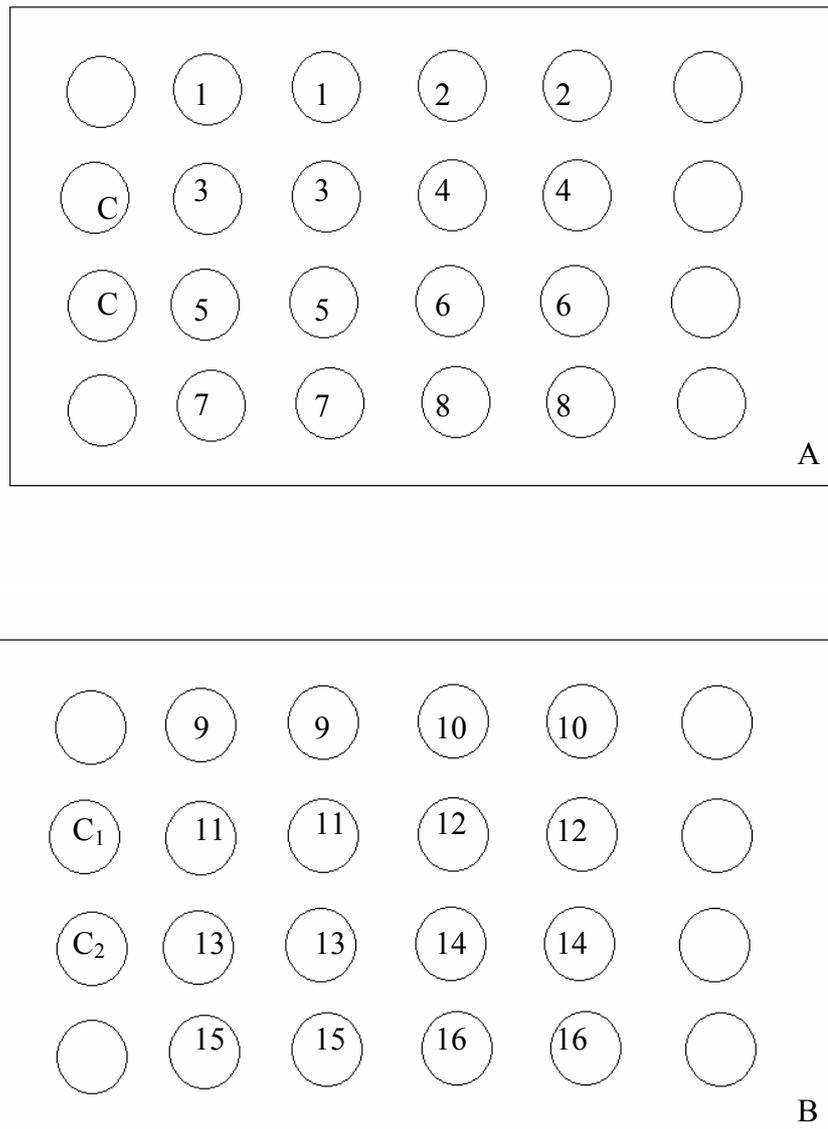


Figura 14 – Disposição das experiências nas placas A e B de 24 poços, para os tempos da primeira fase.

3.3.1. Realização dos testes de adesão

Os fibroblastos humanos foram inicialmente colocados num frasco de cultura de 40 ml (25 cm²) (Orange Scientific, USA, 2010100) em condições assépticas, com o meio de cultura atrás referido, numa estufa a 37°C e atmosfera enriquecida em 5% de CO₂, em condições de assepsia. A cultura foi controlada ao microscópio óptico de contraste de fase e o meio foi sendo sucessivamente mudado para fornecer mais nutrientes às células e para se retirarem os produtos do metabolismo do crescimento celular dentro da câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com U.V.. Estas células demoraram cerca de 2-3 semanas a ficar

confluentes. Quando se verificou a confluência dos fibroblastos neste frasco foram divididos para dois novos frascos estéreis de cultura (A e B) (Corning® Flask, Corning Incorporated, 3275) para continuarem a crescer, de modo a ser obtido um número de células adequado às experiências programadas. Os frascos (A e B) utilizados estiveram em incubação na estufa, nas condições atrás referidas, desde o dia 7 de Maio, respectivamente.

O procedimento para a colocação das poliuretanas nas caixas é o seguinte: colocaram-se os círculos de poliuretanas com ou sem revestimento, em ambas as faces, nas caixas de cultura (24 poços) com a ajuda de uma lâmina de bisturi estéril, evitando danificar o revestimento.

Após a contagem do número de células e ressuspensão do *pellet* em meio de cultura, mediante o número de células e experiências a realizar, as células devem ser colocadas sobre as poliuretanas de modo o mais uniforme possível com um fluxo constante, mas não muito elevado e evitando a formação de bolhas.

No início do procedimento ^[26]^[27] raspou-se um dos frascos (Figura 15) onde as células foram cultivadas, com um raspador esterilizado (Sarstedt sterile, cell scraper 25 cm, 2 position blade, 83.1830). Retiraram-se os 10 ml de meio com as células descoladas e colocaram-se num tubo *Falcon* estéril de 15 ml (Corning PQ – Premium quality, 430791, México). A este volume adicionaram-se mais 2 ml de meio, que tinham sido usados para lavar a caixa e o raspador. Depois de descolar as células colocaram-se 8 ml de meio novo dentro da caixa raspada, para que na eventualidade de não terem sido descolados todos os fibroblastos estes tivessem a possibilidade de continuar a crescer. No final colocou-se o frasco novamente na estufa. Repetiu-se este procedimento para a segunda caixa.

Centrifugou-se o conteúdo de ambos os tubos *Falcon*, a 190 G durante 10 min, a 19°C. Após esta centrifugação retirou-se o sobrenadante e juntou-se 1 ml de meio novo ao *pellet* em condições estéreis, isto é, dentro da câmara de fluxo laminar. Realizou-se o teste de viabilidade celular com Azul Ttripano e contagem das células numa câmara de Neubauer isto é, após a centrifugação e ressuspensão com meio, recolheu-se uma alíquota (10 µl) que se colocou num *ependorff* ao qual se adicionaram 10 µl de Azul Tripiano (Sigma–Aldrich, USA, T 8154). Colocaram-se os 20 µl na Câmara de Neubauer (profundidade 0,1 mm/ 0,0025 mm², Germany) e fez-se a contagem do número de células no microscópio óptico invertido (Nikon elipse TS 100). Ao realizar este teste os fibroblastos viáveis ficam corados. Depois deste teste

verificou-se um problema: os fibroblastos humanos formam aglomerados, o que tornou impossível saber a concentração celular com exactidão. Para ultrapassar este problema vortexou-se o *Falcon* com as células com cuidado (para que as células não rebentassem) e contou-se novamente o número de células em suspensão. Realizou-se também o teste de viabilidade celular ao sobrenadante, para saber se existiam células no mesmo, contudo verificou-se que não. Fazendo os cálculos adequados verificámos que na nossa solução tínhamos células para colocar cerca de 104 células ^[28] por poço, num total de 32 poços.

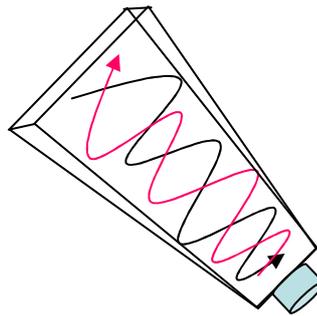


Figura 15 – Esquema representativo dos movimentos de raspagem dos frascos de cultura de células.

Para cobrir os círculos foi necessário colocar 300 µl em cada poço, uma vez que cada caixa tem 16 poços ocupados, foram necessários 4,8 ml para cada caixa.

Para preparar as duas primeiras caixas, T₁ – A e T₂ – A, foram precisos 9,6 ml. O tubo do frasco B tinha o dobro das células do outro, por isso duplicou-se a diluição. Juntaram-se os volumes dos dois tubos e vortexou-se a solução, para ter certeza que era homogénea, e distribuíram-se 300 µl por cada poço. Todos os passos, excepto a centrifugação e vortexação dos tubos, decorreram em ambiente estéril, dentro da câmara de fluxo laminar, tendo sempre o cuidado de aspergir com álcool a 75° o material e luvas do utilizador e usando material esterilizado, para garantir que não havia contaminações. Os frascos de cultura de que dispomos são rolhados com rolhas não ventiladas, assim temos de desenroscar ligeiramente a tampa para que a atmosfera de CO₂ seja eficaz.

Para preparar as placas para os restantes tempos retirou-se da estufa o frasco de origem, que foi entregue pela investigadora da FMUC. Verificou-se que este continha o dobro dos fibroblastos da soma dos dois frascos utilizados anteriormente, por isso podiam preparar-se mais quatro caixas, T₁ – B, T₂ – B, T₃ – A e T₃ – B. Rasparam-se os fibroblastos e

diluíram-se em 11 ml. Fez-se vortexação da suspensão celular e contaram-se as células na Câmara de Neubauer. Colocaram-se 5 ml desta suspensão no frasco de origem que foi novamente colocado novamente na estufa. Adicionaram-se mais 11,4 ml ao volume que já se encontrava no tubo de *Falcon*, para que a solução fosse suficiente para todas as placas.

No final colocaram-se todas as placas isoladas com fita cola na estufa a 37 °C e 5% CO₂, depois de aspergidas com álcool a 75°.

Três dias após o início do trabalho experimental, concluía-se o primeiro tempo, as 80 horas. Nessa altura realizou-se o teste de proliferação e citotoxicidade para fibroblastos.

Após retirar o meio de todos os poços, adicionaram-se 270 µl de meio novo e 30 µl de brometo de 3 – (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT) ^[29] (Sigma-Aldrich. St.Louis, Missouri, USA; Ref. M 2128) ^[29] e colocaram-se de novo a incubar entre 3 a 4h a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação retirou-se a caixa da estufa e, numa *hotte* ventilada, retirou-se a solução anterior e adicionaram-se 300 µl de isopropanol ácido a cada poço e esperaram-se 15 min à temperatura ambiente. O isopropanol ácido é preparado com 100 µl de HCl 0,04 N em 2-propanol. Este passo não precisa de ser efectuado em ambiente estéril, pois as células vão ser destruídas pelo isopropanol ácido, para dissolver os cristais azuis que se formaram dentro das células viáveis, devido à presença do MTT.

O MTT é usado para realizar um ensaio colorimétrico quantitativo das células mamíferas vivas e da sua proliferação. O anel tetrazólico do MTT é clivado nas mitocôndrias activas, pelo que a reacção só ocorre em células vivas.

O ensaio quantifica apenas as células vivas e o sinal gerado depende do grau de activação das células. Este método pode ser usado para medir citotoxicidade, proliferação ou activação. Os resultados podem ser lidos num leitor de microELISA, que tem um alto grau de precisão. As principais vantagens deste método são a rapidez, a precisão e o facto de não se usar nenhum radionuclido.

Depois dos 15 minutos raspam-se bem os poços com uma ponta pipeta de 1000 µl ajustada para aspirar 300 µl e transferiu-se o seu conteúdo para uma caixa de 96 poços, não estéril (Well Assay Plate with flat bottom, Costar® Corning Incorporated 3590, NY 14831, USA). Ao efectuar a transferência das experiências para a placa de 96 poços, estas ficaram com a disposição esquematizada no Quadro 3.

Quadro 3 – Esquema representativo da disposição das experiências, da primeira fase, na placa de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₁	C ₂	C ₂	1	1	2	2	3	3	4	4	5
B	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11
C	11	12	12	13	13	14	14	15	15	16	16	
D												
E												
F												
G												
H												

Após a conclusão do protocolo, os produtos biológicos foram inactivados com lixívia e colocados em contentores específicos para incineração.

Uma semana após ter terminado a primeira fase dos testes de adesão, iniciou-se a segunda fase, com o objectivo de testar as modificações que não foram analisadas, anteriormente, devido à falta de células. Realizaram-se apenas os dois últimos tempos, ou seja, os sete e os catorze dias. O procedimento seguido foi o utilizado anteriormente. Raspam-se dois frascos de 180 ml e colocou-se meio novo nos mesmos (8 ml). Fez-se vórtex do líquido retirado das caixas e realizou-se o teste de viabilidade celular. Uma vez que a concentração era baixa, centrifugou-se durante 5 min a 190 G e ressuspendeu-se o *pellet* obtido em 4 ml de meio novo. Contou-se, novamente, na Câmara de Neubauer verificando-se que a concentração era de cerca de 100 células. Como se retiraram 4 ml de meio com células de cada caixa, no total tinham-se 8 ml, sendo o suficiente, uma vez que, só eram necessários 7,8 ml (26 poços com 300 µl cada).

Tendo em consideração que a experiência 13 da primeira fase revelou a presença de fungos², no tempo T₃, a mesma foi repetida nesta etapa, sendo-lhe atribuído o número 6. Por este motivo, a caixa do último tempo tem mais dois poços preenchidos.

² Para anular o crescimento dos fungos e contaminação da caixa de experiência e da estufa, foi colocada lixívia esterilizada nestes poços num volume de 600 µl. Efectuando controlo ao microscópio de contraste de fase verificou-se que esta inactivação teve sucesso.

A composição das experiências desta fase é seguidamente apresentada, sendo a sua disposição na caixa demonstrada através da Figura 16.

Experiência 1 → fibroblastos + 1 + 14

Experiência 2 → fibroblastos + 2 + 14

Experiência 3 → fibroblastos + 2 + 3

Experiência 4 → fibroblastos + 2 + 4

Experiência 5 → fibroblastos + 2 + 5

Experiência 6 → fibroblastos + 2 + 13

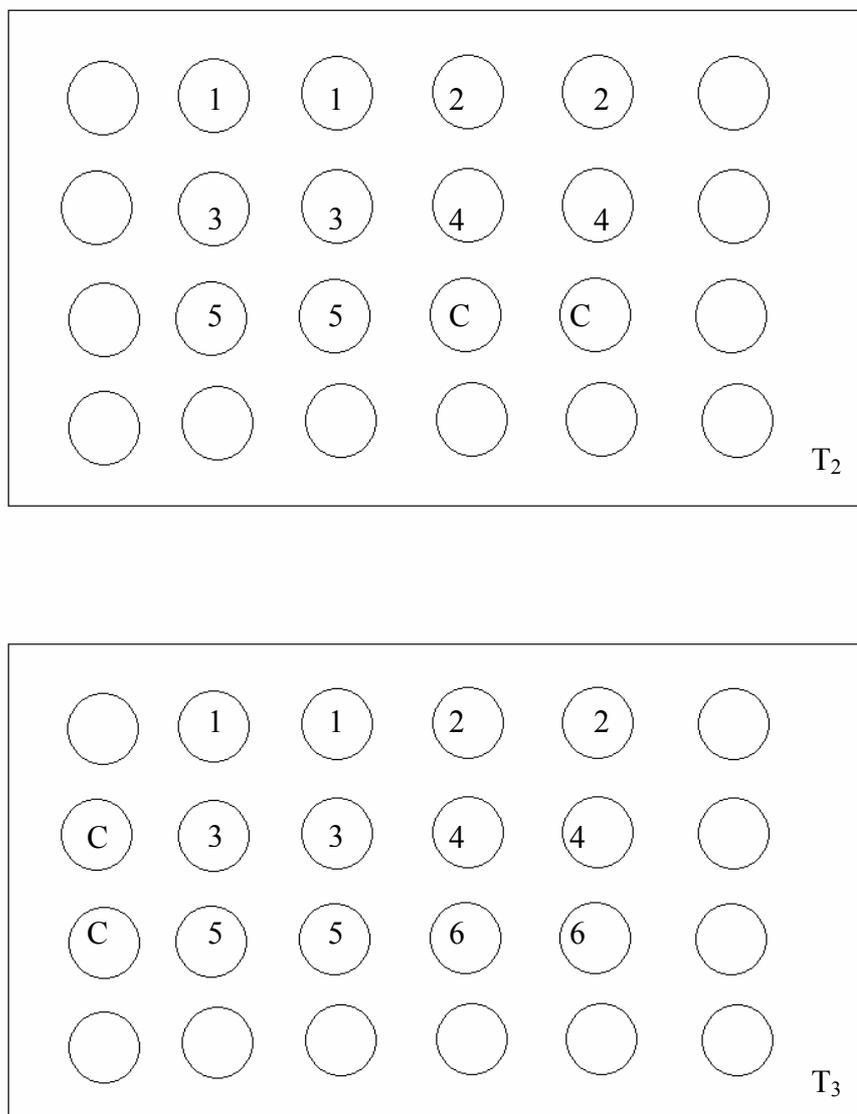


Figura 16 – Disposição das experiências nas placas de 24 poços, para os tempos T₂ e T₃ da segunda fase.

Três dias antes de se atingir o término do T₃ (14 dias) realizou-se o T₁. No entanto, neste tempo usou-se uma legenda diferente, uma vez que tinham que se testar ambas poliuretanas sem qualquer revestimento e os líquidos usados nos revestimentos. Desta forma, a legenda das experiências em T₁ é seguidamente apresentada, estando a sua disposição representada na Figura 17.

- Experiência 1 → fibroblastos + Elastollan 685A
- Experiência 2 → fibroblastos + Elastollan 1180A50
- Experiência 3 → fibroblastos + 1 + 14
- Experiência 4 → fibroblastos + 2 + 14
- Experiência 5 → fibroblastos + 2 + 3
- Experiência 6 → fibroblastos + 2 + 4
- Experiência 7 → fibroblastos + 2 + 5
- Experiência 8 → fibroblastos + 3 [1180A50 + DMF (Líquido)]
- Experiência 9 → fibroblastos + 4 [PEG 300 + DMF (Líquido)]
- Experiência 10 → fibroblastos + 5 [PS + THF (Líquido)]

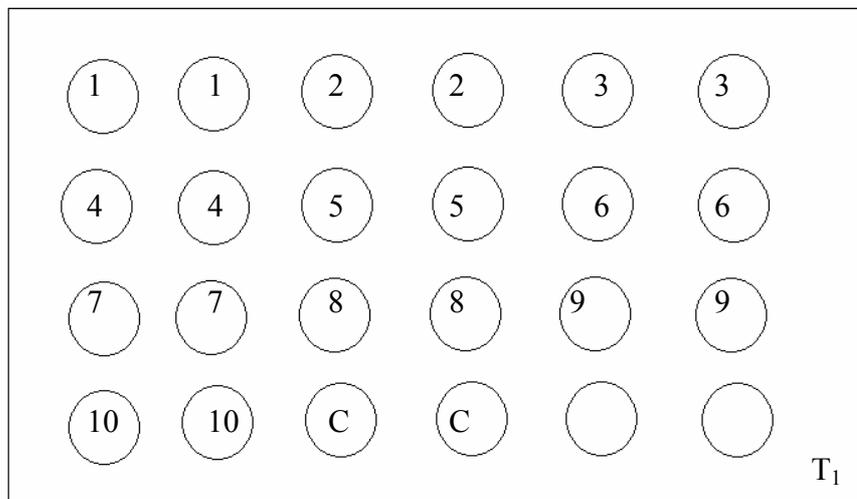


Figura 17 – Disposição das experiências na placa de 24 poços, para o tempo T₁ da segunda fase.

Para esterilizar os líquidos foi necessário filtrá-los com filtros *millipore* de 0,22 μm (Watman® Schleicher & Shuell FP 30/0, 2 CA-S, Dassel, Germany). Usaram-se seringas de 5 ml estéreis (Discardit™ II, CE 0318 Fraga Spain) com agulhas de 21 G × 1” 0,8 × 25,

também estéreis, (Terumo Neolus, Belgium) para aspirar o líquido do frasco onde se encontrava para o filtro acoplado a um *Falcon* estéril.

Filtraram-se todas as amostras para tubos *Falcon*, que se taparam e identificaram.

De acordo com o protocolo habitual todo o material foi aspergido com álcool a 75° antes de ser colocado na câmara de fluxo laminar (Holten LaminAir HB 2448).

Após o término do tempo T₁ e T₃ realizaram-se, novamente, os testes de proliferação e citotoxicidade.

Removeu-se o meio da caixa de cultura, de seguida adicionou-se novo meio e MTT (por cada 100 µl de meio adicionamos 10 µl de MTT) e colocou-se a incubar 3 a 4 horas a 37°C e 5% CO₂.

Após o tempo de incubação retirou-se o conteúdo dos poços e adicionou-se isopropanol ácido, misturando-se homogeneamente para dissolver os cristais azuis e ficou a incubar 15 min à temperatura ambiente.

Com uma pipeta de Gilson e ponta de 1000 µl tentou-se descolar o maior número de células e aspirou-se o conteúdo para uma caixa não estéril de 96 poços (TPP, Tissue Culture Test Plates 96 flat/F 0,31 cm² growth área, nº 92696), tal como descrito anteriormente, e realizou-se a leitura no leitor de microELISA SLT a 540 nm, com um filtro de referência a 620 nm, registando-se os valores.

Ao efectuar a transferência das experiências para a placa de 96 poços, estas ficaram com a disposição esquematizada no Quadro 4.

Quadro 4 – Esquema representativo da disposição das experiências, para T₁ e T₃ da segunda fase, na placa de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	C	T ₃ -1	T ₃ -1	T ₃ -2	T ₃ -2	T ₃ -3	T ₃ -3	T ₃ -4	T ₃ -4	T ₃ -5	T ₃ -5
B	T ₃ -6	T ₃ -6										
C	C	C	C	T ₁ -1	T ₁ -1	T ₁ -2	T ₁ -2	T ₁ -3	T ₁ -3	T ₁ -4	T ₁ -4	T ₁ -5
D	T ₁ -5	T ₁ -6	T ₁ -6	T ₁ -7	T ₁ -7	T ₁ -8	T ₁ -8	T ₁ -9	T ₁ -9	T ₁ -10	T ₁ -10	
E												
F												
G												
H												

Após a conclusão do protocolo, os produtos biológicos foram inactivados com lixívia e colocados em contentores específicos para incineração.

3.3.2. Métodos

Para avaliar a variação da absorvância em função do tempo de incubação (80 h, 7 dias e 14 dias) das bases e dos revestimentos utilizou-se um experimento de três factores com medidas repetidas em um factor:

- Factor 1 – bases com 3 níveis (placa de 24 poços, Elastollan 685A e 1180A50),
- Factor 2 – revestimento com 11 níveis (revestimentos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14),
- Factor 3 – medidas repetidas no tempo (80 horas, 7 e 14 dias).

Foi excluído do experimento o revestimento 4 pelo seguinte motivo, “integrou” esporos de fungos durante o decorrer dos testes.

Para avaliar a variação da absorvância em função do tempo de incubação (80 h, 7 dias e 14 dias) das bases e dos revestimentos utilizou-se um experimento de três factores com medidas repetidas em um factor:

- Factor 1 – bases com 2 níveis (Elastollan 685A e 1180A50),
- Factor 2 – revestimento com 8 níveis (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13),
- Factor 3 – medidas repetidas no tempo (80 horas, 7 e 14 dias).

Foram excluídos do experimento os revestimentos 3, 5, 6 e 14 porque se queria testar apenas os revestimentos realizados com ambas polilisinas D e L.

Para avaliar a variação da absorvância ao fim de 80 horas de incubação das bases e dos revestimentos utilizou-se um experimento de dois factores:

- Factor 1 – bases com 2 níveis (placa de 24 poços e o Elastollan 1180A50),
- Factor 2 – revestimento com 4 níveis (3, 4, 5 e 15),
- Factor 3 – medidas repetidas no tempo (80 horas, 7 e 14 dias).

Foram excluídos do experimento os revestimentos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 pelo seguinte motivo, se pretendia testar apenas os líquidos e os revestimentos realizados com os mesmos.

3.3.3. Análise Estatística

Para além de cálculos de médias e limites de confiança das médias a 95%, efectuaram-se também análises da variância com medidas repetidas e análises da variância de dois factores.

Quando se mostrou adequado efectuaram-se comparações *a posteriori* utilizando os procedimentos de Tukey ou, em alternativa, o LSD (*Least Square Difference*).

Capítulo IV

Resultados e Discussão

4.1. Revestimento das placas por *Spin Coating*

Ao longo deste trabalho foram realizados vários revestimentos usando o aparelho *Spin Coating*. Neste capítulo do trabalho serão apresentados os vários resultados obtidos através deste processo.

4.1.1. Testes de solubilidade e Revestimentos das placas com soluções

Quando se prepararam as soluções de DMF e DOS, o conteúdo do copo número 1 (100% DMF) dissolveu-se após breve aquecimento e agitação. O conteúdo do copo número 2 (100% DOS) não se dissolveu mas ‘inchou’. O melhor resultado foi o do copo número 11 (90% DMF e 10% DOS) que se dissolveu sem ser necessário fazer nada.

No final desta experiência pôde assim concluir-se que a DMF é suficiente para dissolver o Elastollan. Pode também inferir-se que o DOS faz inchar a poliuretana, facilitando assim a entrada da DMF.

Os resultados obtidos, com as primeiras soluções usadas no *Spin Coating*, estão descritos na Tabela 4 e nas Figuras 18 a 27.

Tabela 4 – Resultados de algumas modificações com derivados da celulose e do poliestireno.

Modificação	Resultado
685A + acetato butirato de celulose	opaco
1180A + acetato butirato de celulose	opaco e descolou
685A + etilcelulose	branco e descolou
1180A +etilcelulose	branco e descolou
685A + acetato celulose	formou uma película que descolou
1180A + acetato celulose	formou uma película que descolou
685A + poliestireno	transparente e aderiu
1180A + poliestireno	transparente e aderiu mas dobrou um pouco
685A + 1180A + DMF	aderiu mas concentrou-se mais nas bordas
1180A +1180A + DMF	aderiu mas concentrou-se mais em certas zonas

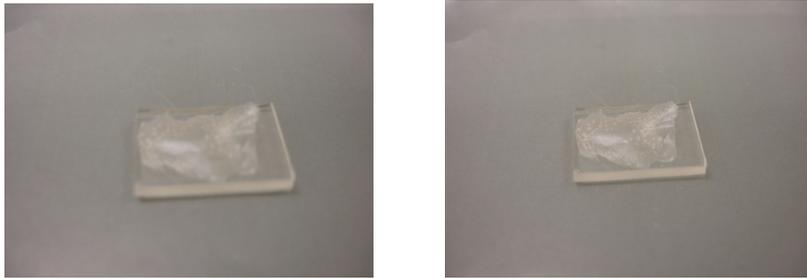


Figura 18 – Elastollan 1180A50 revestido com acetato de celulose em acetona.

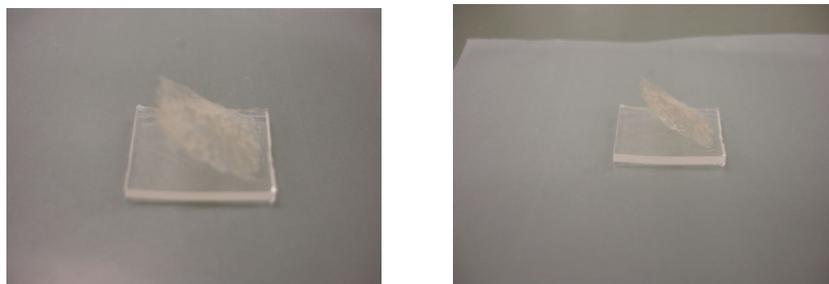


Figura 19 – Elastollan 685A revestido com acetato de celulose em acetona.

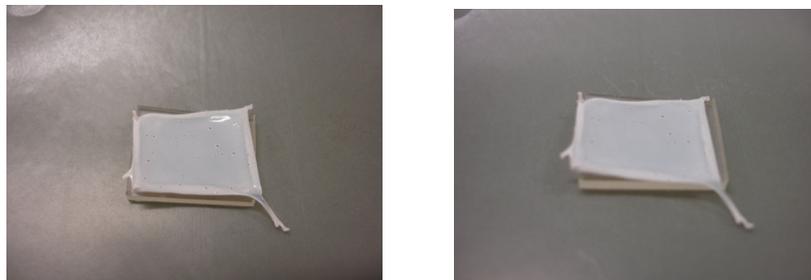


Figura 20 – Elastollan 1180A50 modificado com etilcelulose em diclorometano – metanol numa proporção de 1:1.



Figura 21 – Elastollan 685A modificado com etilcelulose em diclorometano – metanol numa proporção de 1:1.

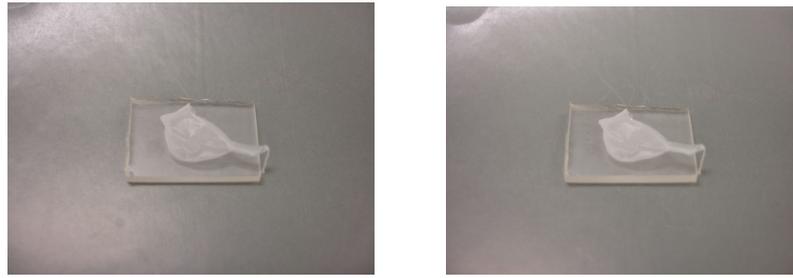


Figura 22 – Elastollan 1180A50 revestido com acetato butirato de celulose em diclorometano.

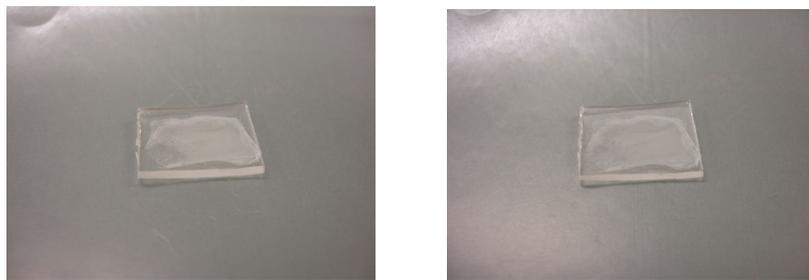


Figura 23 – Elastollan 685A revestido com acetato butirato de celulose em diclorometano.



Figura 24 – Elastollan 1180A50 modificado com Elastollan 1180A50 em DMF.



Figura 25 – Elastollan 685A modificado com Elastollan 1180A50 em DMF.



Figura 26 – Elastollan 1180A50 revestido com poliestireno em tetrahydrofurano (THF).

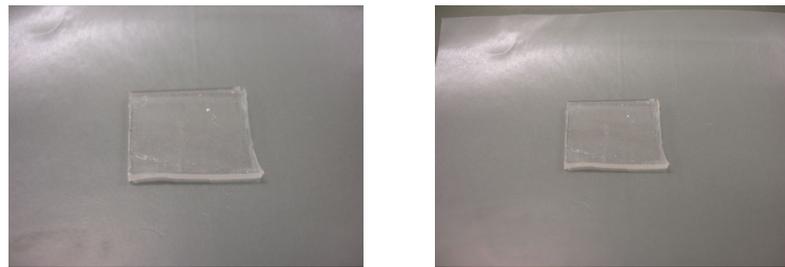


Figura 27 – Elastollan 685A revestido com poliestireno em THF.

Os melhores resultados foram o poliestireno em THF e o Elastollan 1180A50 em DMF. De seguida, realizaram-se alguns testes de solubilidade para encontrar mais algumas soluções para revestir as poliuretanas.

A solução de PHBV em clorofórmio, quando se misturaram os reagentes, ficou espessa, por esse facto aumentou-se a temperatura para 45°C. Como no final das 24 h o PHBV não estava completamente dissolvido prolongou-se o tempo. A solução deveria ter sido filtrada, devido à sua cor amarela, todavia não foi possível realizar este procedimento, porque alguém, externo a este trabalho, retirou a tampa ao recipiente e o clorofórmio evaporou.

Na solução de acetato celulose em clorofórmio verificou-se inicialmente que o acetato celulose não dissolveu com apenas 20 ml, tendo-se formado um aglomerado no centro, por esse motivo foram adicionados mais 20 ml de clorofórmio. Após esta adição agitou-se a solução, tendo-se constatado que houve dissolução e que se formou um líquido branco.

Na solução de etilcelulose em clorofórmio, o primeiro composto posicionou-se nas bordas do frasco, por isso teve de se agitar. Após este procedimento o líquido dissolveu-se, tendo-se tornado transparente mas um pouco viscoso.

Ao misturar acetato butirato de celulose com clorofórmio, inicialmente o primeiro não se dissolveu. Para atingir esse objectivo agitou-se a solução, contudo, no final verificou-se que esta era espessa.

A solução de polimetacrilato de metilo em clorofórmio dissolveu, contudo ficou algum polimetacrilato de metilo retido nas paredes pelo que se agitou durante algum tempo.

Formou-se um líquido transparente, mas espesso, ao misturar poliestireno com clorofórmio.

Na mistura de Elastollan 1180A50 em clorofórmio, o Elastollan foi colocado inteiro, o que fez com que não se dissolvesse, apenas se tendo degradado. Para atingir a sua total dissolução devia ter-se cortado o Elastollan. Para tentar solucionar o problema, adicionou-se mais solvente e aumentou-se o tempo de agitação.

Na solução de PEG 300 em DMF os reagentes misturaram-se logo após a adição e formaram um líquido transparente, por este motivo esta solução pode ser usada no *Spin Coating*.

Verificou-se que ao juntar PEG 300 em clorofórmio os reagentes se misturaram imediatamente após a adição e formaram um líquido transparente.

Na solução de PEG 2000 em DMF houve alguma dificuldade na dissolução dos reagentes, contudo acabou por se formar um líquido transparente.

Constatou-se que ao misturar PEG 2000 em clorofórmio, o primeiro se dissolveu logo após a adição do clorofórmio, tendo-se formado um líquido transparente.

Na solução de PEG 20 000 em DMF houve alguma dificuldade na dissolução do PEG 20 000, todavia conseguiu-se a dissolução, tendo a mistura dos compostos formado uma solução branca.

Ao misturar-se PEG 20 000 em clorofórmio o primeiro reagente dissolveu-se logo após a adição do segundo e formou-se um líquido transparente.

As soluções de Elastollan 1180A50 e poliestireno em DMF a 5% e 20% dissolveram e continuaram transparentes. As soluções a 30 e 50% de Elastollan não dissolveram, uma vez que a solução se encontrava saturada. A solução de Elastollan em DMF após a diluição para 25% dissolveu.

A solução a 50% de poliestireno não dissolveu, já estava saturada. A solução a 30% de poliestireno em DMF dissolveu após um dia de agitação.

Com se pode verificar a partir da Figura 28, a solução de poliestireno em DMF forma realmente uma placa branca e não transparente como se esperava inicialmente.



Figura 28 – Revestimento de uma placa de vidro com poliestireno dissolvido em DMF.

Na solução de poliestireno em acetona o poliestireno não se dissolveu, nem mesmo aumentando a temperatura. O poliestireno dissolvido numa mistura acetona/ciclohexano (1:1) dissolveu mas a solução ficou branca.

A placa revestida com a solução a 10% de Elastollan 1180A50 em DMF ficou um pouco opaca. Então decidiu diminuir-se a concentração da solução para 5%. Depois de revestida, a placa ficou menos opaca do que na situação anterior.

A placa revestida com poliestireno em DMF a 1% ficou um pouco menos opaca, ou seja, quanto menor for a concentração da solução de poliestireno menos opaca fica a placa.

A solução de PLLA em DMF ficou branca, formando uma pasta e não um líquido. Os revestimentos das placas com as soluções de PLLA em DMF a 20% e de THF a 30% ficaram opacos.

As soluções de poliestireno em THF e de poli (cloreto de vinilo) (PVC) em THF ficaram transparentes.

Verificou-se que algumas das placas de Elastollan 1180A50, revestidas com Elastollan 1180A50 em DMF a 5% e poliestireno em DMF a 1%, e as placas de Elastollan 685A, revestidas com Elastollan 1180A50 em DMF a 5% e a 10% e com poliestireno em DMF a 1%, quando colocadas em água tomavam um tom branco mas quando retiradas do banho tornavam-se novamente transparentes e nenhuma película se tinha descolado. Com este

procedimento pretendia-se também extrair algum resto de solução que não tivesse ficado bem aderente.

Depois da preparação de todas estas soluções é necessário fazer um ponto da situação e ver qual das soluções deu melhores resultados para prosseguir com o trabalho. Com os melhores resultados poder-se-á revestir o biosensor e testar a adesão de células.

Após a realização de tantas modificações verificou-se que as melhores soluções para revestimentos são o Elastollan 1180A50 dissolvido em DMF, o PEG 300 também em DMF e o poliestireno em THF. Prepararam-se então essas soluções para fazer revestimentos que serão testados, posteriormente, quanto à adesão celular. As soluções a preparar são Elastollan 1180A50 em DMF a 5%, PEG 300 em DMF a 5% e poliestireno em THF a 1%.

Seguidamente, e com o objectivo de prever qual a superfície que apresentaria melhor capacidade de adesão celular, foram determinadas as tensões superficiais dos líquidos, bem como os ângulos de contacto com a água e as energias de superfície das placas de Elastollan 1180A50 revestidas com os respectivos líquidos.

4.1.2. Tensões Superficiais das soluções

Os valores das tensões superficiais das soluções estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Tensões Superficiais das soluções.

Soluções	Tensões Superficiais (mN/m)	Componente Dispersiva	Componente Polar
1180A50 + DMF	18,06±0,04	17,03±0,90	1,03±0,12
PEG 300 + DMF	21,96±0,05	20,71±0,13	1,25±0,13
Poliestireno + THF	16,37±0,12	15,45±0,10	0,92±0,16

Analisando a Tabela 7 verifica-se que o poliestireno dissolvido em THF é o líquido que possui uma menor tensão superficial e o PEG 300 é o que possui uma maior tensão superficial, tendo o 1180A50 dissolvido em DMF um valor intermédio.

Todas as soluções têm uma componente dispersiva superior à polar.

4.1.3. Ângulos de Contacto e Energia de Superfície das modificações

Os ângulos de contacto e as energias de superfície das modificações realizadas são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 – Ângulos de Contacto e Energia de Superfície do Elastollan 1180A50 em DMF.

Elastollan 1180A50 + DMF	Ângulos de Contacto (°)	Energia de Superfície (mN/m)
Água	73,1±1,9	
Etilenoglicol	62,2±2,7	31,39±3,67
Formamida	66,5±2,8	
Propilenoglicol	54,9±2,8	

Tabela 7 – Ângulos de Contacto e Energia de Superfície do PEG 300 em DMF.

PEG 300 + DMF	Ângulos de Contacto (°)	Energia de Superfície (mN/m)
Água	83,5±1,9	
Etilenoglicol	68,5±2,0	21,75±2,86
Formamida	80,0±1,4	
Propilenoglicol	59,4±2,5	

Tabela 8 – Ângulos de Contacto e Energia de Superfície do Poliestireno em THF.

Poliestireno + THF	Ângulos de Contacto (°)	Energia de Superfície (mN/m)
Água	89,9±1,8	
Etilenoglicol	71,7±3,1	21,39±2,58
Formamida	70,7±1,8	
Propilenoglicol	66,0±1,8	

Analisando as três tabelas apresentadas anteriormente conclui-se que as energias de superfície do Elastollan 1180A50 revestido com PEG 300 em DMF e do Elastollan 1180A50 revestido com poliestireno em THF são muito próximas. O Elastollan modificado com a própria poliuretana dissolvida em DMF apresenta uma energia de superfície superior.

Comparando com a poliuretana original, isto é, o Elastollan 1180A50, que possui um ângulo de contacto com a água de $99,6 \pm 1,2^\circ$ e uma energia de superfície de $20,53 \pm 4,00$ mN/m verifica-se que, com todos os líquidos, os ângulos de contacto com a água diminuem e as energias de superfície aumentam.

4.2. Activação da superfície do material por enxerto

A enxertia de placas com grupos reactivos pode ser realizada através de vários processos. Após o término do revestimento de várias placas com algumas soluções, nesta parte do trabalho explanar-se-ão os resultados obtidos nas enxertias realizadas nas placas.

4.2.1. Modificação da superfície com grupos hidroxilo

A primeira enxertia na superfície do material foi de grupos hidroxilo.

De forma a verificar se a reacção foi realizada com sucesso quantificou-se o número de grupos –OH presentes na placa. Para tal recorreu-se a um método analítico, a titulação, e obtiveram-se os resultados descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Quantidade de grupos –OH existentes em ambas as poliuretanas modificadas com H_2O_2 durante 4h.

Modificações	n -OH /g
Elastollan 1180A50 + H_2O_2 (4h)	2.98×10^{-3}
Elastollan 685A + H_2O_2 (4h)	1.73×10^{-3}

Analisando a tabela anterior conclui-se que a reacção teve sucesso e que o Elastollan 1180A50 possui mais grupos –OH do que o 685A.

4.2.2. Modificação da superfície com grupos carboxilo

Após a modificação da superfície com grupos –OH enxertaram-se nas placas grupos carboxilo, apresentando-se em seguida os resultados obtidos.

Após esta reacção é, mais uma vez, necessário quantificar os grupos carboxilo presentes nas placas. Recorreu-se, novamente, à titulação. Obtiveram-se os resultados presentes na Tabela 10.

Tabela 10 – Quantidade de grupos –COOH existentes em ambas as poliuretanas modificadas com AA e MCA.

Modificações	n -COOH /g
Elastollan 1180A50 + AA	4.26×10^{-5}
Elastollan 1180A50 + MCA	2.24×10^{-6}
Elastollan 685A + AA	2.70×10^{-5}
Elastollan 685A + MCA	4.00×10^{-6}

Analisando a Tabela 10 e comparando com a 9 deduz-se que existem sempre mais grupos –OH do que –COOH em todas as experiências realizadas. O Elastollan 1180A50 apresenta mais grupos –COOH do que o 685A, tal como acontece com os grupos –OH. Quando se utiliza o AA surgem mais grupos –COOH do que com o MCA.

4.2.3. Análise da Capacidade de Absorção de Humidade (*Swelling*)

Como já foi referido anteriormente, depois de realizar modificações sobre a superfície é necessário efectuar algumas análises, para verificar se as características do material foram alteradas. A primeira análise incidiu sobre a capacidade de absorção de humidade.

No Gráfico 1 encontram-se os resultados obtidos para a capacidade de absorção de humidade do Elastollan 685A sem qualquer modificação e modificado com peróxido de hidrogénio, ácido acrílico e ácido monocloroacético.

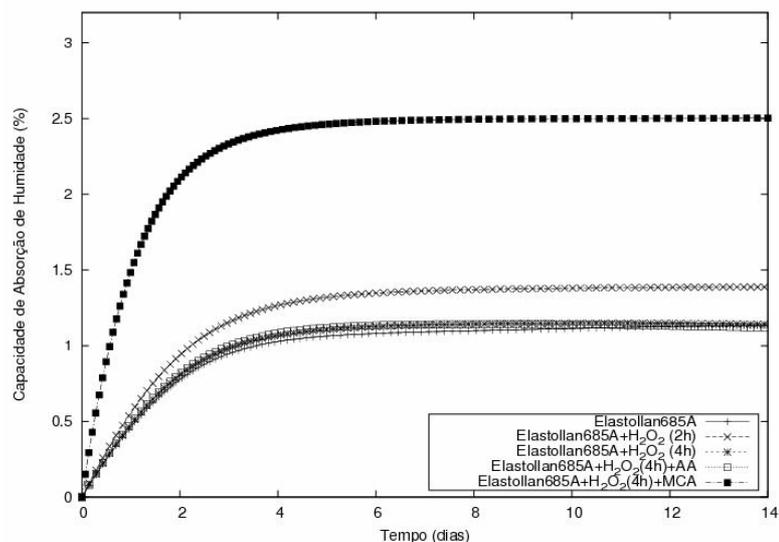


Gráfico 1 – Análise da Capacidade de Absorção de humidade do Elastollan 685A sem qualquer modificação e com grupos –OH e –COOH.

A partir da análise do gráfico anterior conclui-se que o Elastollan 685A sem qualquer modificação é o que absorve menos humidade, isto é, toda a modificação que se lhe aplique faz com que o material absorva mais humidade. No entanto, as modificações com peróxido de hidrogénio (H_2O_2) durante quatro horas e com ácido acrílico (AA) quase não alteram esta propriedade. A modificação com MCA é o revestimento que mais altera esta propriedade, aumentando-a. A modificação com H_2O_2 , durante duas horas, provoca uma ligeira alteração desta propriedade mas nada de muito significativo.

No Gráfico 2 estão descritos os resultados obtidos da capacidade de absorção de humidade do Elastollan 1180A50 sem qualquer modificação e modificado com peróxido de hidrogénio, ácido acrílico e ácido monocloroacético.

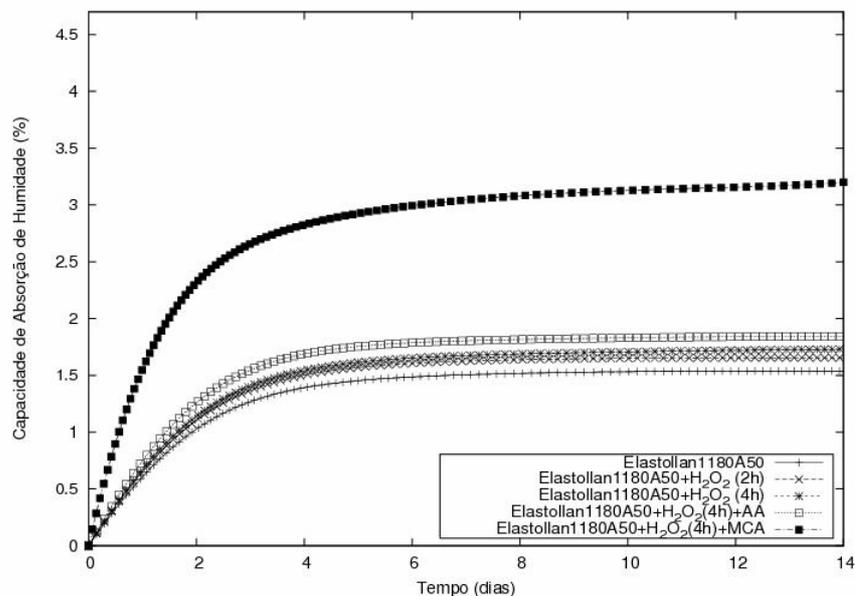


Gráfico 2 – Análise da Capacidade de Absorção de humidade do Elastollan 1180A50 sem qualquer modificação e com grupos $-OH$ e $-COOH$

Visualizando o gráfico anterior verifica-se que o Elastollan 1180A50 sem nenhuma modificação é o que absorve menos humidade mas absorve mais do que o Elastollan 685A.

As modificações que alteram menos esta característica são o H_2O_2 durante 2 ou 4 h e em seguida com AA, tal como aconteceu com o Elastollan 685A. A modificação que mais altera esta propriedade continua a ser a do MCA, destacando-se das restantes.

Apesar de não serem significativos, o Elastollan 1180A50 apresenta, relativamente ao 685A, valores de capacidade de absorção de humidade superiores, tanto depois como antes de modificado.

4.2.4. Análise da Degradação

A segunda análise incidiu sobre a degradação do material, com e sem modificações.

Na Tabela 11 são explanados os resultados da análise da degradação do Elastollan 685A modificado com H₂O₂ durante 2 e 4 h e com AA.

Tabela 11 – Análise da degradação do Elastollan 685A modificado com H₂O₂ durante 2 e 4h e com AA.

Modificações	Perda de massa (%)
Elastollan 685A	0,1953
Elastollan 685A +H ₂ O ₂ (2 h)	0,2338
Elastollan 685A +H ₂ O ₂ (4 h)	0,1582
Elastollan 685A + H ₂ O ₂ (4 h) + AA	0,1513

Na degradação do Elastollan 685A o menor valor corresponde à modificação com H₂O₂ durante 4 h e depois revestido com AA e o maior à modificação com H₂O₂ durante 2 h. Estes valores reflectem o que aconteceu também na capacidade de absorção de humidade, dentro das amostras que aqui são referidas.

Como os valores de perda de massa não são significativos, decidiu-se verificar os efeitos da degradação na topologia das placas. Recorreu-se então à análise de SEM. Da Figura 29 à 36 são mostradas as imagens obtidas.

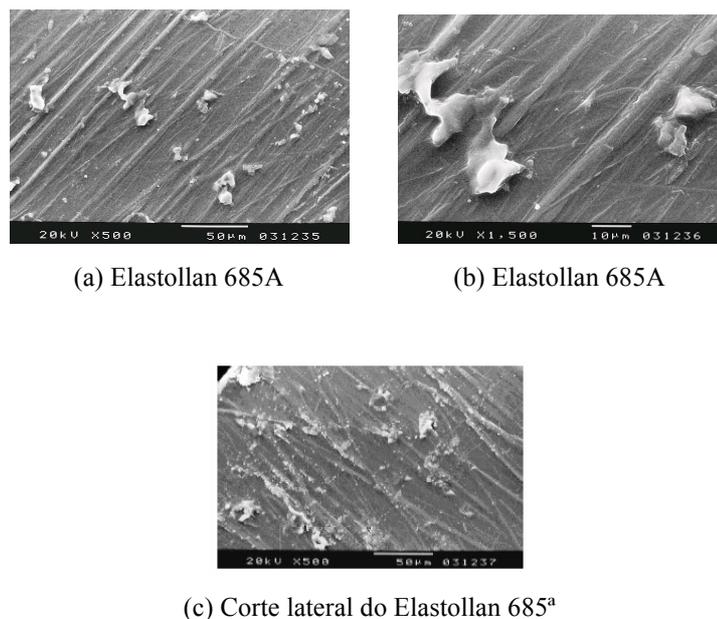


Figura 29 – Imagens SEM do Elastollan 685A.

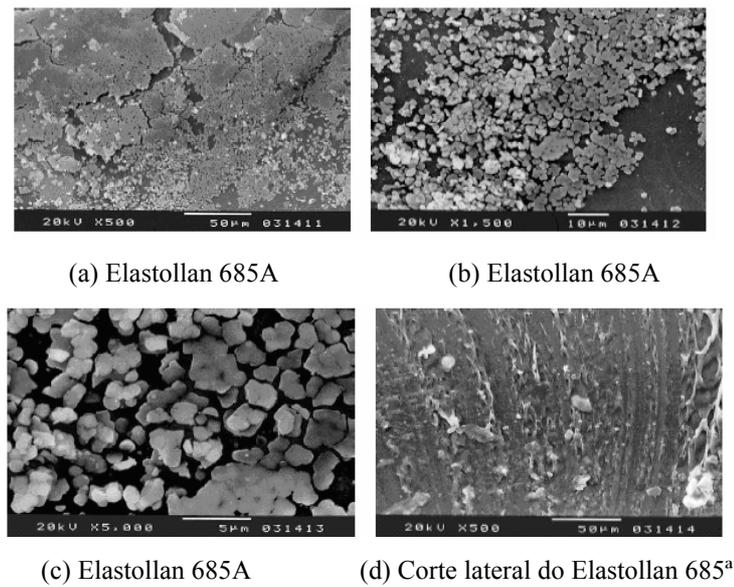


Figura 30 – Imagens SEM do Elastollan 685A depois de 14 dias em DMEM.

Analisando as Figuras 29 e 30 concluiu-se que, apesar de quantitativamente a degradação não ser significativa, o aspecto da placa se alterou, talvez porque ficou meio retido sobre a placa.

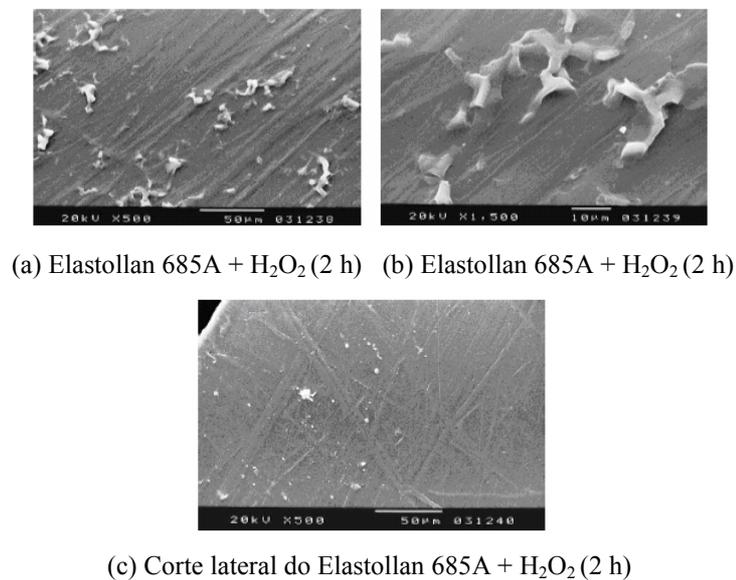


Figura 31 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com H₂O₂ durante 2 h.

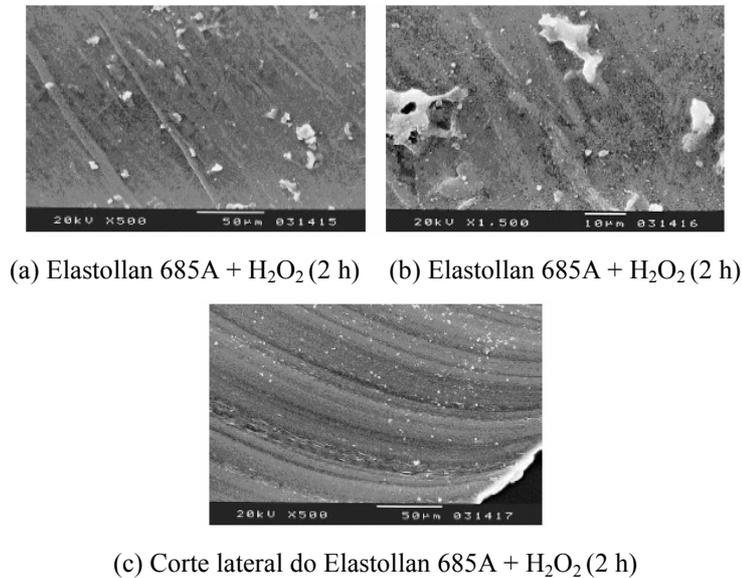


Figura 32 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com H₂O₂ durante 2 h depois de 14 dias em DMEM.

A modificação com H₂O₂ durante 2h não altera o aspecto inicial da placa e, após a degradação, apenas parece um pouco desgastada, como se pode verificar nas Figuras 31 e 32.

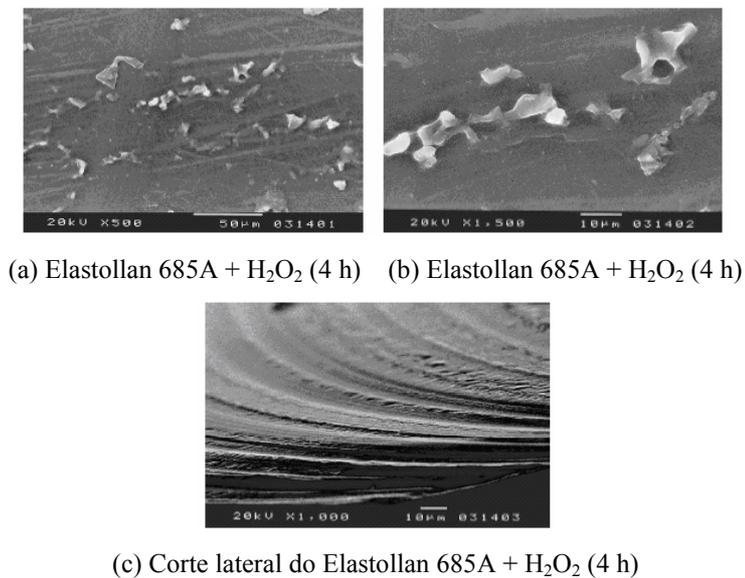


Figura 33 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com H₂O₂ durante 4 h.

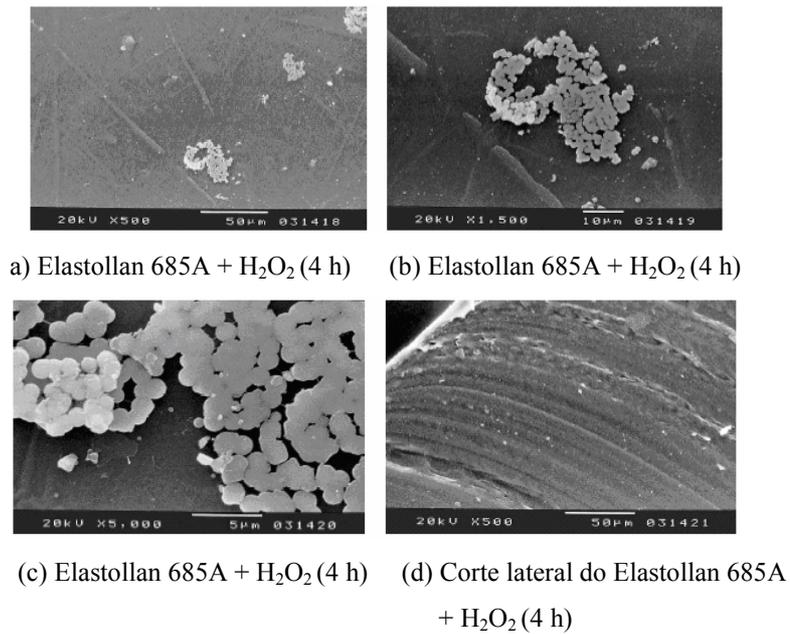


Figura 34 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com H₂O₂ durante 4 h depois de 14 dias em DMEM.

A modificação com H₂O₂ durante 4 h, assim como a modificação durante 2 h, quase não altera a morfologia da placa. No entanto, após a degradação a placa muda um pouco de aspecto. Desaparecem as películas brancas originais da placa e surgem aglomerados de ‘bolinhas’ que parecem resíduos de meio (Figuras 33 e 34).

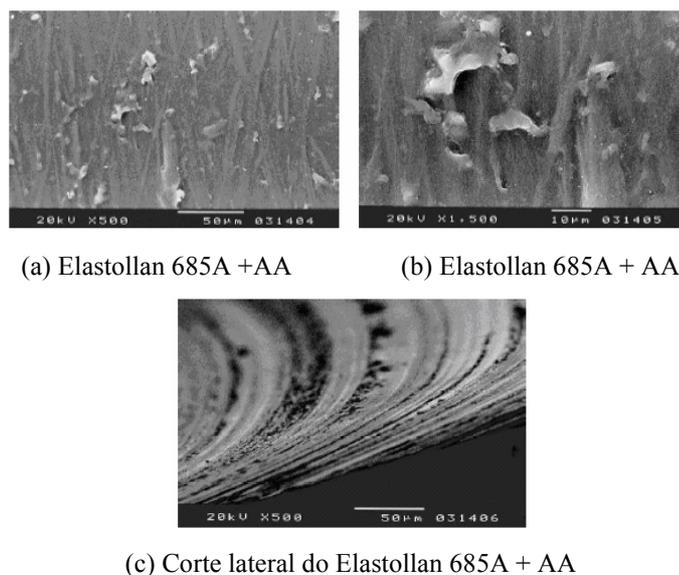


Figura 35 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com AA.

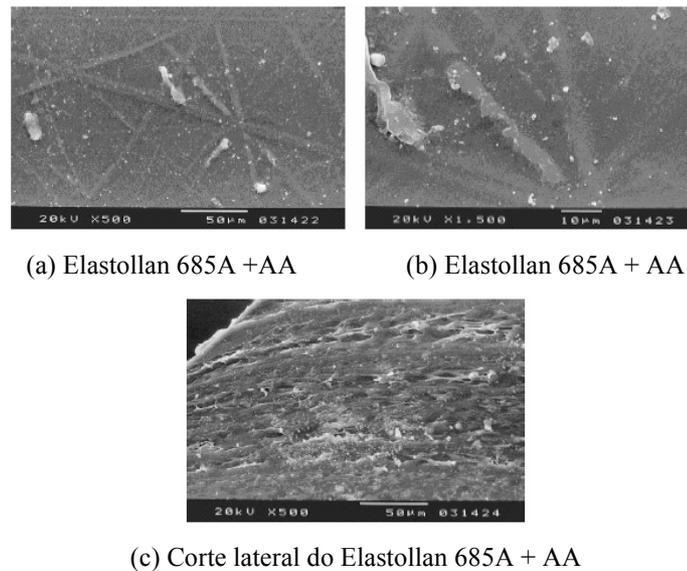


Figura 36 – Imagens SEM do Elastollan 685A modificado com AA depois de 14 dias em DMEM.

A modificação com ácido acrílico é a que altera mais a morfologia da superfície e, quando se degrada esta modificação, as películas brancas da superfície desaparecem e no corte lateral visualizam-se pequenos orifícios.

Na Tabela 12 são explanados os resultados da análise da degradação do Elastollan 1180A50 modificado com H_2O_2 durante 2 e 4 h e com AA.

Tabela 12 – Análise da degradação do Elastollan 1180A50 modificado com H_2O_2 durante 2 e 4 h e com AA.

Modificações	Perda de massa (%)
Elastollan 1180A50	0,1652
Elastollan 1180A50 + H_2O_2 (2 h)	0,0568
Elastollan 1180A50 + H_2O_2 (4 h)	0,0190
Elastollan 1180A50 + H_2O_2 (4 h) + AA	0,0

Contrariamente ao que aconteceu no *swelling*, na degradação o Elastollan apresenta valores muito inferiores ao Elastollan 685A. O Elastollan 1180A50 modificado com H_2O_2 durante 4 h e em seguida com AA não sofreu qualquer degradação e o Elastollan modificado apenas com H_2O_2 durante 4 h sofreu pouca degradação. A placa sem qualquer modificação foi a que sofreu mais degradação, talvez porque as modificações realizadas protejam a placa.

Novamente para verificar os efeitos da degradação na topologia das placas recorreu-se à análise de SEM. As imagens obtidas são mostradas das Figuras 37 à 44.

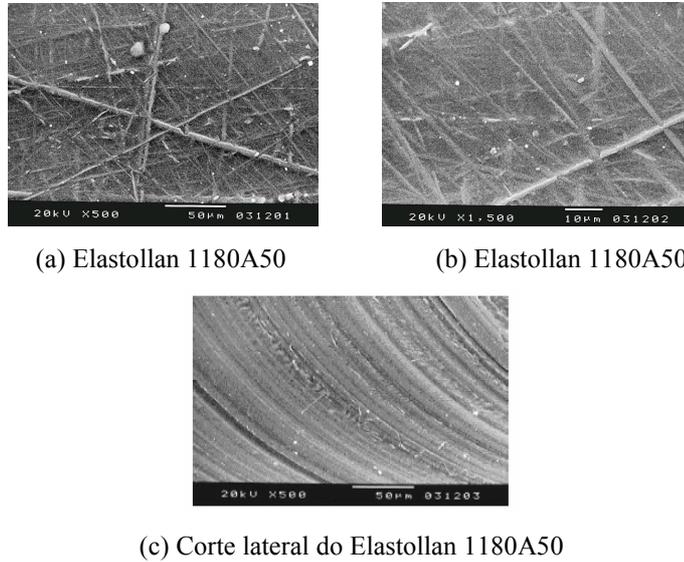


Figura 37 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50.

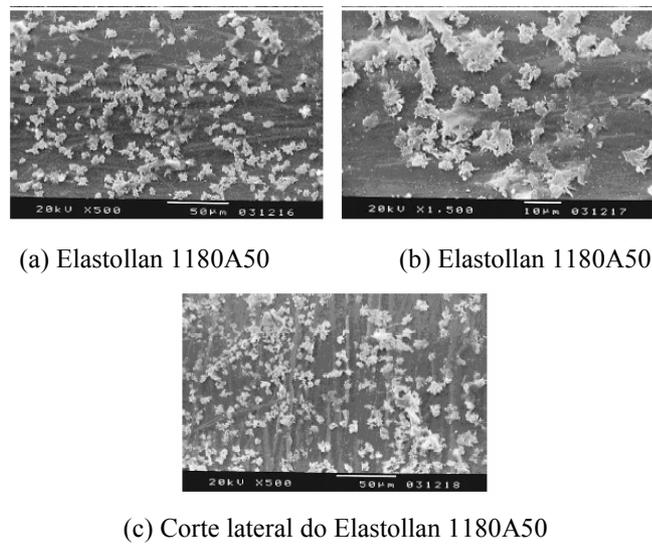


Figura 38 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 depois de 14 dias em DMEM.

Após a degradação do Elastollan 1180A50 sem qualquer modificação, pelas imagens de SEM obtidas, notam-se algumas diferenças que se supõe serem resíduos de meio que ficaram sobre a placa.

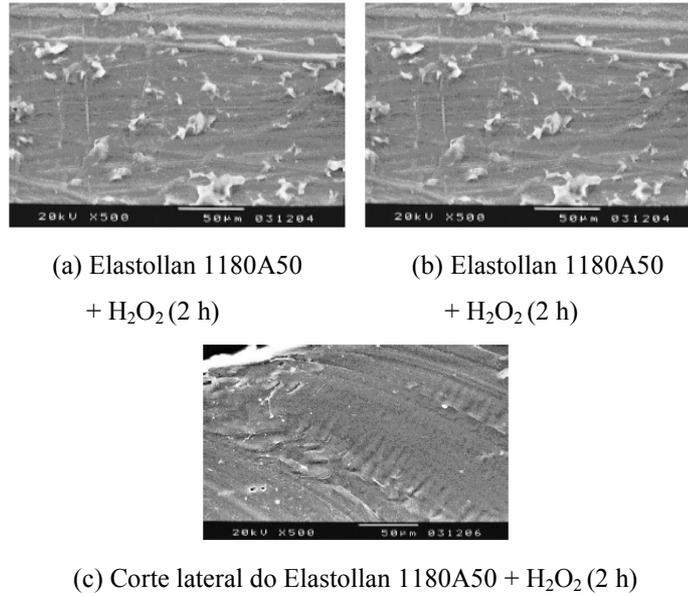


Figura 39 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com H₂O₂ durante duas horas.

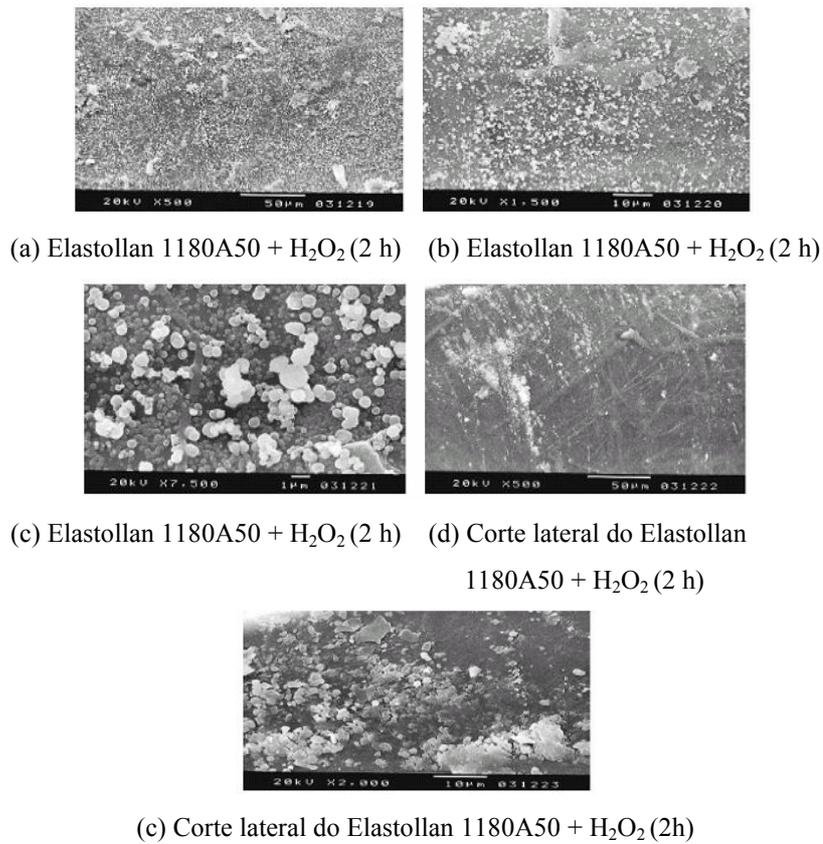


Figura 40 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com H₂O₂ durante 2 horas depois de 14 dias em DMEM.

Ao modificar o Elastollan 1180A50 com H_2O_2 durante 2 h a placa fica com umas películas brancas sobre a superfície, que se supõem ser meio acumulado após a degradação.

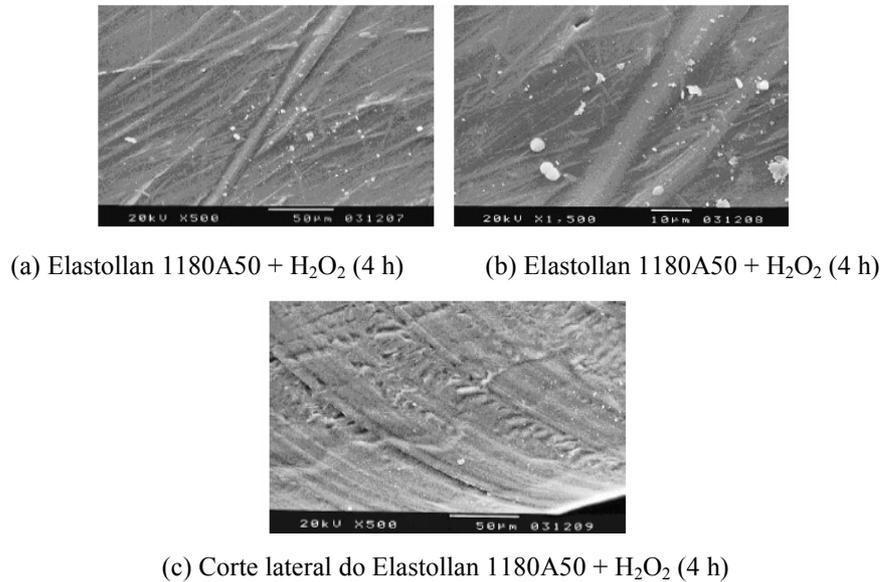


Figura 41 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com H_2O_2 durante 4h.

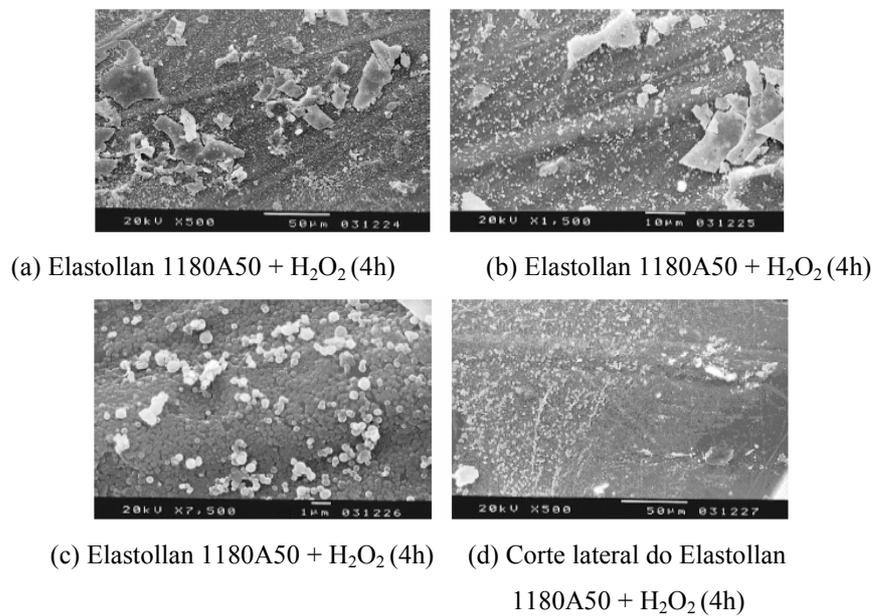


Figura 42 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com H_2O_2 durante 4 horas depois de 14 dias em DMEM.

A modificação com H₂O₂ durante 4 h quase não altera a topologia da placa, no entanto, após a degradação, acumulam-se imensos resíduos sobre a placa.

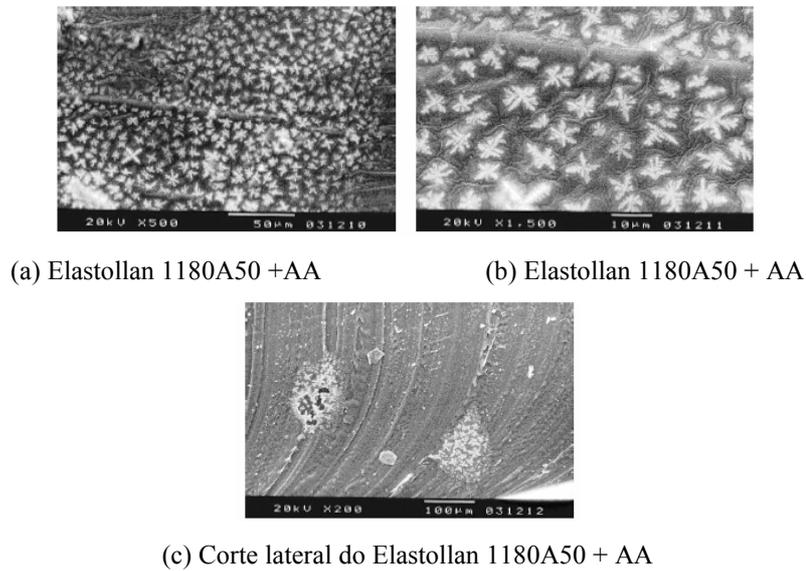


Figura 43 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com AA.

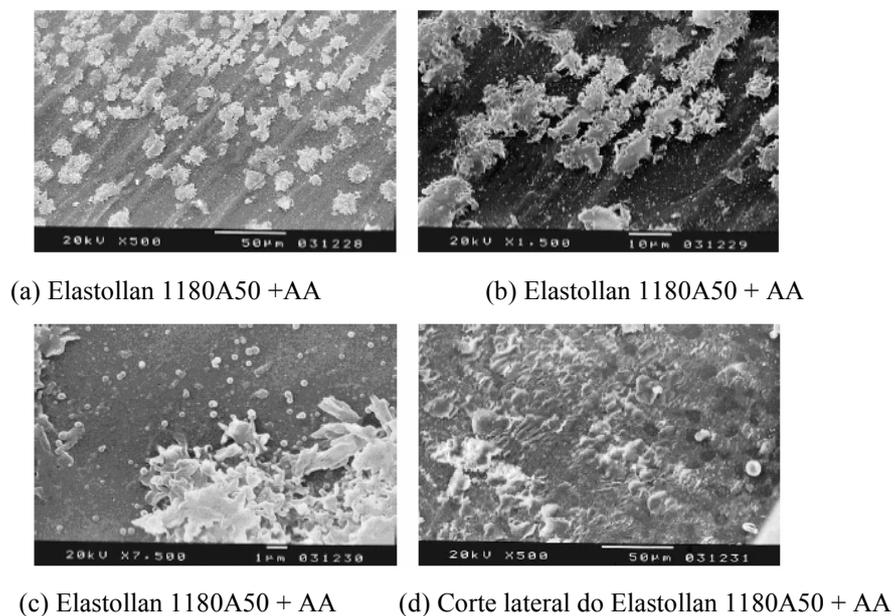


Figura 44 – Imagens SEM do Elastollan 1180A50 modificado com AA depois de 14 dias em DMEM.

Tal como aconteceu com o Elastollan 685A, a modificação com o AA é a que mais altera a topologia da placa mas com esta poliuretana altera ainda mais, formando-se

rugosidades em forma de estrela na placa. Depois da degradação as rugosidades não são tão visíveis, provavelmente porque também fica meio retido sobre a superfície.

4.2.5. Análise dos ângulos de contacto

Uma vez que se pretendem realizar testes de adesão, a análise dos ângulos de contacto torna-se importante para prever quais as modificações que produzirão melhores efeitos.

Na Tabela 13 são apresentados os valores dos ângulos de contacto e das energias de superfície das placas antes e depois de modificadas com grupos –OH e –COOH.

Tabela 13 – Ângulos de contacto e Energias de Superfície das modificações com grupos –OH e –COOH.

Modificações	Ângulo de contacto com a água (°)	Energia de Superfície (mN/m)
Elastollan 685A	95,4±1,8	19,34±2,30
Elastollan 1180A50	99,6±1,2	20,53±4,00
685A com –OH	86,7±1,1	25,99±2,22
1180A50 com –OH	94,1±1,0	27,14±0,96
685A com AA	96,9±0,6	16,99±1,32
1180A50 com AA	88,2±1,1	21,82±1,44
685A com MCA	84,7±0,8	25,42±1,36
1180A50 com MCA	91,8±0,3	25,34±0,60

A única modificação que faz aumentar o ângulo de contacto com a água, para o Elastollan 685A, é com o AA. As restantes modificações realizadas em ambas as poliuretanas fazem diminuir o ângulo de contacto com a água. Quanto à energia de superfície acontece o inverso, ou seja, a única modificação que a faz descer é o Elastollan 685A com AA.

Era esperado que todas as modificações diminuíssem o ângulo de contacto com a água, uma vez que há introdução de grupos que aumentam a hidrofiliidade (grupos –OH e –COOH). O aumento do ângulo de contacto para a modificação com AA pode ser explicada pelas imagens de SEM. Nesta modificação observa-se um aumento significativo da rugosidade, factor que influencia o ângulo de contacto.

4.2.6. Optimização das reacções com grupos carboxilo

Para alcançar os melhores resultados, dispendendo o mínimo de recursos, é necessário otimizar as reacções, por isso efectuou-se este procedimento com os ácidos acrílico e monocloroacético.

Ao colocar as placas modificadas com AA em água, mediu-se o pH da água do Elastollan 1180A50, que apresentava um valor de 3,67, e a água do Elastollan 685A, que media 4,17. Com estes resultados pode concluir-se que as células morreriam com o AA, uma vez que o pH das placas fica demasiado ácido (muito baixo). O pH do ser humano ronda os 7.

Ao deixar as placas durante vários dias em água, com o objectivo de verificar se o pH subia, obtiveram-se os resultados expressos na Tabela 14.

Tabela 14 – Medições do pH induzido no meio pelo Elastollan 685A e 1180A50 modificados com o AA.

Tempo	685A+AA	1180A50+AA
1ºdia (15 h)	4,21	3,71
3ºdia (11h23)	4,38	3,61
6ºdia (17h10)	4,30	3,57
7ºdia (13h40)	4,09	3,54
8ºdia (11h15)	4,08	3,54
Mudou-se a água (20 ml em cada frasco)		
9ºdia (16 h)	4,60	4,17
13ºdia (16 h)	4,53	3,94
14ºdia (17 h)	4,46	3,94
15ºdia (13h30)	4,45	3,89
Mudou-se a água (20 ml em cada frasco)		
20ºdia (12 h)	4,88	4,60
24ºdia (15 h)	4,80	4,51
Mudou-se a água (20 ml em cada frasco)		
30ºdia (14h45)	7,64	8,25
34ºdia (15 h)	4,68	4,91
37ºdia (10h30)	5,76	5,42
41ºdia (12 h)	4,79	5,11

Tempo	685A+AA	1180A50+AA
Mudou-se a água (20 ml em cada frasco)		
51ºdia (13 h)	6,40	4,60
59ºdia (13h30)	4,55	4,50
62ºdia (14h30)	4,50	4,44
76ºdia (11 h)	4,31	4,21

Como se pode concluir através da análise da Tabela 14, o pH dos Elastollans quase não se alterou. O Elastollan 685A começou com um pH de 4,21 e o seu pH ao fim de 76 dias só tinha subido dez décimas (atingiu o valor 4,31). O Elastollan 1180A50 iniciou com um pH de 3,71 e terminou com um pH de 4,21, isto é, subiu cinquenta décimas durante 76 dias. Logo não se tratava de uma lavagem deficiente no final da reacção.

Caso o pH subisse muito em poucos dias, este procedimento poderia tornar-se viável, no entanto não foi isso que se verificou, por isso só fazendo algumas alterações na reacção com o AA é que se poderão obter bons resultados.

Esperava-se que o pH da água descesse, uma vez que, caso as placas não estivessem bem lavadas, o homopolímero que estivesse preso iria soltar-se, ficava na água e com as mudanças de água haveria gradualmente menos homopolímero, o que provocava um aumento gradual do pH da água, de mudança para mudança. Isto não aconteceu porque provavelmente a modificação conferiu um carácter ácido ao material.

Ao alterar o procedimento, a água da placa com AA com inibidor apresentava 2,84 de pH e a água da placa modificada com AA sem inibidor tinha um valor de 2,88. Com estes resultados pode constatar-se que o inibidor não influencia a acidez das placas.

As placas modificadas com ácido acrílico a uma menor concentração ficaram menos amarelas. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos na determinação dos grupos das placas modificadas.

Tabela 15 – Massas e quantidade de grupos –COOH existentes nas placas modificadas com AA com e sem inibidor.

Modificações	Massa (g)	Grupos –COOH/g
AA sem inibidor	1,1795	0,047
AA com inibidor	1,3545	0,026

Como se pode verificar através da análise da Tabela 15, a placa modificada sem inibidor apresenta mais grupos carboxílicos por grama.

Ao mergulhar as duas restantes placas modificadas em água obtiveram-se os valores de pH representados no Quadro 5.

Quadro 5 – Valores de pH induzidos no meio pelas placas modificadas com AA com e sem inibidor.

pH	1º dia	2º dia	3º dia	7º dia	11º dia	Mudou-se a água (20 ml em cada frasco)	17º dia	18º dia	21º dia	
AA sem inibidor	3,49	3,35	3,28	3,19	3,14			3,70	3,76	3,68
AA com inibidor	3,55	3,37	3,29	3,20	3,12			3,68	3,69	3,64
pH	Mudou-se a água (20 ml em cada frasco)	24º dia	28º dia	Mudou-se a água (20 ml em cada frasco)	38º dia	46º dia	49º dia	Mudou-se a água (20 ml em cada frasco)	65º dia	
AA sem inibidor		4,53	4,07		4,10	3,90	3,85		5,75	
AA com inibidor		4,57	4,14		4,20	3,94	3,84		5,93	

Passados 65 dias as placas não tinham alterado ainda o seu valor de pH para o que seria desejável, o que torna assim este procedimento inviável e nos diz ainda que de nada serve alterar a concentração do ácido acrílico ou retirar o inibidor.

No Quadro 6 mostram-se os resultados obtidos para todos os tempos e concentrações. Os cálculos para obter a quantidade de grupos por grama de placa encontram-se no Anexo D.

Quadro 6 – Condições e resultados do estudo para optimização da reacção com o MCA.

% de MCA	Tempo (min)	Grupos –COOH/g
2%	70	0,058
	90	0,041
4%	70	0,043
	90	0,061

% de MCA	Tempo (min)	Grupos -COOH/g
6%	70	0,054
	90	0,054
8%*	70	0,040
	90	0,062
10%	70	0,054
	90	0,045
30%	70	0,056
	90	0,046

*As placas a 8% ficaram um pouco amarelas.

Para medir os grupos carboxilo das placas modificadas com ácido cloroacético realizou-se uma titulação. Do procedimento efectuado surgem os resultados apresentados nos Quadros 6 e 7.

Quadro 7 – Quantificação dos grupos carboxilo existentes em algumas modificações.

Modificação	Massa (g)	Volume (ml)	n (-COOH)	n (-COOH)/g
AA sem inibidor	1,180	11,1	0,056	0,047
AA com inibidor	1,355	7,15	0,036	0,026
Placa sem nada	1,570	15,3	0,077	0,049
Placa com grupos -OH	1,423	15,3	0,077	0,054
HCl		16,1		

Testou-se ainda se a quantidade de ácido que se adiciona, para saber se alterava ou não a quantidade de grupos carboxilos por grama de placa. Os resultados podem ser visualizados no Quadro 8.

Quadro 8 – Volume de HCl adicionado a modificações com diferentes quantidades de MCA.

Modificação	Volume de HCl adicionado (ml)	Modificação	Volume de HCl adicionado (ml)
1180A50	15,1	685A (controlo)	15,60
1180A50 (2 ml)	14,25	685A (2 ml)	14,55

Modificação	Volume de HCl adicionado (ml)	Modificação	Volume de HCl adicionado (ml)
1180A50 (2 ml)	14,7	685A (2 ml)	14,60
1180A50 (2 ml)	15,0	685A (2 ml)	14,55
1180A50 (4 ml)	14,75	685A (4 ml)	15,0
1180A50 (6 ml)	14,8	685A (6 ml)	15,0

Analisando a tabela anterior conclui-se que, ao variar a quantidade de ácido o número de grupos carboxilos por grama de placa não vai variar muito, dado que os volumes adicionados são semelhantes e os pesos das placas são próximos.

4.2.7. Processamento das placas

As placas usadas ao longo deste trabalho foram processadas através de moldagem por injeção, na Alemanha, no entanto, estas também podiam ser produzidas no DEQ pela moldagem por compressão.

As placas obtidas, através da moldagem por compressão, são visíveis na Figura 45.

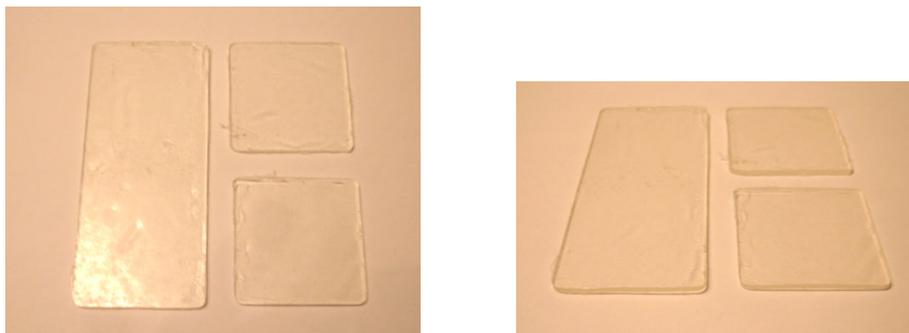


Figura 45 – Placas produzidas na prensa.

As placas são transparentes apenas algumas delas apresentam ‘bolhinhas’ de ar no seu interior.

4.2.8. Fotopolimerização do estireno e do ácido acrílico

Tentou-se também enxertar por UV nas placas outros compostos, como o estireno e o ácido acrílico, no entanto, os resultados não foram os desejados.

As placas ficaram amarelas com o ácido acrílico e brancas com o estireno. As placas cobertas com uma solução a 1% de estireno em água destilada ficaram novamente brancas.

4.2.9. Ligação de um aminoácido ou proteína às placas

Antes de serem feitos os testes com células foram realizadas ainda algumas modificações, envolvendo aminoácidos e proteínas.

4.2.9.1. Ligação da glicina

Ao enxertar a glicina na placa, quando se retiraram as placas da estufa, estas encontravam-se um pouco brancas, no entanto, continuou-se o procedimento. Após todo este processo, as placas ficaram ainda mais opacas (brancas) e dobraram. Provavelmente o solvente (DMSO) degrada as placas.

Testaram-se, em seguida, a acetona e o THF. Com a acetona as placas incharam e ficaram amarelas. Após as 18 h colocaram-se as placas em água para ver se estas melhoravam de aspecto, mas estas continuaram amarelas apenas desinchando um pouco.

Com o THF as placas dissolveram. O líquido obtido apresentava um aspecto amarelado.

4.2.9.2. Ligação da lisina e das Polilisinas D e L

Enxertaram-se ainda nas placas lisina por ligação covalente e polilisina, usando vários métodos, tais como UV, absorção e ligação covalente.

4.2.9.2.1 Modificação por UV

Após este processo as placas continuaram transparentes.

4.2.9.2.2. Modificação por absorção

Neste procedimento foram impregnadas placas sem qualquer modificação com grupos –OH.

Após realizar o procedimento anterior as placas ficaram com bom aspecto, isto é, mantinham-se transparentes.

4.2.9.2.3. Modificação por ligação covalente

No final de todo este procedimento, para activar os grupos carboxílicos e lhes ligar os grupos amínicos, as placas ficaram com um aspecto branco.

4.2.10. Ângulos de Contacto e Energias de Superfície das modificações

Na Tabela 16 podem ver-se os resultados dos ângulos de contacto com a água e as tensões superficiais do Elastollan 685A e das modificações realizadas sobre esta poliuretana. No entanto, foram realizados ângulos de contacto com outros líquidos (ver Anexo E).

Tabela 16 – Ângulos de Contacto e Tensões Superficiais do Elastollan 685A sem qualquer modificação e modificado com lisina, polilisina D e polilisina L.

Modificações	Ângulos de Contacto com a água (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Elastollan 685A	95,4±1,8	19,34±2,30
685A + PDL por UV	88,9±1,3	21,62±2,10
685A + PLL por UV	94,2±1,3	19,21±1,82
685A + PDL por Abs.	81,5±1,9	24,96±2,62
685A + PLL por Abs.	83,6±1,3	23,27±2,43
685A + -OH + PDL (Abs.)	75,7±1,1	30,21±2,11
685A + -OH + PLL (Abs.)	91,3±1,2	22,05±1,72
685A + PDL	81,7±1,7	25,35±2,70
685A + PLL	88,3±0,7	20,26±1,49
685A + Lisina	83,6±1,1	26,38±2,04

Analisando a tabela anterior conclui-se que todas as modificações do Elastollan 685A fazem o ângulo de contacto diminuir, tal como se pretende. As tensões aumentam ou diminuem, relativamente à placa sem modificação, consoante o ângulo é inferior ou não a 90°. Para o cálculo da energia de superfície entra-se com a função co-seno do ângulo de contacto.

Os ângulos de contacto com a água e as tensões superficiais do Elastollan 1180A50 e das modificações que se fizeram com a lisina, a polilisina D e a polilisina L são mostrados na Tabela 17. Realizaram-se, também, medições de ângulos de contacto com outros líquidos que podem ser visualizados no Anexo E.

Tabela 17 – Ângulos de Contacto e Tensões Superficiais do Elastollan 1180A50 sem qualquer modificação e modificado com lisina, polilisina D e polilisina L.

Modificações	Ângulos de Contacto com a água (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Elastollan 1180A50	99,6±1,2	20,53±4,00
1180A50 + PDL por UV	83,7±1,1	23,20±1,93
1180A50 + PLL por UV	93,3±1,4	21,44±1,92
1180A50 + PDL por Abs.	78,4±1,3	29,81 ±2,94
1180A50 + PLL por Abs.	67,3±1,8	35,20±3,32
1180A50 + -OH + PDL (Abs.)	75,1±1,6	29,61±2,73
1180A50 + -OH + PLL (Abs.)	74,5±1,1	32,48±2,28
1180A50 + PDL	84,6±1,4	23,48±2,32
1180A50 + PLL	77,4±1,9	27,90±3,00
1180A50 + Lisina	86,9±2,2	23,70±3,49

Tal como aconteceu com o Elastollan 685A, as modificações com lisina, polilisina D e polilisina L fazem o ângulo de contacto do Elastollan 1180A50 diminuir com a água. As tensões superficiais, dado que os ângulos de contacto diminuem, aumentam, uma vez que se relacionam com o co-seno de θ .

4.3. Testes de adesão celular

Durante a realização dos testes de adesão celular foram efectuados alguns registos fotográficos, utilizando a máquina digital Olympus Stylus 800, que são mostrados das Figuras 46 à 52. Não foi possível tirar fotografias a todas as experiências porque os fibroblastos humanos são muito transparentes e tornam-se, por vezes, difíceis de focar, mesmo com redução da intensidade da luz do microscópio. Na Figura 46 são exibidas algumas das fotos do controlo no primeiro tempo.

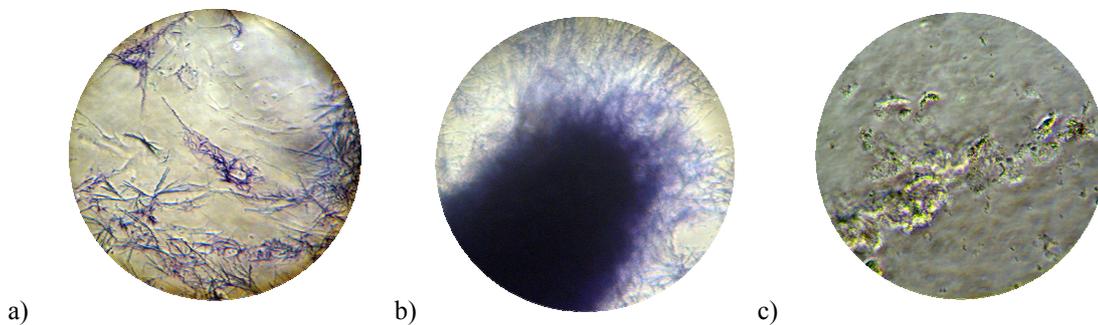


Figura 46 – Fotografia digital de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase – a) e b) imagens da experiência de controlo às 80 h visualizadas com MTT (ampliação 200 ×) e c) imagem da experiência de controlo às 80 h visualizada sem coloração (ampliação 200 ×).

Na Figura 47 são apresentadas as imagens de fibroblastos aderentes às duas poliuretanas usadas neste trabalho, o Elastollan 685A e o Elastollan 1180A50.

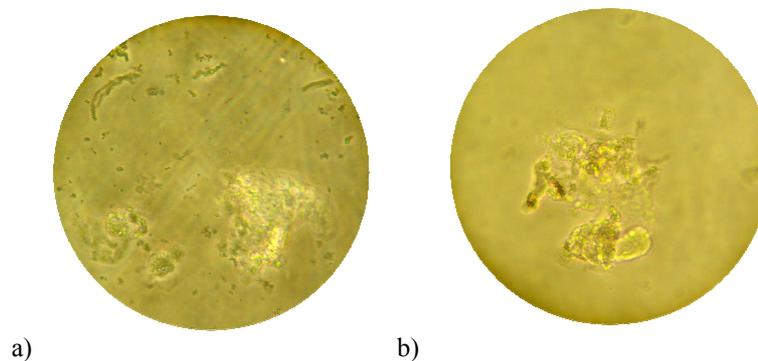


Figura 47 – Fotografia digital de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase – a) imagem do Elastollan 685A às 80 h visualizada sem coloração (ampliação 200 ×) e b) imagem do Elastollan 1180A50 às 80 h visualizada sem coloração (ampliação 200 ×).

Os líquidos usados nos testes são apresentados na Figura 48 e na Figura 49 surgem as imagens dos revestimentos efectuados com o Elastollan 1180A50 dissolvido em DMF e o poliestireno dissolvido em THF.

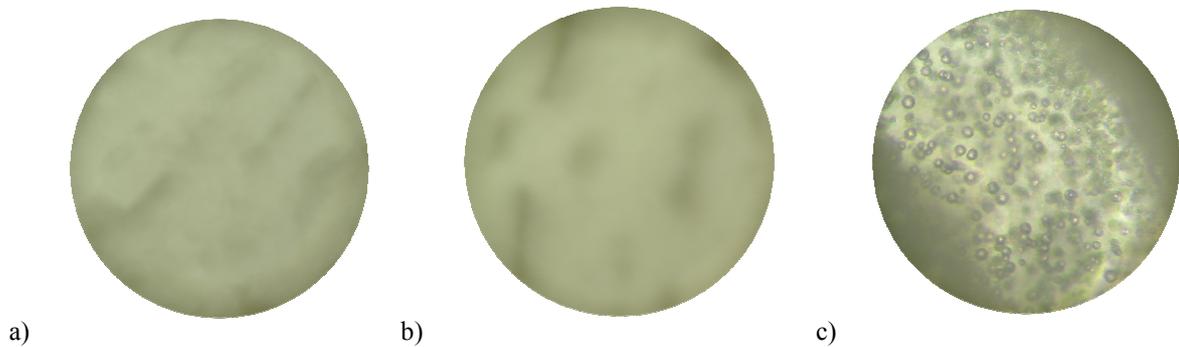


Figura 48 – Fotografias digitais de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase às 80 h visualizadas sem coloração (ampliação 200×) – a) Elastollan 1180A50 dissolvido em DMF, b) PEG 300 dissolvido em DMF e c) poliestireno dissolvido em THF.

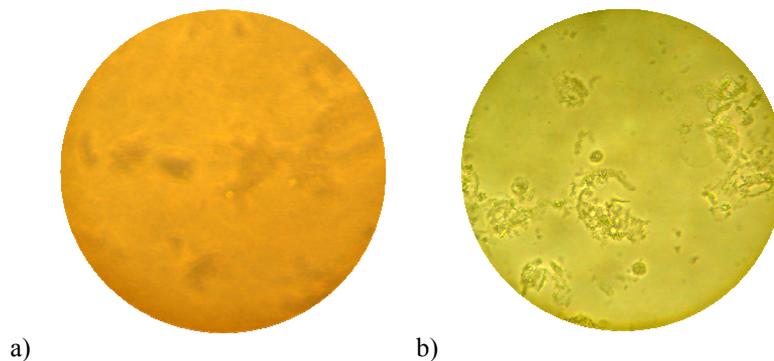


Figura 49 – Fotografias digitais de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase às 80 h visualizadas sem coloração (ampliação 200×) – a) Elastollan 1180A50 revestido com Elastollan 1180A50 dissolvido em DMF, b) Elastollan 1180A50 revestido com poliestireno dissolvido em THF.

Os líquidos, ao serem incubados na estufa a 37°C, tornaram-se opacos, como é possível visualizar através da Figura 50 a) e b). Após a realização do teste de proliferação e citotoxicidade para fibroblastos, estes adquiriram uma tonalidade azul, como é demonstrado na Figura 50 c).

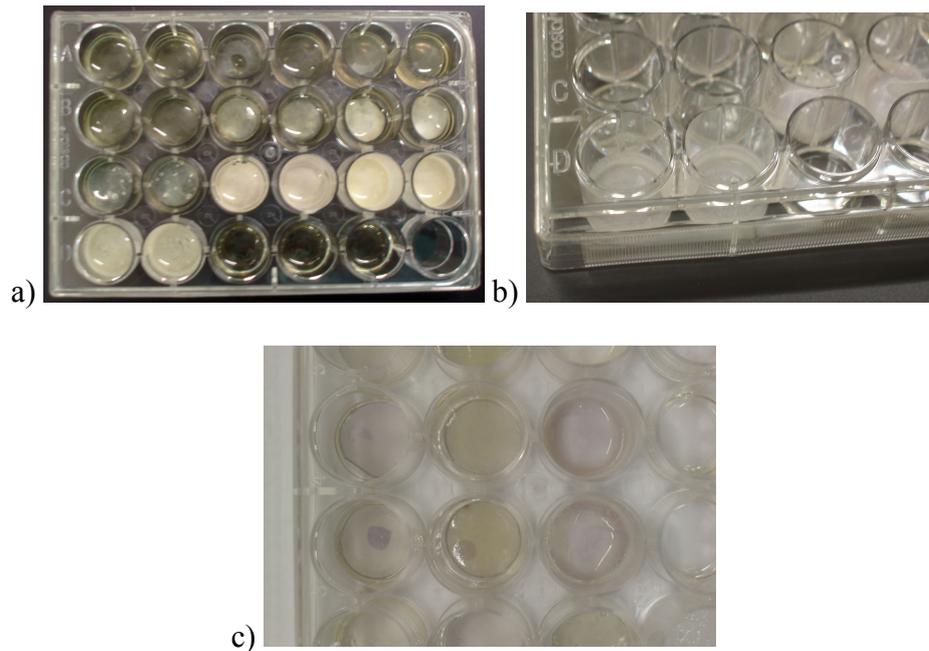


Figura 50 – Fotografias digitais de placas de incubação às 80 h visualizadas com MTT (a), b) e c)).

As imagens apresentadas na Figura 51 representam algumas das experiências realizadas até aos 7 dias. Por conseguinte a Figura 52 ilustra três dos testes realizados até aos 14 dias.

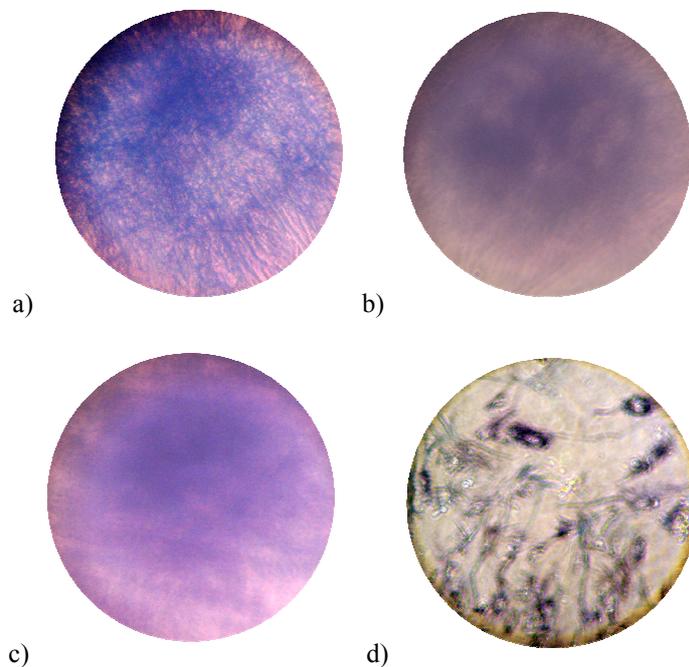


Figura 51 – Fotografias digitais de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase aos 7 dias visualizadas com MTT (ampliação 100×) – a) Elastollan 685A revestido com polilisina L por absorção, b) Elastollan 1180A50 com grupos –OH revestido com polisina L por absorção, c) Elastollan 1180A50 revestido com polisina L por ligação covalente e d) Controlo.

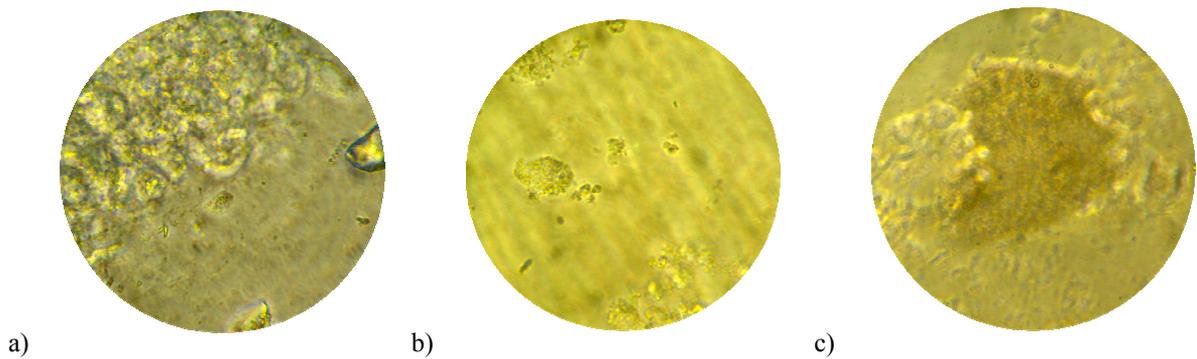


Figura 52 – Fotografias digitais de fibroblastos humanos observados ao microscópio óptico de contraste de fase aos 14 dias visualizadas sem coloração (ampliação 400×) – a) Controlo, b) Elastollan 1180A50 revestido com lisina por ligação covalente e c) Elastollan 1180A50 revestido com Elastollan 1180A50 dissolvido em DMF.

Os resultados que seguidamente se apresentam estão ordenados de acordo com a apresentação dos planos experimentais, já previamente descritos nos métodos.

Conforme se pode observar no Quadro 9, registam-se diferenças significativas no factor revestimento e na interacção tempo*revestimento.

Quadro 9 – Análise da Variância de 3 factores com medidas repetidas em 1 factor.

Effects	Repeated Measures Analysis of Variance (Copy of T Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	DF	MS	F	p
Revestimento	0.077926	10	0.007793	9.4699	0.000002
Error	0.022218	27	0.000823		
Tempo	0.000133	2	0.000066	0.0641	0.937963
Tempo*Revestimento	0.036972	20	0.001849	1.7890	0.046586
Error	0.055798	54	0.001033		

No Gráfico 3 existem diferenças significativas dos valores da absorvância em função do revestimento, sendo estes valores mais elevados nos revestimentos 7 e 6 (polilisina L e D por UV, respectivamente), não sendo significativas as diferenças entre eles ($p=0.105$). No entanto, ao contrário do revestimento 7, cujo valor é significativamente mais elevado em

relação a todos os outros, o revestimento 6 apenas é mais elevado relativamente aos revestimentos 9, 10 e 11 (polilisina L por absorção e polilisina D e L por adsorção em placas com grupos – OH).

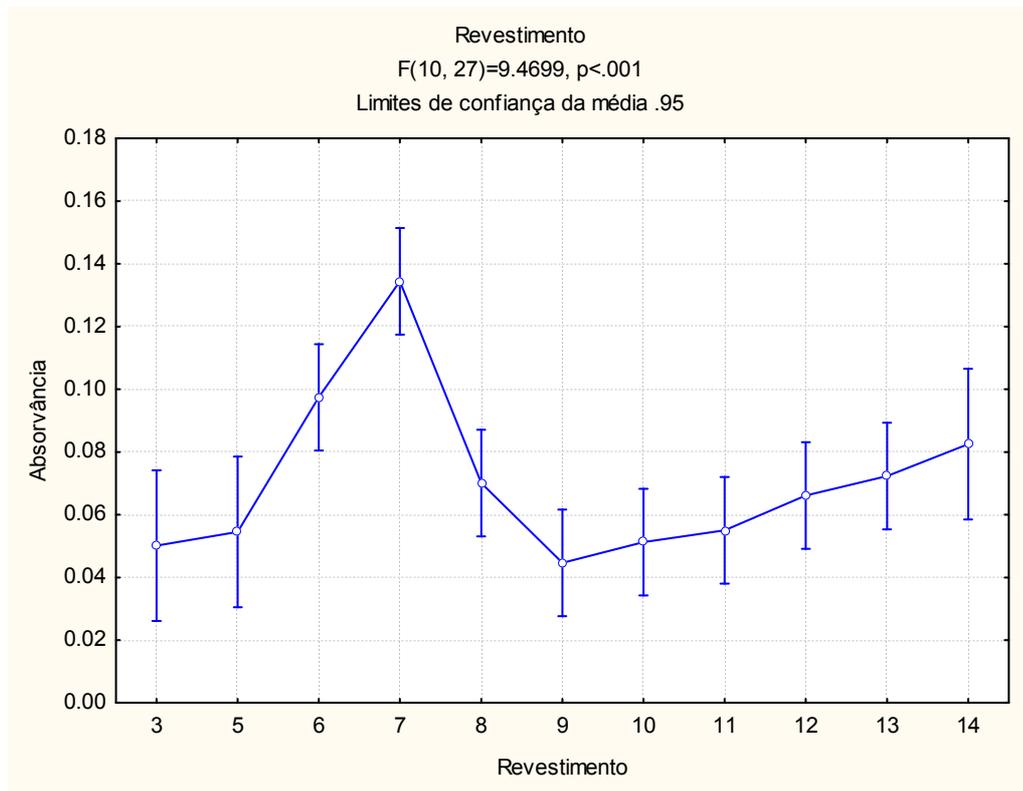


Gráfico 3 – Análise da variação da absorvância em função dos revestimentos.

O Gráfico 4 ilustra a interacção do tempo e revestimento com a absorvância. Conforme se pode observar é apenas no dia 7, para o revestimento 7, que se observa o valor mais elevado, e estatisticamente significativo, valor da absorvância ($p<.001$ e $p<.001$).

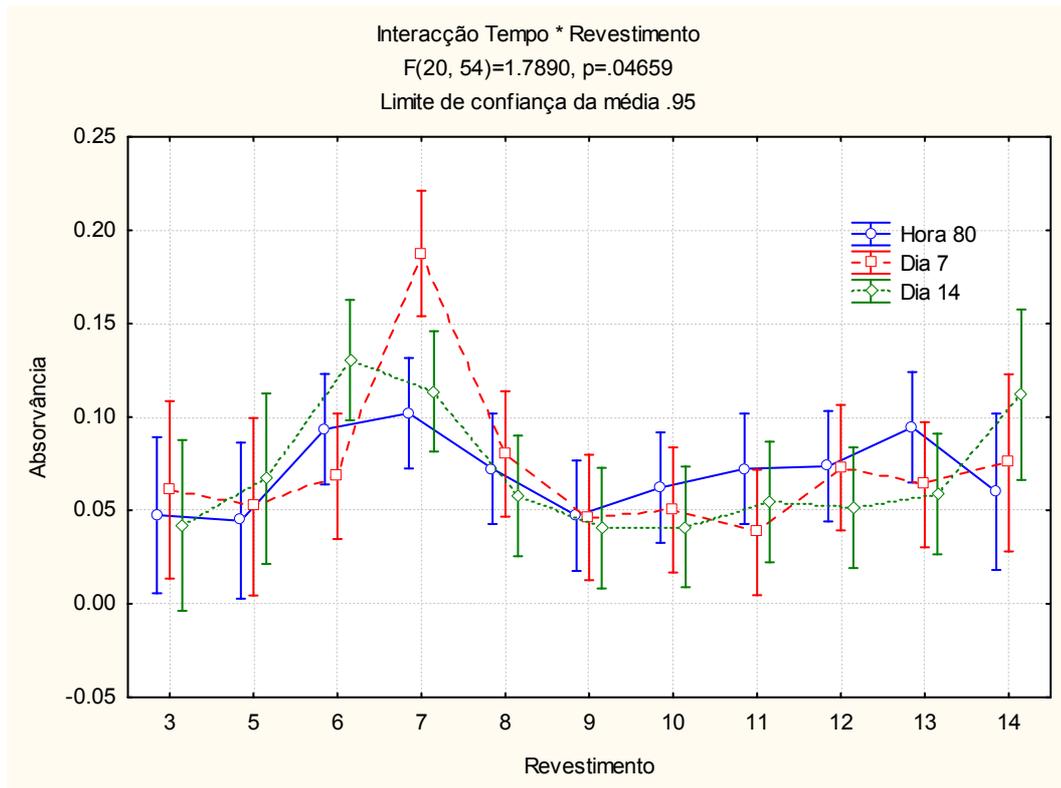


Gráfico 4 – Análise da variação da absorvância em função do tempo, das bases e dos revestimentos.

No Gráfico 5 pode observar-se que os valores da absorvância atingem um pico máximo para o revestimento 7, valor que é significativo, tendo em conta o nível de significância encontrado no Quadro 10, para o efeito revestimento ($p < .001$) em relação a todos os outros revestimentos com valores inferiores e $p < .005$ em todas as comparações *post-hoc*, exceptuando o revestimento 6.

Quadro 10 – Análise da variância de 3 factores com medidas repetidas em 1 factor.

EFFECTS	SS	DF	MS	F	P=
Base	.000	1	.000	.023	.880
Revestimento	.072	7	.010	9.656	.000*
Base*Revestimento	.005	7	.001	.658	.704
Tempo	.001	2	.001	.748	.481
Tempo*Base	.004	2	.002	2.118	.137
Tempo*Revestimento	.032	14	.002	2.468	.017*
Tempo*Base*Revestimento	.021	14	.002	1.619	.127

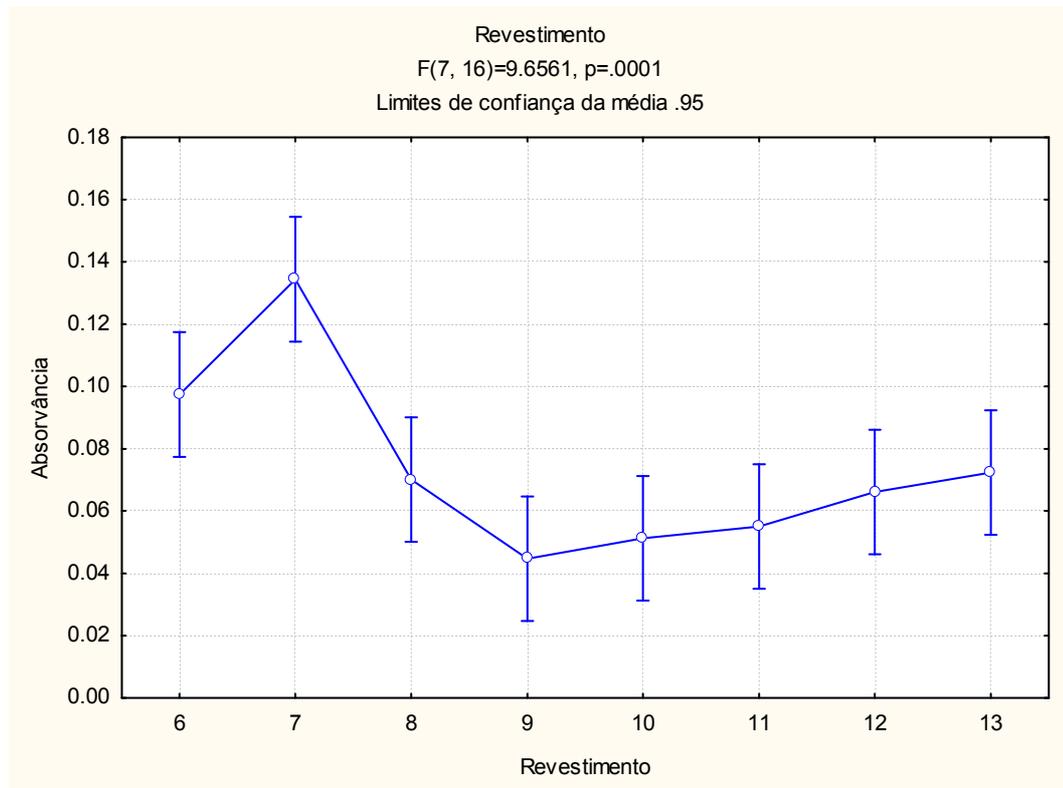


Gráfico 5 – Análise da variação da absorvância em função dos revestimentos com polilisina.

No Gráfico 6 podem observar-se os valores médios das absorvâncias quando se comparam os líquidos usados para efectuar os revestimentos (3, 4, 5 e 15) e a poliuretana 1180A50 revestida com os mesmos.

A análise da variância, conforme se pode observar no Quadro 11, mostra existirem diferenças significativas entre as bases, revestimento e interacção base*revestimento.

O revestimento 4 (PEG 300 dissolvido em DMF) na base 0 (placa de 24 poços) apresenta valores significativamente mais elevados de absorvância em relação aos outros revestimentos ($p < .05$), bem como um valor significativamente mais baixo quando comparado com a base 2 ($p = .207$).

O revestimento 15 (fibroblastos) na base 2 (Elastollan 1180A50) apresenta valores significativamente mais elevados de absorvância em relação aos outros revestimentos ($p < .05$ e $p \approx .05$), não se registando diferença significativa quando comparado com a base 0.

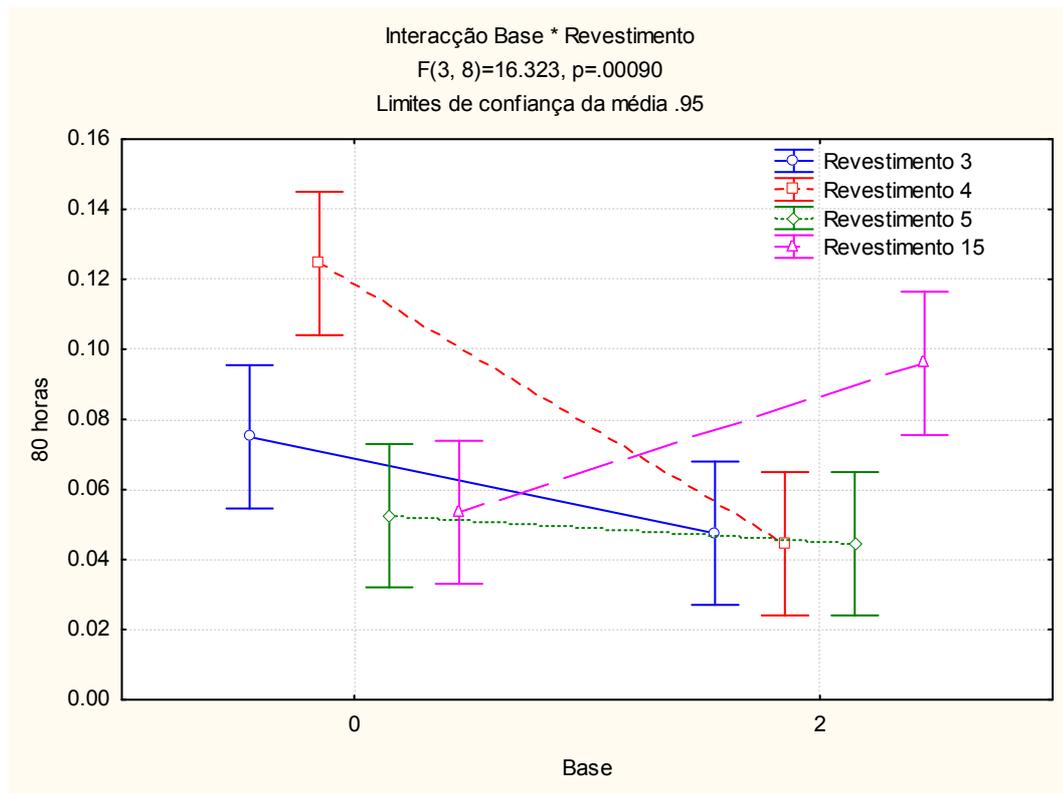


Gráfico 6 - Análise da variação da absorvância em função das bases e dos revestimentos às 80 horas.

Quadro 11 – Análise da variância de 2 factores na hora 80.

Univariate Tests of Significance for HORA80 (Trabalho80horas.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	DF	MS	F	p
Base	0.001332	1	0.001332	8.4789	0.019533
Revestimento	0.002966	3	0.000989	6.2912	0.016861
Base * Revestimento	0.007694	3	0.002565	16.3230	0.000902
Error	0.001257	8	0.000157		

A comparação dos valores médios de absorvância às 80 horas entre as três bases revelou-se estatisticamente não significativa ($F(2,3)=2,82; p=n.s.$).

Capítulo V

Conclusões

Para atingir o objectivo proposto, modificação de superfícies para controlo da adesão celular, foram realizadas algumas experiências, a partir das quais foi possível obter as conclusões, que serão agora descritas.

Através da totalidade das experiências realizadas para impregnar grupos hidroxilo e carboxilo na placa, observou-se que existiam sempre mais grupos hidroxilo do que carboxilo. Verificou-se também que, de ambos os Elastollans, o 1180A50 era o que apresentava mais grupos, quer $-OH$ ou $-COOH$, no entanto quando se utiliza o ácido acrílico surgem mais grupos. Contudo, aquando da modificação com AA o pH do meio ficou muito baixo, cerca de 3, o que é incompatível com o pH do corpo humano, que ronda os 7.

Dos vários revestimentos que se fizeram com soluções, os que deram melhores resultados foram a própria poliuretana 1180A50 dissolvida em dimetilformamida (DMF), PEG 300 dissolvido também em DMF e o poliestireno em THF. Houve alguma dificuldade em encontrar um solvente para o poliestireno, uma vez que, ao ser dissolvido em DMF e colocada a placa em água, o revestimento ficava branco e descartável, em acetona não dissolvia e em acetona e ciclohexano dissolvia, mas a solução formada era branca.

Neste trabalho é necessário ter em consideração que existe uma relação custo/benefício muito elevada, uma vez que os recursos financeiros e temporais são muito restritos. Deste modo, foi imprescindível efectuar primeiramente a modificação das superfícies. Posteriormente, para a realização dos testes de adesão celular, foi necessário aguardar que existisse um número de células suficientes.

Relativamente aos testes de adesão conclui-se que os piores resultados se verificaram nos revestimentos 3 e 5, uma vez que apresentaram os limites de confiança mais próximos de zero. Por conseguinte, os melhores resultados para a aderência celular foram os revestimentos 7 e 6, ou seja, a polilisina L e D por UV. No entanto, na primeira observaram-se resultados superiores.

Ao realizar os revestimentos com a polilisina usaram-se vários métodos: UV, absorção e ligação covalente. Através dos testes realizados concluiu-se que o melhor método é o UV, possivelmente devido à maior uniformidade do revestimento obtido e também porque esteriliza os materiais e estes não “integram” esporos de fungos, devido à manipulação das placas em ambiente não estéril. Ao aplicar-se o método de ligação covalente possibilita-se que exista algum espaço onde não se estabeleceu nenhuma ligação e se possam alojar contaminantes, que se desenvolvem com a temperatura. Aquando da repetição da experiência

13 da primeira fase obtiveram-se bons resultados, o que comprova que o facto das placas “integrarem” esporos de fungos, não foi devido ao revestimento nem à esterilização, mas ao manuseamento em ambiente não estéril quando se efectuaram os revestimentos.

Ao comparar os três tempos efectuados, 80 horas, 7 dias e 14 dias, verificou-se que o tempo no qual se obteve o melhor resultado foi aos 7 dias. Considerou-se este o melhor tempo, uma vez que foram notórios os resultados nos revestimentos 6 e 7 na transição das 80 horas para os 7 dias. Relativamente aos 14 dias observou-se que as experiências não revelaram qualquer modificação. Comprova-se assim que as placas/revestimentos testados não são nocivos para os fibroblastos num prazo mais alargado, mas também não influenciam positivamente os resultados. Testou-se este terceiro tempo para garantir que não seria um factor negativo, se se pretender efectuar a implantação destes sistemas *in vivo* durante períodos mais prolongados.

Ao confrontar os resultados obtidos nas experiências às 80 horas com os líquidos testados e o Elastollan 1180A50 revestido com os mesmos verifica-se que a experiência 4, PEG 300 dissolvido em DMF, apresenta os melhores líquido e revestimento. Deve ter-se em atenção que o PEG 300 não é tóxico e as células não o identificam como um corpo estranho, por isso, utiliza-se muitas vezes como revestimento de várias superfícies a administrar/colocar *in vivo*. No entanto, neste trabalho verificou-se uma grande diminuição dos valores da absorvância entre as experiências apenas com o líquido e com a placa revestida por este. Este facto é justificável, uma vez que o PEG 300 incorpora muitos grupos –OH que, aquando da esterilização, geram radicais livres que são nefastos para as células. Considerando o mesmo intervalo de tempo, pode ainda inferir-se que não houve qualquer alteração ao utilizar placas produzidas através de moldagem por compressão *versus* por injeção, uma vez que as placas revestidas com os líquidos foram preparadas usando este processo.

Aquando do teste dos líquidos, devido à temperatura proporcionada pela estufa, os mesmos apresentaram uma coloração branca, uma vez que os polímeros precipitaram.

Na realização dos testes de adesão celular foram utilizadas as três bases: o Elastollan 685A, o Elastollan 1180A50 e a caixa de 24 poços. Ao elaborar a análise estatística não se verificaram diferenças significativas, uma vez que não se observou qualquer interacção entre as bases e os revestimentos.

Na totalidade das experiências/revestimentos verificou-se que em nenhuma situação as células morreram. Observou-se também que a base utilizada não é fundamental, porque o que contacta directamente com as células é o revestimento.

Observando as tabelas dos ângulos de contacto e das energias de superfície verificou-se que os resultados foram concordantes, ou seja, as polilisininas por UV foram as que apresentaram ângulos de contacto maiores e menores energias de superfície. Existiu apenas uma excepção, as polilisininas por ligação covalente, que também apresentaram energias de superfície baixas, no entanto, os seus resultados de adesão celular não foram tão elevados quanto os obtidos quando foi usado o UV. O facto de surgirem melhores resultados com o UV pode ser explicado, como já foi referido, pela esterilização.

Com este trabalho foi possível verificar que o Elastollan 1180A50, e este dissolvido em DMF, apresentam resultados semelhantes, tal como o poliestireno dissolvido em DMF e a placa de 24 poços, que é constituída por poliestireno.

Por último, deve ainda referir-se que alguns dos erros que ocorreram poderão ter sido causados pela técnica. Quando se raspou o conteúdo da caixa de 24 poços para a de 96 para leitura dos resultados no leitor de microELISA, este processo é manual e pode não ter sido realizado sempre do mesmo modo, ou seja, com a mesma força, podendo não ter sido descoladas todas as células que, conseqüentemente, não foram medidas. Este erro experimental associado ao método é difícil de contornar dado que as experiências têm de decorrer em caixas de 24 poços e a leitura só pode ser efectuada em caixas de 96 poços.

Trabalho Futuro

Futuramente seria importante a repetição das experiências realizadas, incidindo especialmente nas experiências cujos resultados não foram concordantes. Poderiam também ser estudados outros revestimentos e testes. As experiências deveriam ser replicadas com maior número de elementos por amostra.

No revestimento 4, tendo-se concluído que o problema surgiu da esterilização, a experiência deveria ser repetida aplicando outro método de esterilização e ser testada até aos sete dias, pois este foi considerado o melhor tempo.

Considerando que os fibroblastos são células do tecido conjuntivo e que este se altera com a idade, seria interessante estudar possíveis variações neste tecido com a idade, isto é, realizar testes com culturas de fibroblastos “velhos”.

Outra experiência importante a realizar seria a aplicação dos testes de adesão com fibroblastos de rato para tentar determinar se o seu comportamento seria semelhante aos das células humanas. Este passo da investigação seria interessante pois os fibroblastos de rato crescem mais rapidamente do que os humanos, são mais fáceis de obter, crescem com um meio de cultura mais comum e não formam aglomerados de células mas sim uma camada celular mais uniforme. As normas ISO recomendam a realização dos testes, inicialmente, com células de rato e só posteriormente com células humanas. Repetindo e comparando os testes com células de rato e células humanas poder-se-ia fazer um paralelo e extrapolação de resultados. No entanto, dado que não se conseguiram obter células de rato e havia células humanas disponíveis, realizaram-se os testes com estas últimas. O processo adequado seria realizar os testes com células de rato e repetir os melhores resultados com células humanas.

Ponderando a futura aplicação das modificações de superfícies, analisadas neste trabalho, num biosensor seria importante a utilização de fibroblastos para os estudos porque, como anteriormente mencionado, o tecido conjuntivo tem uma distribuição bastante alargada no corpo humano.

No entanto, quando se integra um objecto estranho no corpo, este activa imediatamente o sistema imunitário, o que torna também de especial interesse o estudo dos macrófagos, no sentido de verificar se os resultados obtidos com este tipo de células são semelhantes aos obtidos com as células do tecido conjuntivo.

Concluindo, seria também importante aplicar os melhores resultados dos testes realizados *in vitro* durante este trabalho *in vivo*, num modelo animal e, posteriormente, no ser humano.

Referências Bibliográficas

- [1] Projecto Europeu *Development of a single cell based biosensor for subcellular on-line monitoring of cell performance for diagnosis and healthcare*.
- [2] Stevens, M. P. (1999). *Polymer Chemistry an introduction*. 3rd edition New York: Oxford University Press, Inc.. pp. 96, 378. ISBN 0-19-512444-8.
- [3] Melo, J. S. S., Moreno, M. J., Burrows H. D. & GIL, M. H. (2004). *Química de Polímeros*, Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra. pp. 35-60. ISBN 972-8704-22-4.
- [4] Catálogo da BASF para o Elastollan 1180A50, 2006.
- [5] Wnek, G. E., Bowlin, G. L.(2004) *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 1413-1427. ISBN 0-8247-5556-1.
- [6] Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. Editora Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. capítulo 5. ISBN 85 277-0906-6.
- [7] Manuila, L., Manuila, A., Lewalle, P.& Nicoulin, M. (2004). *Dicionário Médico*. Lisboa: Climepsi Editores.
- [8] Alface, J. I. S. (1997) *Proteínas Fibrosas*. Lidel – Edições Técnicas, capítulo 8.
- [9] http://pt.wikipedia.org/wiki/Lista_de_amino%C3%A1cidos consultado em 10.02.07.
- [10] www.wikipédia.com consultado em 10.02.07.
- [11] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science An Introduction to Materials Medicine*. Second Edition. London: Elsevier Academic Press. pp. 669- 683. ISBN 0-12-582463-7.
- [12] Fred W., Billmeyer, Jr. (1984). *Textbook of Polymer Science*, 3rd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp.141. ISBN 0-471-03196-8.
- [13] <http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/SEM.pdf> consultado em 09.02.07.
- [14] Stuart, B. (2002). *Polymer Analysis*. Austrália: John Wiley & Sons, Ltd. pp. 185-186. ISBN 0-471-81363-X.
- [15] <http://www.pocketgoniometer.com/main.php?cont=contactangle&lang=pt> consultado em 11.06.07.
- [16] <http://nautilus.fis.uc.pt/personal/mfiolhais/FGbio/aula27.pdf> consultado em 11.06.07.
- [17] <http://nautilus.fis.uc.pt/personal/mfiolhais/FGbio/aula30.pdf> consultado em 11.06.07.
- [18] *Operating manual DataPhysics OCA, 2002*, Text, graphics and layout Gerard Maier, Germany, pp.1- 5.

- [19] http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:%C3%81cido_l%C3%A1ctico_1.png consultado em 01.03.07.
- [20] Divya, P. S., Savitri, D., Mitra, C. K.(1998). Covalent enzyme immobilization onto glassy carbon matrix-implications in biosensor designs. *Biosci.*, 23, No. 2:June-1998. pp 131-136.
- [21] Lin, W., Yu, D., Yang, M. (2005). Blood compatibility of thermoplastic polyurethane membrane immobilized with water-soluble chitosan/dextran sulphate. *Science Direct*. 14: July- 2005.
- [22] <http://www.utdallas.edu/~tres/protocols/histo.polylysine.joanna.doc> consultado em 07.03.07.
- [23] Shenoy, N. R., Bailey, J. M., Shively, J. E. (1992). Carboxylic acid-modified polyethylene: A novel support for the covalent immobilization of polypeptides for C-terminal sequencing. *Protein Science*. Jan-1992. Disponível em: <http://www.protein-science.org/> (consultado em 14.03.07).
- [24] Minero, M. A., Chinchilla, M., Guerrero, O. M. & Castro, A. (2003). Infección de fibroblastos de piel de animales con distinto grado de susceptibilidad a *Leishmania infantum* y *Leishmania mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), *Revista de Biología Tropical*, 2003. pp. 262.
- [25] Wang, L., Wu, Y., Chen, L., Gu, Y., Xi, T., Zhang, A. & Feng, Z., (2005). Fabrication and evaluation of tissue engineering vascular scaffolds based on biodegradable aliphatic-aromatic copolyesters. *Science Direct*. 23: Feb. - 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com> (consultado em 20.04.07).
- [26] Falanga, V., Isaacs, C., Paquette, D., Downing, G., Kouttab, N., Butmarc, J., Badiavas, E. & Hardin-Young, J., (2002) Wounding of Bioengineered Skin: Cellular and Molecular Aspects After Injury. *The Journal for Investigative Dermatology*. USA: The Society for Investigative Dermatology, Inc., 3: Sep -2002. pp. 654.
- [27] Keira, S. M., Ferreira, L. M., Gragnani, A., Duarte, I. S. & Santos, I. A. N., (2004) Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cirúrgica Brasileira* vol.19. Dec. - 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb> (consultado em 27.04.07).
- [28] Kemp, R. B.. *LS-L292 Cytotoxicity test*. Disponível em: <http://www.ib.amwaw.edu.pl/invitox/prot/38.htm> (consultado em 29.06.2007).
- [29] Mosmann, T., (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, USA: Elsevier Science Publishers B. V..

Anexos

Anexo A – Frases de Risco e Segurança dos reagentes utilizados

Ácido Acrílico

Corrosivo

Perigoso para o ambiente

Ácido Clorídrico

Provoca queimaduras.

Irritante para as vias respiratórias. Manter fora do alcance das crianças. Em caso de contacto com os olhos lavar imediata e abundantemente com água.

Ácido Cloroacético

Evitar o contacto com os olhos. Não misturar com...(a especificar pelo produtor).

Ácido Perclórico

Inflamável. Corrosivo. Perigo de explosão sob a acção do calor. Favorece a inflamação de materiais combustíveis. Provoca queimaduras graves. Não respirar os gases/ vapores/ fumos/ aerossóis. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista. Usar vestuário de protecção adequado.

Anidrido Acético

Inflamável. Nocivo por inalação e ingestão. Provoca queimaduras. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para a vista/ face adequados. Em casos de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

Carbodiimidazol

Corrosivo

Ciclohexano (C₆H₁₂)

Facilmente inflamável. Manter o recipiente num local bem ventilado. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição – não fumar. Evitar acumulação de cargas electrostáticas.

Clorofórmio

Nocivo por ingestão. Irritante para a pele. Possibilidades de efeitos irreversíveis. Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e ingestão. Manter fora do alcance das crianças. Usar vestuário de protecção e luvas adequadas.

Dimetilformamida

Risco durante a gravidez de efeitos adversos na descendência. Evitar a exposição – obter instruções específicas antes da utilização. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

Etilcelulose

Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista. Usar vestuário de protecção adequado.

Estireno

Inflamável. Nocivo por inalação. Irritante para os olhos e pele. Não respirar vapores.

Irgacure

Tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático. Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos. Evitar a libertação para o ambiente. Obter instruções específicas/fichas de segurança.

Isopropanol

Facilmente inflamável. Irritante.

Peróxido de hidrogénio

Nocivo por ingestão. Risco de graves lesões oculares. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista. Usar um equipamento protector para a vista/ face.

Piridina

Facilmente inflamável. Nocivo por inalação, em contacto com a pele e por ingestão. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista. Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com ... (produtos adequados a indicar pelo produtor).

Tetrahidrofurano (THF)

Facilmente inflamável. Pode formar peróxidos explosivos. Irritante para os olhos e vias respiratórias. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - não fumar. Não deitar os resíduos no esgoto. Evitar acumulação de cargas electrostáticas.

Anexo B – Cálculos para a preparação da solução NaOH 6M e de NaCl 0,1M

NaOH 6M

$$C = 6M$$

$$V_i = 250ml = 0,25l$$

$$M_{NaOH} = 40g / mol$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = C \times V = 6 \times 0,25 = 1,5mol$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 1,5 \times 40 = 60g$$

NaCl 0,1M

$$V = 1000ml = 1l$$

$$M_{NaCl} = 22,9898 + 34,453 = 57,4428g / mol$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = C \times V = 0,1 \times 1 = 0,1mol$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 0,1 \times 57,4428 = 5,74428g$$

Anexo C – Preparação da solução de PBS 1M

Esta solução contém 0,2g de cloreto de potássio (KCl), 8g de cloreto de sódio (NaCl), 1,1g de hidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄) e 0,2g de hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄). No final deve-se aferir o pH a 7,4 com uma solução 0,1M de NaOH:

$$V_i = 50ml = 0,05l$$

$$M_{NaOH} = 40g / mol$$

$$C = \frac{n}{V} \Leftrightarrow n = C \times V = 0,1 \times 0,05 = 0,005mol$$

$$n = \frac{m}{M} \Leftrightarrow m = n \times M = 0,005 \times 40 = 0,2g$$

Se a solução passar o pH que se deseja adiciona-se HCl .

No final colocou-se o PBS no frigorífico para não criar bactérias.

Anexo D – Cálculos para a obtenção dos resultados do estudo de optimização da reacção com o MCA

Tabela I – Cálculos para a obtenção dos resultados do estudo de optimização da reacção com o MCA.

Concentração	Tempo (minutos)	Massa (g)	Volume (ml)	n (-COOH)	n (-COOH)/g
2%	70	1,3212	15,4	0,077	0,05828035
	90	1,8109	14,8	0,074	0,04086366
4%	70	1,7713	15,15	0,07575	0,0427652
	90	1,2483	15,2	0,076	0,0608828
6%	70	1,4237	15,3	0,0765	0,05373323
	90	1,4095	15,15	0,07575	0,05374246
8%	70	1,8673	15,1	0,0755	0,04043271
	90	1,3018	16,15	0,08075	0,0620295
10%	70	1,4581	15,75	0,07875	0,05400864
	90	1,8475	16,6	0,083	0,04492558
30%	70	1,5827	17,8	0,089	0,05623302
	90	1,8351	16,95	0,08475	0,04618277
	AA sem inibidor	1,1795	11,1	0,0555	0,04705384
	AA com inibidor	1,3545	7,15	0,03575	0,0263935
	Placa sem nada	1,5702	15,3	0,0765	0,04871991
	Placa com grupos -OH	1,4232	15,3	0,0765	0,05375211
	HCl		16,1		

Anexo E – Ângulos de Contacto e Energias de Superfície das modificações

Tabela II – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PDL por UV.

685A + PDL por UV	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	88,9±1,3	21,62±2,10
Etilenoglicol	68,2±2,2	
Formamida	70,9±1,5	
Propilenoglicol	65,8±1,8	

Tabela III – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PDL por UV.

1180A50 + PDL por UV	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	83,7±1,1	23,20±1,93
Etilenoglicol	65,9±1,3	
Formamida	75,8±1,2	
Propilenoglicol	63,9±1,8	

Tabela IV – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PLL por UV.

685A + PLL por UV	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	94,2±1,3	19,21±1,82
Etilenoglicol	68,1±1,7	
Formamida	80,0±2,2	
Propilenoglicol	67,0±1,6	

Tabela V – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PLL por UV.

1180A50 + PLL por UV	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	93,3±1,4	21,44±1,92
Etilenoglicol	64,9±1,6	
Formamida	71,4±2,6	
Propilenoglicol	61,6±1,5	

Tabela VI – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PDL por Absorção.

685A + PDL por Absorção	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	81,5±1,9	24,96±2,62
Etilenoglicol	72,4±0,9	
Formamida	75,3±1,3	
Propilenoglicol	64,1±1,2	

Tabela VII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PDL por Absorção.

1180A50 + PDL por Abs.	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	78,4±1,3	29,81±2,94
Etilenoglicol	77,0±2,2	
Formamida	73,7±1,9	
Propilenoglicol	70,4±2,7	

Tabela VIII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PLL por Absorção.

685A + PLL por Abs.	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	83,6±1,3	23,27±2,43
Etilenoglicol	65,6±1,6	
Formamida	76,4±1,4	
Propilenoglicol	69,2±2,6	

Tabela IX – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PLL por Absorção.

1180A50 + PLL por Abs.	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	67,3±1,8	35,20±3,32
Etilenoglicol	69,2±2,2	
Formamida	77,0±1,9	
Propilenoglicol	57,5±1,6	

Tabela X – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com –OH e PDL por Absorção.

685A + -OH + PDL (Abs.)	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	75,7±1,1	30,21±2,11
Etilenoglicol	69,0±1,4	
Formamida	67,8±1,9	
Propilenoglicol	61,4±1,2	

Tabela XI – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com –OH e PDL por Absorção.

1180A50 + -OH + PDL (Abs.)	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	75,1±1,6	29,61±2,73
Etilenoglicol	64,9±1,5	
Formamida	70,2±2,0	
Propilenoglicol	57,3±1,5	

Tabela XII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com –OH e PLL por Absorção.

685A + -OH + PLL (Abs.)	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	91,3±1,2	22,05±1,72
Etilenoglicol	67,6±0,9	
Formamida	73,4±1,0	
Propilenoglicol	62,1±1,4	

Tabela XIII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com –OH e PLL por Absorção.

1180A50 + -OH + PLL (Abs.)	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	74,5±1,1	32,48±2,28
Etilenoglicol	66,0±1,5	
Formamida	74,5±1,8	
Propilenoglicol	66,7±1,4	

Tabela XIV – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PDL.

685A + PDL	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	81,7±1,7	25,35±2,70
Etilenoglicol	71,5±1,3	
Formamida	73,1±1,7	
Propilenoglicol	64,5±1,6	

Tabela XV – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PDL.

1180A50 + PDL	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	84,6±1,4	23,48±2,32
Etilenoglicol	65,7±1,1	
Formamida	71,0±3,8	
Propilenoglicol	64,1±2,0	

Tabela XVI – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com PLL.

685A + PLL	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	88,3±0,7	20,26±1,49
Etilenoglicol	78,5±1,9	
Formamida	74,7±1,2	
Propilenoglicol	65,2±1,8	

Tabela XVII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com PLL.

1180A50 + PLL	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	77,4±1,9	27,90±3,00
Etilenoglicol	65,8±1,0	
Formamida	70,5±2,1	
Propilenoglicol	57,6±1,6	

Tabela XVIII – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 685A modificado com Lisina.

685A + Lisina	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	83,6±1,1	
Etilenoglicol	86,3±1,4	26,38±2,04
Formamida	70,9±2,1	
Propilenoglicol	76,1±1,1	

Tabela XIX – Ângulos de Contacto e Tensão Superficial do Elastollan 1180A50 modificado com Lisina.

1180A50 + Lisina	Ângulos de Contacto (°)	Tensão Superficial (mN/m)
Água	86,9±2,2	
Etilenoglicol	67,9±1,5	23,70±3,49
Formamida	69,9±1,7	
Propilenoglicol	63,3±3,1	

