

Miriam Fátima Gonçalves

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO A PLASMA
NAS PROPRIEDADES DA MATRIZ DE REGENERAÇÃO
DÉRMICA**

Dissertação submetida ao Programa de Engenharia e Ciências Mecânicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia e Ciências Mecânicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Viviane Soethe Parucker

Coorientador: Prof. Dr. Diego Alexandre Duarte

Joinville
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gonçalves, Miriam Fátima

Análise da influência do tratamento a plasma nas propriedades da matriz de regeneração dérmica / Miriam Fátima Gonçalves; orientador, Viviane Lilian Soethe Parucker, coorientador, Diego Alexandre Duarte, 2019.

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Joinville, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Mecânicas, Joinville, 2019.

Inclui referências.

1. Engenharia e Ciências Mecânicas. 2. Plasma. 3. Biomaterial. 4. Biopolímero. 5. Colágeno.
I. Parucker, Viviane Lilian Soethe. II. Duarte, Diego Alexandre. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Mecânicas. IV. Título.

Miriam Fátima Gonçalves

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO A PLASMA NAS PROPRIEDADES DA MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa Engenharia e
Ciências Mecânicas

Joinville, 8 de março de 2019.

Prof. Régis Kovacs Scalice, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Viviane Lilian Soethe Paruker, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Diego Alexandre Duarte, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Derce de Oliveira Souza Recouvreux, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rafael Gallina Delatorre, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Márcia Adriana Tomaz Duarte, Dr.^a
Centro Universitário Tupy - UNISOCIESC

Este trabalho é dedicado aos meus
filhos e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

À professora orientadora Dr.^a Viviane Lilian Soethe Parucker, pela orientação, críticas e norteamentos durante a pesquisa.

Ao professor coorientador Dr. Diego Alexandre Duarte, pelo direcionamento da pesquisa.

Aos meus pais, Jorge e Edite, que forneceram suporte insubstituível durante esta jornada.

Aos meus filhos Luan e Alan onde muitas vezes me fiz ausente; a vocês todo meu amor e dedicação.

À minha amiga Sandra Ril, pelo ombro amigo e por sempre acreditar na minha competência até mesmo quando eu não acreditava nela.

Ao Roberto Steffen (in memoriam) e Eliana Steffen, meus pais de Joinville emprestados pela querida Amanda Steffen, a quem devo imensa gratidão e igualmente ao seu marido Vinícius Coelho, que muito auxiliaram nessa fase.

Agradeço a Tadeu, Isabel e Pedro Souza, pela colaboração, auxílio e carinho, a mim destinado, nesta jornada.

À Promedon por disponibilizar o material deste estudo, sem o qual, a pesquisa seria inviável.

À UDESC pela disponibilidade de laboratório e equipamentos.

À UNISOCIESC pelos ensaios realizados.

"Nada posso lhe oferecer que não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo além daquele que há em sua própria alma. Nada posso lhe dar, a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo."

(Hermann Hesse)

RESUMO

Dados oficiais do Ministério da Saúde, do Brasil, indicam que ocorrem cerca de um milhão de lesões dérmicas por ano, o que evidencia a necessidade do estudo de métodos de regeneração dérmica, visando a melhorar a qualidade de vida, uma vez que, pessoas morrem direta ou indiretamente por infecções e/ou inflamações em queimaduras. Neste estudo a matriz de regeneração dérmica utilizada é composta por colágeno do tipo I e glicosaminoglicanos, e de uma fina camada de silicone para proteger a estrutura viva, que é aplicada no tecido lesionado. Um dos tratamentos citados inclui os processos a plasma, que têm sido utilizados para gerar espécies químicas, capazes de eliminar contaminantes e catalisar reações atribuídas a biocompatibilidade. Considerando o exposto, no presente trabalho, é apresentado o estudo da influência de diferentes parâmetros do tratamento por plasma de argônio, em membrana polimérica, utilizadas no segmento médico e com a finalidade de gerar sítios ativos, o que auxilia na biocompatibilidade. A matriz dérmica (Integra™) utilizada neste estudo foi liofilizadas para a retirada da água e, posteriormente, foram tratadas por plasma de argônio, para duas configurações experimentais diferentes. Amostras denominadas 1, 2 e 3 foram tratadas por 120, 150 e 60s, respectivamente, com plasma de argônio composto por 50 sccm de fluxo de massa e 3,4 torr de pressão de trabalho, gerados por 450 V DC e corrente de 0,32 A. As amostras denominadas 3, 4 e 6 foram tratadas por 60, 120 e 180s, respectivamente, com plasma de argônio, composto por fluxo de massa de 20 sccm e pressão de trabalho de 9,7 torr, geradas por 400 V DC e corrente de 0,27 A. As caracterizações foram conduzidas pelo modelo MEV Jeol JSM-6390LV, o modelo XPS Thermo Scientific K-Alpha e o modelo TAC TA Instruments Q20 para avaliar morfologia, propriedades químicas e estabilidade térmica, respectivamente. Os espectros de XPS foram realizados para caracterizar a quantidade de oxigênio presente na amostra. Os resultados deste estudo mostram que o plasma de argônio promove modificações estruturais negativas para o crescimento celular, houve mobilidade das cadeias, fechando parcialmente os poros. Considerando o exposto, no presente trabalho, é apresentado o estudo da influência de diferentes parâmetros do tratamento por plasma de argônio, em membrana polimérica, utilizadas no segmento médico e com a finalidade de gerar sítios ativos, o que auxilia na biocompatibilidade.

Palavras-chave: Plasma. Biopolímero. Biomaterial. Colágeno.

ABSTRACT

Official data from the Brazilian Ministry of Health indicate that there are around one million skin lesions per year, which highlights the need to study dermal regeneration methods to improve the quality of life, since people die directly or indirectly from infections and / or inflammations in burns. In this study the dermal regeneration matrix used is composed of type I collagen and glycosaminoglycans, and a thin layer of silicone to protect the living structure, which is applied to the injured tissue. One of the treatments cited includes plasma processes, which have been used to generate chemical species capable of eliminating contaminants and catalyzing reactions attributed to biocompatibility. Considering the above, in the present work, the study of the influence of different parameters of argon plasma treatment in polymeric membrane, used in the medical segment and with the purpose of generating active sites, is presented, which assists biocompatibility. The dermal matrix (Integra™) used in this study was lyophilized for water withdrawal and subsequently treated by argon plasma for two different experimental configurations. Samples denominated 1, 2 and 3 were treated by 120, 150 and 60s, respectively, with argon plasma composed of 50 sccm of mass flow and 3.4 torr of working pressure, generated by 450 V DC and current of 0, The samples named 3, 4 and 6 were treated with 60, 120 and 180s, respectively, with argon plasma, composed of mass flow of 20 sccm and working pressure of 9.7 torr, generated by 400 V DC and current of 0.27 A. The characterizations were conducted by Jeol JSM-6390LV MEV model, Thermo Scientific K-Alpha XPS model and TA Instruments Q20 TAC model to evaluate morphology, chemical properties and thermal stability, respectively. The XPS spectra were performed to characterize the amount of oxygen present in the sample. The results from the study show that argon plasma promotes structural modifications that are negative for cell growth, there was motility of the chains, partially closing the pores. Considering the above, in the present work, the study of the influence of different parameters of argon plasma treatment in polymeric membrane, used in the medical segment and with the purpose of generating active sites, is presented, which assists biocompatibility.

Keywords: Plasma. Biopolymer. Biomaterial. Collagen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo representando a evolução dos biomateriais.	33
Figura 2. Esquema ilustrativo dos contextos de aplicação da norma ISO 10.993.....	35
Figura 3. Imagem ilustrativa da estrutura da pele humana.....	37
Figura 4. Classificação de substitutivos de pele proposta pelo Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.	38
Figura 5. Representação esquemática da estrutura do colágeno.	41
Figura 6. Representação esquemática da glicosaminoglicina GAG (condroitina-6-sulfato).	41
Figura 7. Esquema ilustrativo da interação plasma e membrana polimérica.	47
Figura 8. Fluxograma evidenciando a metodologia a ser empregada para a execução do presente trabalho.....	52
Figura 9. MRD (a) embalagem de armazenamento, (b) MRD evidenciando a lamina de silicone e (c) MRD pronta para caracterização e tratamento evidenciando a lamina de GAG e Sulfato de condroitina.	53
Figura 10. Liofilizador em funcionamento com as amostras de MRD, e amostras de MRD após a liofilização.....	54
Figura 11. (a) Reator de plasma utilizado para o tratamento das MRDs e (b) Parte interna do reator, em detalhe o porta amostra com a MRD fixada.	56
Figura 12. (a) Amostras de MRD no interior do reator, antes do tratamento e (b) Amostras no interior do reator durante o tratamento.	57
Figura 13. Ângulo de contato entre uma gota líquida e uma superfície sólida horizontal.	59
Figura 14. Espectros XPS do orbital O1s para amostras 0-6.	62
Figura 15. Análise de DSC da MRD não tratada e não liofilizada de MRD.	63
Figura 16. Análise de DSC das amostras de 1 a 6 após o tratamento por plasma de argônio.	64
Figura 17. Análise termogravimétrica, evidenciando a perda de massa em porcentagem, em função da temperatura da MRD não liofilizada.	65
Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura da matriz de regeneração dérmica, sem tratamento liofilizadas: a) 100x; b) 500x, evidenciando o tamanho de poros; c) 2500x.	66
Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura MEV da MRD, com tratamento por plasma, com diferentes magnificações: a) 100x; b) 500x e c) 2500x.	67

Figura 20. Amostra de MRD não tratada, com gotas de água absorvidas no teste de ângulo de contato.	69
Figura 21. Gota de água na superfície da MRD, após tratamento com plasma.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros do tratamento com plasma de argônio.	55
Tabela 2. Análise de reidratação da MRD após liofilizar.....	68
Tabela 3. Ângulo de contato das amostras de MRD após tratamento com plasma.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MRD – Matriz de Regeneração Dérmica
GAG – Glicosaminoglicanas
ISO – Internation Standards Organization
EEB – Encefalopatia Espongiforme Bovina
OMS – Organização Mundial da Saúde
UV – Ultravioleta
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ECM – Matriz Extracelular
PSU – Polissulfona
PHB – Polihidróxibutirato
PU – Poliuretano
PEUAPM – Polietileno de Ultra Alto Peso Molecular
RF – Rádio Frequência
DBDs – Barreira Dielétrica
PA6 – Poliamida 6
PEAD – Polietileno de Alta Densidade
APPJ – Jatos de Plasma com Pressão Atmosférica
DSC – Calorimetria Exploratório Diferencial
TG – Termogravimetria
MEV – Microscopia Eletronica de Varredura
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME)
XPS – Espectrometria de Fotoeletrons Excitados por Raio -
FWHM – Largura à meia altura. *full width at half maximum* FWHM

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	OBJETIVOS	30
1.1.1	Objetivo geral	30
1.1.2	Objetivos específicos	30
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1	BIOMATERIAIS	33
3	ENGENHARIA TECIDUAL	36
3.1	MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA	39
3.2	COLÁGENO.....	42
3.2.1	Desnaturação	43
3.2.2	Desnaturação do Colágeno	43
4	TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE	44
4.1	PROPRIEDADE DE SUPERFÍCIE DE MATERIAIS POLIMÉRICOS	44
4.2	TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE POLIMÉRICA	44
4.3	TRATAMENTO DE SUPERFÍCIES POR PLASMA.....	45
5	INTERAÇÃO DO PLASMA COM A SUPERFÍCIE DE POLÍMEROS	48
5.1	INTERAÇÃO RADIAÇÃO-MATÉRIA	48
5.2	PARTÍCULAS CARREGADAS	49
5.3	ESPÉCIES NEUTRAS	49
5.4	INTERAÇÃO DO SUBSTRATO POLIMÉRICO COM PLASMA.....	50
5.5	FUNCIONALIZAÇÃO DE POLÍMEROS.....	50
6	METODOLOGIA DO TRABALHO	52
6.1	SELEÇÃO DO MATERIAL	53
6.2	LIOFILIZAÇÃO	54
6.3	TRATAMENTO COM PLASMA DE ARGÔNIO	55
6.4	ENSAIOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA..	57
6.5	ESPECTROMETRIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (XPS).....	57

6.6	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) 58	
6.7	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG).....	58
6.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 59	
6.9	ANÁLISE DE ÂNGULO DE CONTATO.....	59
6.10	REIDRATAÇÃO.....	60
7	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
7.1	ESPECTROMETRIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (XPS).....	61
7.2	ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	62
7.3	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA TG.....	65
7.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 66	
7.5	ANÁLISE DE REIDRATAÇÃO.....	68
7.6	ANÁLISE DE ÂNGULO DE CONTATO DA MRD	69
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
9	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Com a melhoria da qualidade de vida e a consequente ampliação da longevidade da população, torna-se cada vez mais importante buscar meios de melhorar a saúde para minimizar o impacto natural ao organismo ao longo do tempo. De forma a propiciar esta redução, a demanda de materiais que possam substituir ou regenerar partes do organismo, encontra-se em crescimento por meio do desenvolvimento dos biomateriais (HEDAYATI; SADIGHI; ZADPOOR, 2017).

Este tema é recorrente na literatura, sendo alvo de inúmeras pesquisas diretamente relacionadas à área da saúde. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a qualidade de vida é a percepção do indivíduo de sua posição na vida, no contexto da cultura e nos sistemas de valores nos quais vive em relação aos seus padrões e às suas preocupações. Inserido neste contexto os biomateriais têm como objetivo auxiliarem e/ou melhorarem a qualidade de vida do indivíduo, sendo materiais atóxicos, caracterizados por serem compatíveis com o sistema biológico (WILLIAMS, 2014). As características necessárias para que um material possa ser classificado como biomaterial são: (i) ser compatível com o organismo vivo de forma a provocar o mínimo de reação adversa ao mesmo e (ii) biofuncional, i.e., capaz de exercer a função que lhe é incumbida como se fosse o próprio organismo (RESENDE, 2013).

Este tipo de dispositivo médico é, em sua maioria, importado, onerando o sistema público e privado de saúde, sendo que o desenvolvimento de pesquisas e estudos destas tecnologias no Brasil, possibilita a redução de custos como, por exemplo, processos de importação (MACÊDO et al., 2012).

Desde a introdução dos substitutivos de pele em 1871, a enxertia tornou-se uma cirurgia de referência para o recobrimento de feridas cutâneas (HORCH et al., 2005).

Já no final dos anos 90, mediante o avanço tecnológico relacionado à enxertia, do prognóstico de pacientes com grandes queimaduras e do conhecimento da ciência dos materiais, Burke e Yannas iniciaram estudos para a criação de um produto comercial semelhante à pele humana, uma pele artificial (HODGKINSON; BAYAT, 2011a, 2011b; SCHULZ 3RD; TOMPKINS; BURKE, 2000). Esta pele é uma membrana bicamada feita de porções epidérmicas e dérmicas distintas desenvolvidas através de extensas experiências físico-químicas. O material é projetado para conter propriedades físico-químicas que proporcionem a devida hidratação e revestimento da região, levando à eliminação do tecido morto, aderência

superficial, controle da invasão bacteriana e perda de fluido, induzindo invasão celular e vascular, que sintetizaria uma matriz dérmica durante a biodegradação do implante artificial (BURKE et al., 1981). O dispositivo empregado para a recuperação de tecidos lesionados é conhecido como matriz de regeneração dérmica (MRD), sendo um substitutivo cutâneo permanente, desenvolvido para promover uma cobertura com regeneração ordenada da pele, neste trabalho a MRD selecionada é constituída de colágeno tipo I e glicosaminoglicano disponível no mercado para uso médico, a escolha deste material baseou-se na redução de variáveis proporcionando assim resultados com maior fidelidade.

Matrizes de regeneração dérmica têm, por finalidade, tratar lesões profundas, promovendo a regeneração do tecido lesionado, sendo classificados em (KUMAR, 2008):

- Classe I: curativos temporários impermeáveis que não apresentam nenhum componente epidérmico e são essencialmente impermeáveis. Agem como barreira mecânica a invasão de bactérias e reduzem a perda líquida por evaporação.
- Classe II: substitutivos de pele duráveis de camada única.
- Classe III: substitutivos complexos de pele.

A redução nos processos de rejeição dos biomateriais é um desafio para os pesquisadores e fabricantes deste tipo de material, pois verifica-se que a alteração da capacidade de adesão das células na superfície do material modifica sua biocompatibilidade.

Em relação ao desenvolvimento de dispositivos biocompatíveis e biofuncionais estes precisam atender aos requisitos da ISO 10.993, intitulada “Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos” (BORELLI et al., 2009). A aplicação de biomateriais para recuperação de tecido e órgãos com lesão de traumas mecânicos, deformidades ou doenças, auxiliam a regeneração dos membros comprometidos ampliando a qualidade de vida dos usuários (JR; WADA, 2007).

Em lesões cutâneas a primeira escolha é o autoenxerto de pele, obtido por meio de áreas não lesionadas (MAES, 2012). Os substitutivos cutâneos podem ser utilizados para regenerar uma neoderme de características histológicas semelhante a derme normal, outra situação para utilização de substitutivos é quando a área doadora é insuficiente para cobertura da área lesionada (PREIMA et al., 2013), sendo neste caso recomendado o uso de MRD.

A alteração da molhabilidade de uma superfície polimérica pode ser obtida por meio de processos físicos e químicos, que pode ser também considerada como um fenômeno cinético e contribui para uma boa

difusão de líquidos, pois é favorecida pelo contato das macromoléculas durante a migração de líquidos da superfície de um polímero para seu interior. Além disso, a molhabilidade de um polímero é essencial para a ocorrência da adsorção, levando a formação de interações moleculares como interações de Van de Waals, interações ácido-base, e ligações de hidrogênio intermolecular (COSTA et al., 2008; SHENTON et al., 2001).

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

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

Além dos tratamentos citados, é recorrente na literatura a alteração superficial do biopolímero por meio da exposição deste a um gás colocado a baixa pressão e a alta energia, conhecido como plasma (JACOBS et al., 2012). Estudos apontam que a superfície do biomaterial, tratado por plasma, pode apresentar redução do ângulo de contato, evidenciando elevação na energia de superfície e na hidrofiliabilidade superficial, com contribuições para a biocompatibilidade (MORAES et al., 2013). Tais resultados podem estar associados ao processo de interação do plasma com a superfície, que pode ocorrer por meio da quebra de ligações químicas na superfície ou por polimerização induzida (JACOBS et al., 2012; KALIA et al., 2013). Tratamento de superfície por plasma possui um campo de aplicação de largo alcance, como por exemplo, limpeza, esterilização, deposição de revestimentos, além de

modificações e implantações químicas na superfície de diferentes substratos (CHUA; CHENA; WANGA, 2002).

O tratamento de biomateriais por plasma é relatado na literatura como um método para alteração de diversas propriedades dos materiais (VON WOEDTKE et al., 2013). A vantagem da aplicação do plasma neste tipo de superfície recai no fato de que apenas a superfície é alterada, mantendo a maior parte do volume do material com as propriedades iniciais, sendo considerado um processo limpo, pela baixa geração de resíduos. (CHICHTI et al., 2013).

O uso de materiais bioabsorvíveis ou biocompatíveis na medicina vem crescendo devido ao emprego de novos métodos de tratamento de lesões e perdas teciduais. Com a modificação da superfície do biomaterial por plasma, verifica-se uma alteração na molhabilidade, podendo tornar o material mais propenso a citocompatibilidade e biofuncionalidade. Neste sentido, verifica-se que técnicas assistidas por plasma são opções para modificação de superfícies, sendo relativamente econômica e auxiliando na redução da rejeição do biomaterial pelo hospedeiro (ESPOSITO et al., 2007).

No presente trabalho propõe-se um estudo do tratamento por plasma em MRD, visando avaliar comparativamente as propriedades pré e pós-tratamento da membrana, permitindo assim analisar a influência do tratamento superficial por plasma nas propriedades mecânicas, físicas e químicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Analisar a influência do tratamento por plasma de argônio em uma matriz de regeneração dérmica de colágeno tipo I e glicosaminoglicano.

1.1.2 Objetivos específicos

Além do objetivo geral, este trabalho visa:

- Promover alterações superficiais no biomaterial utilizando plasma de argônio em diferentes condições de tratamento.

- Avaliar as características físicas, químicas e morfológicas do biomaterial após o tratamento por plasma.
- Caracterizar a MRD por meio de análises térmicas e morfológicas, calorimetria exploratória diferencial DSC, termogravimetria TG e microscopia eletrônica de varredura MEV.
- Determinar as condições térmicas para o uso do plasma em MRD de colágeno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na sequência serão abordados os conceitos teóricos sobre biomateriais, sua importância e aplicações, tipos de tratamento de superfícies empregadas e as modificações da mesma por plasma.

2.1 BIOMATERIAIS

Biomateriais são definidos como toda substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, que quando aplicadas em um organismo vivo, para substituição ou ampliação de tecido ou órgão, tenha biofuncionalidade, não seja tóxico e com capacidade de interagir com o sistema biológico, não induzindo reações adversas no sítio de implantação ou mesmo sistemicamente (WILLIAMS, 2014)

Historicamente, há relatos de preocupação estética e funcional de órgãos e tecidos mutilados, sendo que a prótese mais antiga foi datada de 2600 anos atrás, encontrada no Egito antigo, na cidade de Tebas, tal prótese tratava-se de um dedo artificial, feito à base de linho tratado e prensado, com uma unha de material semelhante ao vidro, supunha-se, pelos furos no artefato, que o mesmo era preso por fitas em forma de tiras. Como tais implantes não obtinham completo sucesso, em 1940, o físico Peter Medawar, da Universidade de Londres, iniciou investigações sobre base imunológicas ligadas a rejeição de implantes, o que lhe conferiu o prêmio Nobel daquele ano (DIAS, 2006).

A produção do biomaterial é o resultado da conjunção de esforços de várias áreas tais como medicina, química, física, engenharia de matérias, entre outras (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001). A evolução dos biomateriais é apresentada esquematicamente na Figura 1.

Figura 1. Linha do tempo representando a evolução dos biomateriais.



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

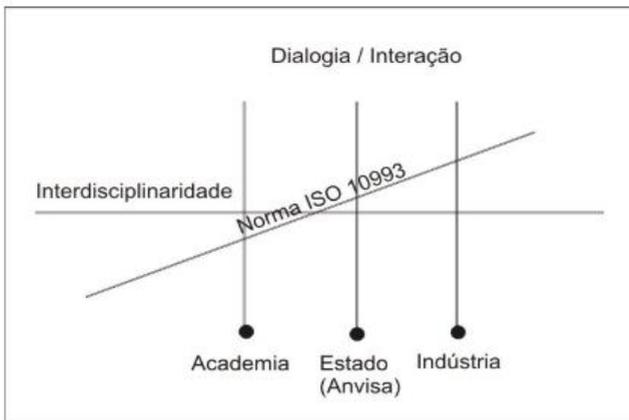
As ligas metálicas são usadas desde antes do século XX, na década de 70, o desenvolvimento de biovidros e biocerâmicas fosfatadas determinou a segunda geração dos biomateriais. Compósitos e nanocompósitos com alta superfície reativa, biocompatibilidade e bioatividade são conceitos utilizados na terceira geração de biomateriais. Estima-se que a quarta geração atuará com os nanomateriais, os nanocompósitos de matriz osseocondutora, em conjunção com células osseogênicas, sendo que, a classe dos polímeros é a mais utilizada (KARTHIK; MURUGAN; VIJAYAN, 2013), suas principais aplicações recaem nos materiais cirúrgicos fibrosos temporariamente implantáveis, sutura, grampos e sistemas de liberação de drogas (BARROS, 2013).

Os biomateriais devem isentar-se de produzir respostas biológicas adversas, locais ou sistêmicas (SIMÕES, 2007). Dentre estes materiais, uma classe que vem ganhando destaque em pesquisas científicas e aplicações, são os polímeros bioreabsorvíveis, capazes de despolimerizar em meio biológico sem gerar resíduos nocivos ou tóxicos (MOTTA, 2002).

Devido a importância do tema, a fim de normalizar a produção deste tipo de material, a Organização Internacional de Normalização (ISO) publicou, em 1992, a norma diretriz sobre dispositivos biomédicos, conhecida como ISO 10.993, intitulada “Avaliação biológica de dispositivos médicos”, está em constante atualização, englobando desde a caracterização do biomaterial, a seleção de ensaios necessários, requisitos técnicos específicos para cada ensaio de biocompatibilidade, além de orientar sobre os testes, apresentando as principais exigências sobre o bem estar animal envolvido na pesquisa e nortear a interdisciplinaridade de vários profissionais envolvidos na produção de um biomaterial (BORELLI et al., 2009). Os três contextos primordiais da ISO 10.993 são apresentados esquematicamente na Figura 2, demonstrando uma interpretação que integra-os na aplicação e utilização da norma: científico, regulatório e industrial, com o intuito de desenvolver um biomaterial, sendo necessário a interação de diferentes áreas, como física, química, biologia e engenharias.

A interdisciplinaridade é de fundamental importância para o desenvolvimento de um novo biomaterial. É necessária a corroboração e a interação de diversos profissionais e segmentos para que o biomaterial seja projetado e constituído de maneira similar ao organismo humano e com funcionalidade apresentando a menor rejeição possível (BORELLI et al., 2009).

Figura 2. Esquema ilustrativo dos contextos de aplicação da norma ISO 10.993.



Fonte: Borelli et al. (2009).

3 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia de tecidos, uma área interdisciplinar, tem como objetivo desenvolver biomateriais para serem utilizados como substitutivos ou regeneradores de tecidos, órgãos danificados por lesões, deformidades ou doenças, podendo ser de origem sintética ou natural (JACOBS et al., 2012).

A falência dos órgãos e perda de tecidos representa um problema de grandes proporções para os seres humanos, sendo que a atual abordagem de tratamento baseia-se nas técnicas de transplante. Entretanto, o desenvolvimento da engenharia de tecidos possibilitou que os defeitos e lesões em órgãos e tecidos pudessem ser tratados utilizando células do próprio paciente, cultivadas sobre suporte polimérico, de modo que o tecido seja regenerado, a partir de células naturais. A grande vantagem deste método é que não é necessário um doador, reduzindo assim o problema da rejeição do transplante.

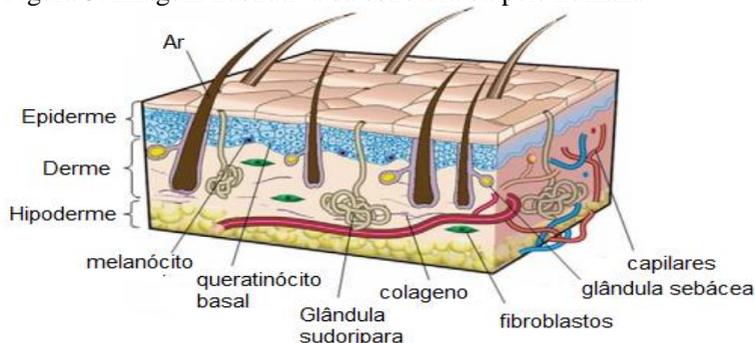
O primeiro relato da utilização deste tipo de material relaciona-se com o desenvolvimento de suportes bioestáveis, para cultura de células que foram então cultivadas em tecido. Mais recentemente, os materiais bioabsorvíveis têm sido utilizados como suporte, uma vez que estes podem desaparecer do local do transplante ao longo do tempo. A finalidade do suporte é atuar como uma matriz extracelular (ECM), onde as células podem se aderir e crescer, e, portanto, orientar o desenvolvimento de tecidos funcionais, totalmente novos (BARROS, 2013; GREGOR; HOŠEK, 2011).

A pele é o maior órgão do corpo humano, apresentando uma área superficial de 1,5 a 2,0 m² em adultos, podendo atingir até 16% do peso corpóreo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), sendo composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, esquematicamente apresentadas na Figura 3.

A epiderme, com espessura de 0,1 a 0,2 mm, com predominância celular de queratinócitos e melanócitos (camada externa da pele), é a membrana basal que separa fisicamente a epiderme da derme. A derme é composta por tecido conjuntivo, rica em colágeno e elastina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), e possui, predominantemente, componentes celulares chamados de fibroblastos, responsáveis pela matriz extracelular, sistema rico em vascularização. Além disso, possui anexos chamados de “ilha de regeneração” por conter células epidérmicas que ao sofrer lesão profunda, regeneram a pele. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Já a hipoderme, também conhecida como tecido cutâneo, é formada, em sua maioria, por tecido adiposo, que atua como

isolamento e fonte de energia, sendo o local onde se encontra o início das conexões nervosas da pele (BÖTTCHER-HABERZETH; BIEDERMANN; ERNEST, 2010). O tecido cutâneo como um todo possui várias funções complexas, como receptores sensoriais, folículos pilosos para produção e crescimento de pêlos e dois tipos de glândulas sudoríparas: uma glândula endócrina, que regula principalmente a temperatura corpórea e uma glândula apócrina onde o suor produzido por estas glândulas é composto por água, íons, amônia, aminoácidos, proteínas, lipídios, uréia, ácido láctico e glicose, este suor tem a consistência um pouco viscosa (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001).

Figura 3. Imagem ilustrativa da estrutura da pele humana.



Fonte: Böttcher-Haberzeth, Biedermann e Ernest (2010).

O termo “ferida” ou lesão pode ser definido como qualquer ruptura da integridade da pele, membranas mucosas ou qualquer outra estrutura do corpo, podendo ser causada por traumas físicos, térmicos, químicos ou desencadeada por uma afecção clínica, apresentando-se de diversas formas, tamanhos e profundidades (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

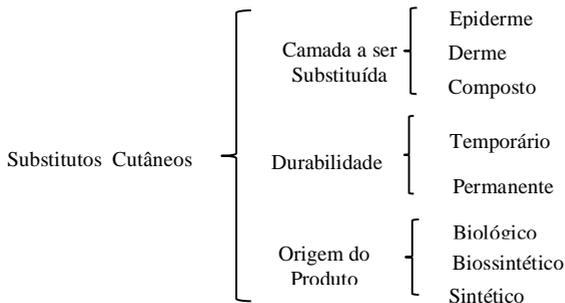
Em uma lesão superficial, a pele repara o local lesionado naturalmente, por meio da proliferação e do crescimento de derme (fibroblastos e outras células estromais) e/ou epiderme (queratinócitos e melanócitos), devido à permanência de células no local da ferida. Em lesões extensas e profundas de pele e mucosa, pode ocorrer a destruição de elementos da epiderme e da derme, tornando o processo de regeneração lento e suscetível a complicações ou a impossibilidade de uma regeneração tecidual natural (GRIFFITH, 2000; METCALFE; FERGUSON, 2008).

Para auxiliar na regeneração dérmica, são desenvolvidos substitutivos cutâneos, que se classificam como um grupo heterogêneo de

elementos biológicos e/ou sintéticos, que possibilitam a oclusão temporária ou permanente de lesões na pele. Pode-se considerar como substituto dérmico desde o aloenxerto de pele até a combinação de cultura de queratinócitos autólogos sobre a matriz dérmica, em busca da maior semelhança possível com a pele humana (JUSTINIANO; SOUZA, 2015).

Os pioneiros na tentativa de fabricar substitutivos cutâneos a partir de cultura de células epidérmicas foram Rheinwald e Green em 1974 (RHEINWALD; GREEN, 1974) quando um pequeno fragmento de pele saudável foi cultivado até que uma lâmina suficiente de queratinócitos fosse produzida para cobrir a lesão. Apesar da inovação tecnológica que a ideia de se “construir pele” trazia, haviam desvantagens no uso destes procedimentos, como o retardo na enxertia em aproximadamente 3 a 4 semanas (tempo necessário para desenvolvimento do epitélio), fragilidade, menor resistência à infecção e maior incidência de perda do enxerto. O sucesso do enxerto dependeria da presença de elementos dérmicos remanescentes ou transportados para o leito dessa ferida, sugerindo a necessidade de novas pesquisas sobre substitutivos cutâneos, visando reduzir a desvantagem observada e melhorando as propriedades desejadas para um substitutivo ideal (FEREIRA et al., 2011). Neste sentido, verifica-se que o sucesso dos substitutivos artificiais depende da biocompatibilidade, porosidade e propriedades mecânicas do material em relação à sua aplicação (TIAN et al., 2012), devendo se aproximar da estrutura original da pele (PREIMA et al., 2013). Na Figura 4 é apresentada uma classificação dos substitutivos cutâneos.

Figura 4. Classificação de substitutivos de pele proposta pelo Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



Fonte: Ferreira et al (2011).

A introdução da cirurgia de enxerto de pele por Reverdin, em 1871, tornou-se referência para o recobrimento de feridas cutâneas (CHERUTTI, 2012; HORCH et al., 2005). No início dos anos 80, Burkes e Yannas (BURKE et al., 1981) iniciaram estudos para a comercialização de um produto semelhante a pele humana (HODGKINSON; BAYAT, 2011a), sendo que, atualmente, há no mercado três tipos de produtos de enxerto de pele: os alosubstitutivos, são substitutivos com células ou tecidos da mesma espécie; os xenosubstitutivos, são aqueles constituídos de células ou tecidos de espécies diferentes; autosubstitutivos, são produzidos a partir de células e tecidos do próprio paciente (GROEBER et al., 2011; METCALFE; FERGUSON, 2008).

Os substitutivos podem ser acelulares, que possuem matriz de material sintético ou natural, com estrutura físico-química e que permitem a infiltração celular no material após implante (CHERUTTI, 2012). Também, existem os substitutivos celulares que podem ou não possuírem matriz, natural ou sintética, mas apresentam obrigatoriamente o cultivo de células epidérmicas, dérmicas ou ambas (DIECKMANN et al., 2010).

Um enxerto ideal deve possuir propriedades como suportar hipóxia, ampla disponibilidade, presença de componentes dérmico e epidérmicos, reologia comparável à da pele, custo/benefício adequado, facilidade de preparação, baixa antigenicidade, facilidade de armazenamento e resistência ao cisalhamento, para ampliar as chances de sucesso do implante (CASTRO FERREIRA et al., 2011). A adequação das propriedades químicas, físicas e estruturais dos substitutivos, pode minimizar os problemas de reações inflamatórias após o implante, quando controladas de maneira apropriadas (JIA et al., 2006).

Os substitutivos de pele, tanto epidérmicos quanto dérmicos, se apresentam como uma nova e promissora alternativa no tratamento das queimaduras na fase aguda e também para a remoção de sequelas. Estas estruturas procuram reconstituir a pele normal morfológica e funcionalmente. Entre os substitutivos de pele mais utilizados em todo o mundo, e em uso na prática clínica diária, está a matriz de regeneração dérmica (pele artificial - Integra™), desenvolvida para utilização em pacientes queimados e descrita por Yannas e Burke em 1981 (BURKE et al., 1981; CASTRO FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2009).

3.1 MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA

A membrana de biomaterial escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho é uma Matriz de Regeneração Dérmica (MRD),

disponível no mercado, da marca Integra™ a base de colágeno. A escolha baseou-se na necessidade de minimizar as variáveis de análise durante o trabalho, isolando o efeito do tratamento, uma vez que este tipo de material apresenta propriedades químicas e físicas bem definidas. Esta MRD requer cuidados especiais no seu armazenamento, uma vez que apresenta propensão à proliferação de fungos, sendo necessário armazenamento em local refrigerado com temperatura entre 2 e 30° C, imersa em uma solução fisiológica, alocada em ambiente estéril. Utilizando uma membrana com propriedades definidas, as análises pré e pós tratamento tornam-se mais confiáveis.

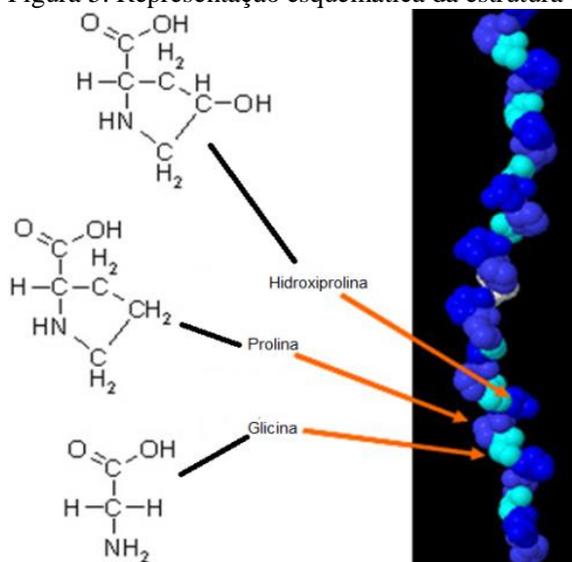
A matriz de regeneração dérmica é um dispositivo médico de substitutivo cutâneo acelular, sendo sua composição de origem natural e sintética bilaminar, composta por colágeno tipo I e glicosaminoglicanas. O colágeno é proveniente de tendões bovinos e a glicosaminoglicanas (condroitina 6 sulfatos) proveniente da cartilagem de tubarões e uma fina camada de silicone que controla a perda de fluidos e reduz a invasão bacteriana.

Utiliza-se o termo “colágeno” para denominar uma família de isoformas encontradas no tecido conjuntivo em mamíferos (WALSTRA, P; VAN VLIET, 2010), cerca de 25% das proteínas totais no ser humano é constituído de colágeno (ALBERTS et al., 2008). O colágeno para a fabricação da MRD é obtido do tendão flexor profundo de bovinos, classificado como Tipo C nas normas europeias, ou seja, para tal classificação o colágeno passa por um tratamento com hidróxido de sódio, para inativação dos patógenos.

A estrutura do colágeno tipo I, é apresentada esquematicamente na Figura 5, formada por três cadeias polipeptídicas, caracterizadas pela repetição de um tripleto Gly-X-Y, em que X geralmente é prolina (Pro) e Y hidroxiprolina, Gly glicina (GOISSIS, 2007).

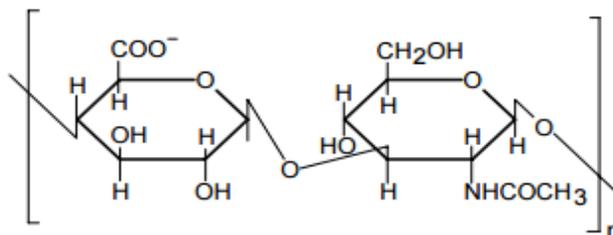
A glicosaminoglicanas GAG, representada na Figura 6, intervém em vários processos de proliferação, migração, adesão e agregação celular, que é importantes para o controle de processos inflamatórios, remodelamento e mineralização de tecidos (HOSHI et al., 1999). A matriz dérmica permite a invasão de fibroblastos e capilares advindos do hospedeiro, possibilitando a reparação de uma estrutura dermoequivalente, sendo que, gradualmente, o colágeno é reabsorvido e estrutura-se em uma nova matriz, em um período entre 3 e 6 semanas.

Figura 5. Representação esquemática da estrutura do colágeno.



Fonte: Hoshi et al (1999).

Figura 6. Representação esquemática da glicosaminoglicina GAG (condroitina-6-sulfato).



Fonte: Goissis (2007).

Depois disso, a lâmina de silicone pode ser retirada, sendo que a principal indicação é a cobertura de lesões de espessura totais ou parciais, profundas em grandes queimados que não apresentam áreas doadoras suficientes para utilização. Também, são utilizadas para a reconstrução de tecidos posterior a excisão de contraturas cicatriciais pós-queimaduras, úlceras crônicas e feridas traumáticas.

Dentre as vantagens do uso da MRD destacam-se: cobertura imediata de grandes áreas pós-escarectomias, imediata disponibilidade, redução da morbidade em áreas doadoras pelo uso de substitutivos mais

finos, redução da formação de cicatrizes hipertróficas, uma vez que reduz a resposta inflamatória, e melhores resultados funcionais nas articulações e extremidades (MAES, 2012). Oferece, ainda, melhores resultados pela formação de um tecido mais elástico, quando comparado ao uso exclusivo dos substitutivos de pele. As maiores desvantagens incluem: alto custo, necessidade de treinamento para seu correto emprego e alto risco de formação de hematoma, causando perda do componente, quando colocada imediatamente após o desbridamento (PRESTES et al., 2013).

Em uma lesão profunda ou queimadura a pele danificada é removida cirurgicamente para prevenir a infecção, após a remoção é usado o enxerto e moldado para o tamanho e forma exatos da área de pele a se substituir, sendo presa na sequência com suturas cirúrgicas ou grampos e, posteriormente, cobertas com curativos. A matriz de colágeno tem uma estrutura tridimensional, com uma porosidade variável de $50 \pm 20 \mu\text{m}$ (JONES; CURRIE; MARTIN, 2002), aproximando-se da estrutura da pele normal e é completamente bioabsorvida após 30 dias. Durante este período, ela serve de base para a proliferação de fibroblastos e células endoepiteliais, facilitando a neoformação dérmica com função semelhante à pele normal. O diâmetro dos poros é crucial para a incorporação de tais células (BURKE et al., 1981), proporcionando uma “seleção” de células reconstrutoras, de modo a permitir assim, uma homogeneidade na neoderme.

O substitutivo MRD da Integra™ é semeada com células do próprio paciente e epiderme temporária de silicone, o que o difere de outros materiais que não apresentam camadas autólogas em seu dispositivo. Essa camada de silicone é removida após a cicatrização da lesão (DIECKMANN et al., 2010). O colágeno possui características como biomaterial quando comparado com um polímero sintético. Destaca-se pela interação com tecidos biológicos, refletindo em reduzida resposta imunológica e toxicidade, habilidade de promover o crescimento celular e capacidade de reconstrução microfibrilar, propriedade encontrada em tecidos naturais (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

3.2 COLÁGENO

Presente em diversas estruturas biológicas animais, o colágeno é a proteína mais abundante no tecido conjuntivo (CHOI et al., 2013), possuindo elasticidade e apresentando fácil hidratação, suas fibras possuem baixo grau de extensibilidade, no entanto, são resistentes ao estresse de tração, sendo responsáveis pelos principais constituintes de estruturas, como ligamentos e tendões, que são submetidos a este tipo de

forças de tração (HWANG; YI; CHOI, 2011). A diferença de um tipo de colágeno para o outro ocorre por meio de suas cadeias de polipeptídios, propriedades físicas, morfologia, distribuições nos tecidos e funções (NIMNI et al., 1987).

3.2.1 Desnaturação

A desnaturação representa inúmeras alterações estruturais que causam efeitos diversos sobre as proteínas. Trata-se de um processo quimicamente complexo, o que torna difícil a descrição dos eventos de interação entre os agentes desnaturantes e as proteínas. Tais interações são responsáveis pelas alterações conformacionais e podem ou não alterar a atividade biológica da proteína (SMITH et al., 1985).

Cada proteína possui uma forma “normal”, denominada conformação nativa, sendo que esta conformação define a sua função biológica. A desnaturação ou desorganização desta conformação nativa, quando ocorre, acontece quebra de ligações fracas não covalentes da estrutura polipeptídicas, ao quebrar estas ligações as estruturas secundárias e terciárias são perdidas (UCKO, 1992). O processo de desnaturação geralmente acontece quando as proteínas são expostas à temperaturas de 50 a 60° C por um período variado de tempo, sendo que esta temperatura e tempo varia de acordo com o tipo da proteína, quanto maior a quantidade de prolina na estrutura, maior a estabilidade térmica do colágeno. As moléculas de proteínas de cadeia polipeptídicas globulares apresentam a característica de enovelamento na sua estrutura e a desnaturação consiste no desenovelamento destas estruturas (NELSON; COX, 2013).

3.2.2 Desnaturação do Colágeno

Após ser alcançada a ativação crítica, por um processo endotérmico o colágeno sofre desnaturação (MILES; GHELASHVILI, 1999), processo no qual se desenrola mudando sua entropia conformacional nativa, comportamento este, que pode ser observado por meio de análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Neste tipo de análise pode-se associar a resposta do material ao aquecimento, sendo que um aquecimento moderado pode resultar no desenovelamento da molécula (NELSON; COX, 2013), por outro lado, o aquecimento severo pode resultar em transformações irreversíveis, enquanto que o tempo de exposição à temperaturas elevadas depende de cada molécula,

não sendo facilmente determinado (PRESTES et al., 2013). Estas transformações ocorrem principalmente pela quebra de ligações de hidrogênio ao longo da estrutura de tripla hélice na cadeia polimérica (WRIGHT; HUMPHREY, 2002).

4 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

4.1 PROPRIEDADE DE SUPERFÍCIE DE MATERIAIS POLIMÉRICOS

A caracterização de materiais poliméricos envolve a avaliação de propriedades como composição química, estrutura das cadeias poliméricas, morfologia, cristalinidade e topografia (AGGARWAL; BAIJAL; MENDIRATTA, 1980). A morfologia e topografia de uma mesma amostra polimérica pode apresentar variações em suas propriedades, (MARTINS, 2009) como, por exemplo, um mesmo polímero apresentar diferentes níveis de hidrofiliicidade, devido aos grupos funcionais polares e apolares, presentes ao longo da cadeia carbônica polimérica (AGGARWAL; BAIJAL; MENDIRATTA, 1980), propriedades como: resistência mecânica, resistência térmica, estabilidade frente à substâncias químicas, resistência elétrica, permeabilidade à gases etc., irão determinar como o polímero vai ser utilizado (PIATTI et al., 2005). A mobilidade da cadeia carbônica do polímero define as suas características físicas, tais como dureza, fragilidade, tenacidade, fluidez, elastômero e é diretamente proporcional a temperatura (CANEVAROLO JR., 2006).

4.2 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE POLIMÉRICA

A necessidade de pré-tratamento em superfícies poliméricas, para determinadas aplicações, é de amplo conhecimento e se deve, principalmente, a dois fatores: a relativa inércia química e a baixa energia de superfície dos polímeros. Em geral, ao se modificar superficialmente um polímero, em uma profundidade de centenas de angstroms, por exemplo, pode-se manter o volume do polímero tratado com as características iniciais, sendo este, um atrativo para a utilização de tais tratamentos sobre estes materiais (LAPORTE, 1997). Dentre as várias formas de tratamento de superfícies poliméricas empregadas pode-se citar: plasma de diferentes atmosferas, enxerto iniciado por luz e radiação,

ataque químico, oxidação controlada, transformação radicalar iniciada por peróxido e descarga corona.

Em geral, tais tratamentos visam introduzir e/ou produzir grupos funcionais polares, com o objetivo de aumentar a hidrofiliçidade do material (MACÊDO et al., 2012).

Em dispositivos médicos, a técnica de modificação de superfície mais utilizada para melhorar a hidrofiliçidade é o plasma. Na literatura também são citadas como técnicas viáveis para tratamento de polímeros processos que utilizam radiação ultravioleta (UV), ataque químico, entre outros (LAPORTE, 1997).

O UV ainda pode ser subdividido em três regiões descritas como UV-A, UV-B e UV-C. O UV-A, com comprimento de onda de 400-320 nm, é o menos energético, no entanto, também pode causar problemas como envelhecimento da pele quando há exposição por longo período. Ele é utilizado no tratamento fototerápico para icterícia neonatal, assim como, hiperbilirrubinemia. O UV-B está na faixa de energia intermediária, com comprimento de onda de 320-280 nm, responsável por mutações observadas no câncer de pele e pode causar modificações no DNA em humanos. O UV-C é o mais energético e está na faixa de 280-200 nm, é comumente produzido por fontes artificiais, visto que, é totalmente absorvido pela atmosfera (BELMONTE, 2015).

Estudos com filmes de polissulfona (PSU), polihidróxibutirato (PHB) e poliuretana (PU) foram caracterizados e funcionalizados com radiação UV, em presença de uma atmosfera reativa (O_2), para melhorar a sua molhabilidade, adesão e crescimento celular (KESSLER, 2014). Já os tratamentos químicos têm sido utilizados na indústria para tratar objetos com grande volume, substituindo tratamentos que utilizam chama ou descarga de corona. O ataque de reagentes químicos à superfície de polímeros pode conferir rugosidade alterando características de molhabilidade, um exemplo é o tratamento de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como agente oxidante na superfície de polietileno de ultra alto peso molecular PEUAPM, no qual, em estudo realizado, verificou-se o aumento da energia superficial do polímero e a mudança na sua hidrofiliçidade. O tratamento químico modificou a superfície do PEUAPM tornando-o hidrofílico e, conseqüentemente, melhorando a interação com o meio biológico (CARDOSO et al., 2013).

4.3 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIES POR PLASMA

O termo plasma foi introduzido em 1927 por Irving Langmuir (ONG et al., 1999) no seu estudo sobre condutividade elétrica dos gases, e pode ser definido como uma descarga elétrica em um gás (ROSSNAGEL; CUOMO; WESTWOOD, 1990), formado por íons positivos, elétrons e átomos neutros (CHAPMAN, 1980). O plasma gasoso é obtido de diversas maneiras, sendo as mais comuns a descarga por rádio frequência (RF), descarga luminescente de baixa frequência, descarga de barreira dielétrica (DBDs), descarga de micro-ondas e descargas de corrente contínua (JACOBS et al., 2012; DEMINA et al., 2012). A interação do plasma com a superfície a ser tratada pode ser basicamente de duas maneiras: por quebra de ligações químicas na superfície ou por polimerização induzida (JACOBS et al., 2012; KALIA et al., 2013).

O tratamento por plasma em diferentes superfícies vem sendo amplamente relatado na literatura, sendo, inclusive, amplamente empregado na área de biomateriais (VON WOEDTKE et al., 2013). Além de significativa melhora das propriedades do biomaterial, uma grande vantagem do método é que apenas a superfície é alterada, mantendo a maior parte do material inalterado. Pode ainda ser considerado um processo limpo, com pouca geração de resíduos de qualquer espécie, em relação a outros tipos de tratamento de superfície (CHICHTI et al., 2013).

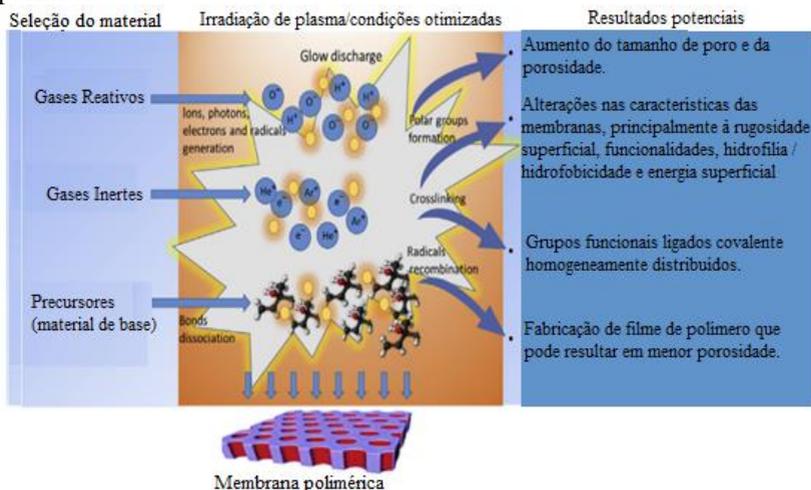
O tipo de plasma de maior utilização na indústria é o de descarga luminescente (*glow discharge*), na qual ocorrem inúmeras colisões entre as partículas presentes na descarga, tais efeitos incluem ionização, excitação, dissociação e recombinação (SMITH, 1995), sendo que a colisão mais importante para sustentação de uma descarga luminescente é a ionização por elétrons. O grau de ionização dos gases pode variar de parcialmente a totalmente ionizado, sendo responsável pela criação de novos elétrons e íons, que são acelerados pelo campo elétrico (SOETHE, 2004).

A eficácia das reações por plasma está relacionada com a manutenção do grau de ionização e sustentação da energia. O substrato tratado por plasma pode ser atingido por espécies ionizadas, formando novos grupos funcionais. Este fenômeno ocorre pela quebra de ligações químicas, podendo haver substituição atômica ou recombinação entre os átomos da molécula. Desta forma, grupos funcionais podem ser inseridos ao substrato por meio de um tratamento de superfície por plasma. A Figura 7 apresenta um esquema de interação genérica do plasma com a membrana polimérica (JORDÁ-VILAPLANA et al., 2014).

Propriedades diferentes do material inicialmente tratado podem ser alteradas na superfície, dentre as quais se podem destacar: molhabilidade,

rugosidade e aumento da energia de superfície. (JACOBS et al., 2012; SLEPICKA, 2013).

Figura 7. Esquema ilustrativo da interação plasma e membrana polimérica.



Fonte: Adaptado de Al-Jumaili et al (2019).

Estudos mostram que o tratamento por plasma em Poliamida 6 (PA6) hidrofóbica, permite ampliar as possibilidades de uso da PA6 como polímero de engenharia, quando a estabilidade dimensional é uma propriedade importante. A PA6 contém grupos polares em sua estrutura molecular (C=O) e, por isso, provavelmente, após a fragmentação e, conseqüente mobilidade, não apenas os grupos polares incorporados em função do tratamento a plasma, mas também aqueles já presentes na PA6 sem tratamento, giram com o passar do tempo, em direção ao interior do material, o que explicaria com o envelhecimento, o fato do ângulo de contato do material tratado ultrapassar o valor do ângulo de contato da PA6 sem tratamento, transformando a sua superfície de hidrofóbica em hidrofílica (GARCIA, 2018).

5 INTERAÇÃO DO PLASMA COM A SUPERFÍCIE DE POLÍMEROS

Polímeros, em sua maioria, apresentam características apolares, o que limita a interação dos mesmos com líquidos polares e que, por sua vez, limita o seu uso como dispositivos médicos invasivos ou implantados, uma vez que, a maioria dos tecidos biológicos internos apresenta caráter hidrofílico (alta afinidade por água) (SALMORIA et al., 2013). Diversas técnicas de modificação de superfície têm sido empregadas de forma a alterar e ampliar a utilização destes materiais (SALMORIA et al., 2013).

O tratamento por plasma pode modificar a natureza da superfície de um polímero anteriormente hidrofóbico, transformando-o em um material com características hidrofílicas, este produz mudanças físico-químicas na superfície do polímero, as quais podem alterar a rugosidade que, por sua vez, pode mudar a molhabilidade da superfície.

Estudos realizados por Mezaroba, em 2018, mostram que a interação de plasmas, formados pela mistura $N_2 + O_2$ sobre a superfície do polímero Polietileno de Alta Densidade (PEAD), se dá, principalmente, por reações de espécies quimicamente ativas do plasma com as moléculas do polímero. Também, ocorre a formação de grupos hidroxilas e ligações C-N e C-O, que aumentam a polaridade na superfície. Isso provoca um significativo aumento na molhabilidade da superfície, resultando em uma diminuição do ângulo de contato de uma gota de água deionizada de, aproximadamente, 85° para 50° (MEZAROBA et al., 2018). De acordo com a literatura, há vasta utilização de plasma frio, com temperaturas inferiores a $100^\circ C$, para o tratamento de superfícies poliméricas, devido, principalmente, a baixa estabilidade térmica deste tipo de material em temperaturas elevadas. (JACOBS et al., 2012; ROTH, 2001).

5.1 INTERAÇÃO RADIAÇÃO-MATÉRIA

A energia de um fóton no plasma pode variar de acordo com seu comprimento de onda, esta energia na região do infravermelho, luz visível e radiação ultravioleta pode: aquecer as paredes do reator e da superfície do polímero, quebrar ligações moleculares e excitar átomos, romper grandes moléculas de cadeias poliméricas e ligações moleculares (CHAPMAN, 1980; ROTH, 2001), a quebra de ligações e produção de sítios ativos é um dos resultados esperados para este estudo.

Os fótons do espectro visível e do ultravioleta podem produzir radicais livres na superfície por: dissociação, produção de átomos ou molécula pequena fragmentada na superfície, rompimento, quebra da cadeia polimérica em duas ou mais cadeias menores, ramificações, produção de cadeia lateral na cadeia polimérica, ligações cruzadas e ligações entre moléculas adjacentes. Além destes efeitos, os fótons podem também remover elétrons da superfície formando sítios ativos (ROTH, 2001).

5.2 PARTÍCULAS CARREGADAS

Os íons presentes no plasma podem ser acelerados por um campo eletromagnético. Os elétrons alcançarão a superfície em número igual ao fluxo de íons, no caso de uma superfície eletricamente neutra. Os Íons moleculares podem ser produzidos e induzidos de tal maneira que, a carga da molécula ionizada reaja com a superfície do polímero (ROTH, 2001).

Em termos gerais, o tratamento com plasma pode ser utilizado direta ou indiretamente, para adaptar superfícies poliméricas através da criação de grupos funcionais. O tratamento direto envolve o uso de gases reativos como, por exemplo, NH_3 e O_2 , que são conhecidos por produzir funcionalidades desejáveis como aminas, COOH e radicais livres. O tratamento indireto geralmente se refere ao enxerto de polímeros, o que resulta na introdução de funcionalidades desejadas na superfície. Em ambos os tipos de tratamento, o processamento dos parâmetros, tais como tempo de tratamento, pressão, potência, gás de processamento, etc., e a natureza da superfície irradiada, determinarão a modificação resultante, que potencialmente pode ser tanto a ablação, substituição ou deposição de filme (AL-JUMAILI et al., 2019).

5.3 ESPÉCIES NEUTRAS

Colisões entre elétrons e espécies neutras no plasma podem gerar espécies neutras energéticas, capazes de interagir fortemente com a superfície. Os fragmentos podem formar componentes complexos, ramificações e ligações cruzadas na superfície polimérica (CHAPMAN, 1980), as colisões dos elétrons com as espécies neutras desempenham um papel importante. A descrição desse tipo de plasma, sobretudo, no que diz respeito à propagação de ondas, mesmo em um gás fracamente ionizado, desempenham um papel crucial na descrição da dissipação de energia, da

condutividade, da distribuição de energia dos elétrons e das propriedades químicas (RIDENTI, 2014).

5.4 INTERAÇÃO DO SUBSTRATO POLIMÉRICO COM PLASMA

O plasma, ao interagir com a superfície polimérica, atua formando sítios ativos. Na sequência, os radicais livres formados recombinam-se, enquanto que, os radicais livres estáveis permanecem como radicais, aumentando a energia da superfície polimérica (CANEVAROLO JR., 2006; MEZARROBA et al., 2018). As moléculas poliméricas se rompem, não somente por meio do bombardeio dos íons, mas também, pela interação química de radicais livres, depois da formação destes, denominando rompimento lento de cadeias poliméricas (GEHLEN et al., 1998).

A química e a topografia da superfície podem ser alteradas pelo tratamento com plasma e este tratamento não afeta as propriedades dos polímeros (KALE; DESAIA, 2011). A mudança na química da superfície ocorre quando os íons, radicais, elétrons metaestáveis excitados e energéticos são bombardeados na superfície polimérica. O plasma pode trazer dois tipos de interações com a superfície (KALIA et al., 2013), (1) cisão da cadeia na superfície que resulta em corrosão, limpeza ou ativação da superfície, que é obtida usando gases não polimerizantes como He, O, Ar e N, e (2) polimerização ou enxerto induzido por plasma, o qual é realizado utilizando vários gases de polimerização e precursores como fluorocarbonetos, hidrocarbonetos e monômeros contendo silício. Devido aos vários potenciais e propriedades únicas do plasma, o tratamento por plasma é utilizado com sucesso em diferentes áreas (FRIDMAN, 2008; KALE; DESAIA, 2011; KALIA et al., 2013).

5.5 FUNCIONALIZAÇÃO DE POLÍMEROS

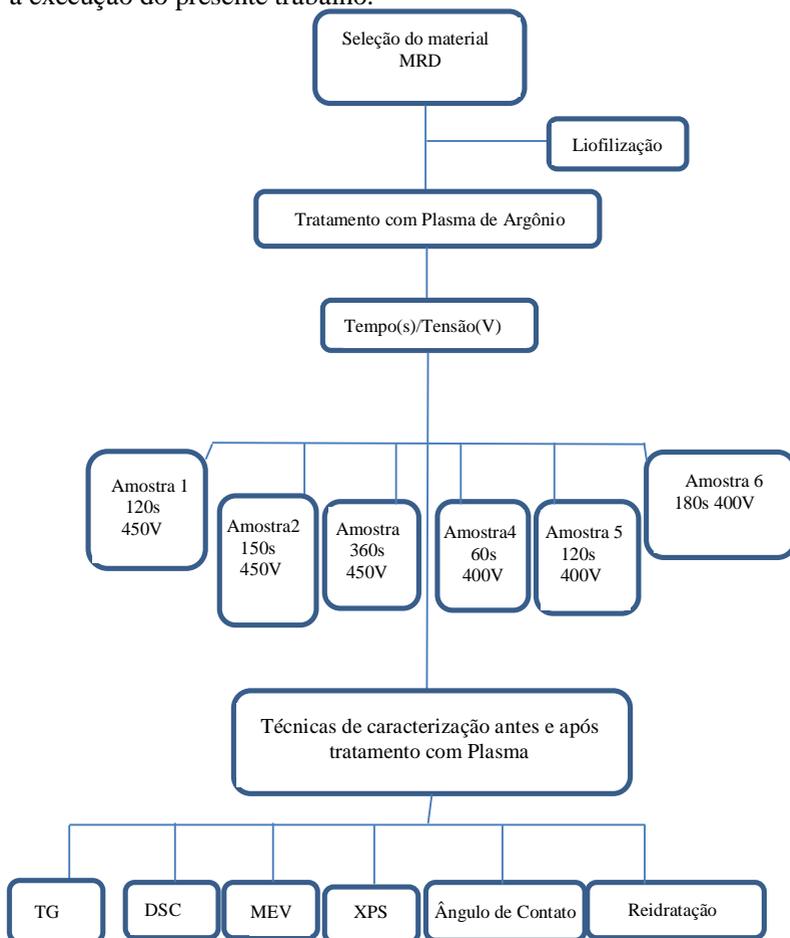
Ao interagir com o polímero, o plasma gera grupos funcionais hidrofílicos, que podem ser introduzidos na superfície do material. O oxigênio, quando introduzido no material durante o tratamento por plasma, gera vários grupos funcionais oxigenados, tais como: $-C-O-$, $-C=O$, $-COOH$, $-C-O-O-$, $-O-COO$ na superfície do polímero, aumentando a molhabilidade. A polimerização a plasma, por descarga em pressão atmosférica, pode ser usada para modificar as propriedades de superfície do pó de madeira, bem como da fibra vegetal (BOGAERTS et al., 2002).

Os usos industriais dos plasmas, de baixa pressão e pressão atmosférica, aumentaram nas indústrias para os fins de pré-tratamento. Os Jatos de Plasma com Pressão Atmosférica (APPJ) são amplamente utilizados, porque são fáceis de integrar em linhas de produção existentes e podem tratar seletivamente partes específicas de um substrato (TENDERO et al., 2006). As aplicações de APPJs estendem-se ao tratamento de superfícies sensíveis à temperatura, tais como, materiais biológicos, por exemplo, células vivas em plasma sanguíneo, tecidos e interações bacterianas, e essas interações desempenham papel importante no cultivo e no tratamento de doenças (KALE; DESAIA, 2011).

6 METODOLOGIA DO TRABALHO

No fluxograma da Figura 8 é apresentado, de forma esquemática, uma síntese da metodologia a ser empregada para a realização do presente trabalho, demonstrando as etapas do mesmo, bem como as técnicas de caracterização utilizadas. As etapas apresentadas na figura são detalhadas na seqüência.

Figura 8. Fluxograma evidenciando a metodologia a ser empregada para a execução do presente trabalho.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

6.1 SELEÇÃO DO MATERIAL

Para determinarmos o material deste estudo foi levado em consideração a minimização de variáveis, a membrana analisada é produzida em escala industrial e, portanto, sua composição já está pré determinada, auxiliando assim, a redução desta variável no estudo. A matriz de regeneração dérmica da Integra™, doada pela empresa Promedon, é um dispositivo médico usado como enxerto cutâneo acelular e sua composição é de origem natural e sintética bilaminar.

A figura 9 apresenta o material que é composto por colágeno tipo I e glicosaminoglicanas. O colágeno é proveniente de tendões bovinos e a glicosaminoglicanas (condroitina 6 sulfato) proveniente da cartilagem de tubarões e uma fina camada de silicone, que controla a perda de fluidos e reduz a invasão bacteriana.

Figura 9. MRD (a) embalagem de armazenamento, (b) MRD evidenciando a lamina de silicone e (c) MRD pronta para caracterização e tratamento evidenciando a lamina de GAG e Sulfato de condroitina.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

6.2 LIOFILIZAÇÃO

O processo de liofilização consiste na retirada de líquido da amostra mantendo a sua estrutura, sendo previamente congelada e então, a quantidade de solvente (geralmente água) é eliminada. Inicialmente, este processo ocorre por sublimação e, posteriormente, por dessorção, para valores tais que impedem atividades biológicas e reações químicas. O material é levado a passar por processos de congelamento inicial, secagem primária e secagem secundária (MARQUES, 2008). O termo “liófilo” significa amigo do solvente, o que define com fidelidade as características dos produtos liofilizados: altamente higroscópicos e de fácil dissolução na água.

No presente trabalho, o processo de liofilização foi realizado nas amostras de MRD, no Laboratório de Polímeros e Materiais Compósitos da UFSC Joinville, conforme apresenta a Figura 10.

Figura 10. Liofilizador em funcionamento com as amostras de MRD, e amostras de MRD após a liofilização.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Este processo é importante para que se mantenham as propriedades, visando o não colapso da estrutura da membrana e reduzindo o número de variáveis durante o tratamento por plasma, pois para efetivo tratamento, e posterior caracterização, se faz necessário que o material esteja seco. As amostras foram liofilizadas utilizando um liofilizador L101 da marca LioTop. As amostras foram cortadas na medida de aproximadamente 2 cm², pesadas em balança analítica e, posteriormente, liofilizadas. Para o processo de liofilização, as amostras foram congeladas em -30° C e secas em vácuo em -50° C, pelo tempo mínimo de 4 horas. Ao serem retiradas do liofilizador, as amostras foram novamente pesadas, na sequência, retirou-se a lâmina de silicone, aferiu-se a massa da lâmina, para descontar da massa total de MRD.

6.3 TRATAMENTO COM PLASMA DE ARGÔNIO

Membranas de MRD foram tratadas por plasma de argônio, utilizando diferentes tempos de tratamento, mostrados na Tabela 1. Os tratamentos foram realizados no Laboratório de Plasma, Filmes e Superfícies do Departamento de Física da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CCT).

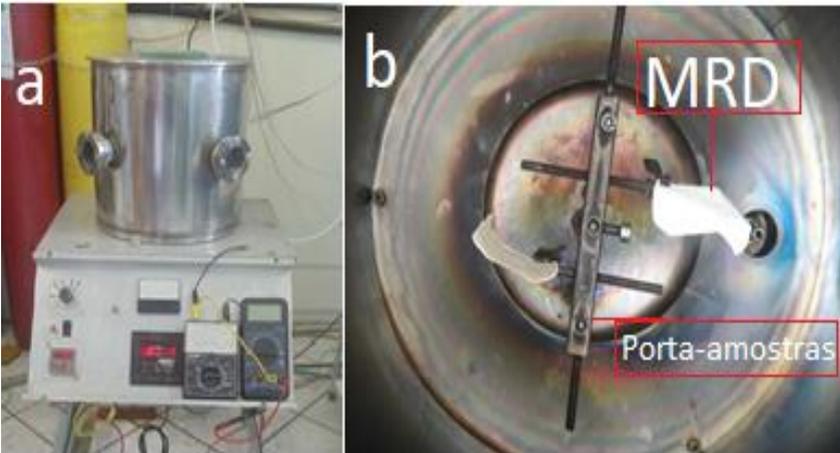
Tabela 1. Parâmetros do tratamento com plasma de argônio.

Amostra	Fluxo de Ar Y=1,5x-1,5	Pressão (torr)	Tensão (V)	Corrente Elétrica (A)	Tempo (s)
1	50	3,3	450	0,3	120
2	50	3,5	450	0,32	150
3	50	3,5	450	0,35	60
4	20,5	9	400	0,27	60
5	19	10	400	0,27	120
6	21,5	10,1	400	0,27	180

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Para o tratamento por plasma, foi escolhido o gás argônio, com a finalidade de reduzir a interação com a MRD, pois o objetivo do tratamento é criar radicais livres para ampliar a adesão do biomaterial. A ilustração do equipamento, utilizado para realização do tratamento por plasma, pode ser observada na Figura 11 (a) e Figura 11 (b), que apresenta a parte interna do reator em detalhe do porta-amostra, no qual as membranas estão fixadas.

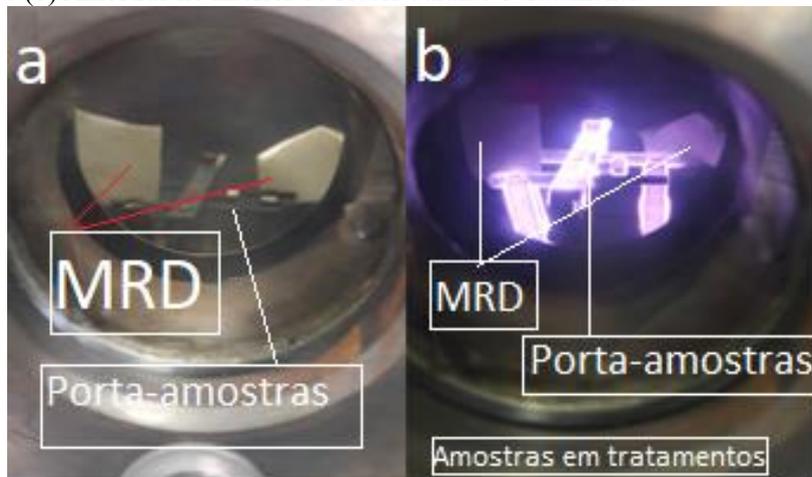
Figura 11. (a) Reator de plasma utilizado para o tratamento das MRDs e (b) Parte interna do reator, em detalhe o porta amostra com a MRD fixada.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

As amostras foram tratadas para duas configurações experimentais diferentes, as amostras denominadas 1, 2 e 3 foram tratadas por 120, 150 e 60 s, respectivamente, com plasma de argônio composto por 50 sccm de fluxo de massa e 3,4 torr de pressão de trabalho, gerados por 450 V DC e corrente de 0,32 A. As amostras denominadas 3, 4 e 6 foram tratadas por 60, 120 e 180s, respectivamente, com plasma de argônio composto por fluxo de massa de 20 sccm e pressão de trabalho de 9,7 torr, geradas por 400 V DC e corrente de 0,27 A. Na figura 12 (a) pode se observar as amostras de MRD, acomodadas no interior do reator, antes do início do tratamento. Na Figura 12 (b) observa-se as amostras de MRD durante o tratamento por plasma de argônio.

Figura 12. (a) Amostras de MRD no interior do reator, antes do tratamento e (b) Amostras no interior do reator durante o tratamento.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

6.4 ENSAIOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para a caracterização do material, antes do tratamento por plasma, realizou-se uma série de análises, as quais possibilitaram avaliar o comportamento térmico do material, visando obter a temperatura limite para tratamento das amostras. Além disso, análises morfológicas e de caracterização superficial foram empregadas, antes e após o tratamento por plasma, de forma a avaliar a influência dos parâmetros de tratamento nas amostras.

6.5 ESPECTROMETRIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (XPS)

A técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) foi utilizada para determinar a composição química superficial das amostras tratadas e não tratadas, com a finalidade de analisar possíveis alterações na composição da MRD, dando ênfase ao pico característico de O_2 , com o qual é possível avaliar a hidrofiliicidade da amostra, pois picos de O_2 , com uma banda definida é característico de materiais hidrofílicos. Nesta técnica, um material metálico, como Mg ou Al, é bombardeado por um feixe de elétrons de alta energia que, em

consequência, gera raios-X com energias de 1.253,6 e 1.486,6 eV, respectivamente. Ambos os valores representam a transição $K\alpha$. A radiação é então incidida sobre uma amostra de interesse, ejetando fotoelétrons do material. Como a energia do feixe é relativamente alta, há uma penetração da ordem de 1 a 10 micrometros no sólido e o feixe interage, principalmente, com os chamados elétrons do core (aqueles mais próximos do núcleo atômico).

Em átomos de carbono e oxigênio, por exemplo, os elétrons são ejetados dos orbitais 1s, fenômeno conhecido como "efeito fotoelétrico", estes elétrons são então coletados por um detector e sua energia cinética é medida. Pela conservação de energia, é determinada a sua energia de ligação no material e, assim, a composição química (DAMIANI; PETER; TATSCH, 2000). As caracterizações foram realizadas em um Thermo Scientific K-Alpha com a linha Al $K\alpha$ e os espectros foram deconvoluídos com a soma de perfis gaussianos (80%) e lorentzianos (20%).

6.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

O intuito desta técnica é estudar o comportamento térmico da MRD. A técnica de DSC permite avaliar os efeitos do calor sobre as amostras e associá-los com possíveis alterações físicas e químicas (IONASHIRO, 2005), desta forma, é possível observar as transições que envolvem entropia em polímeros. A análise por DSC será utilizada para determinação da transição vítrea (T_g) e para avaliar a influência do plasma sobre o colágeno. O equipamento utilizado para a realização deste ensaio é da marca TA Instruments Q20, do Laboratório de Materiais da Universidade Sociedade Educacional de Santa Catarina UNISOCIESC. As amostras foram seladas em panela de alumínio e aquecidas em atmosfera inerte de nitrogênio de 25° C a 200°C com uma taxa de aquecimento de 10° C.min⁻¹.

6.7 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG)

Para avaliar o grau de estabilidade térmica da membrana foi realizada a análise termogravimétrica, a qual possibilitou identificar a temperatura inicial de perda de massa e a máxima de degradação. O equipamento utilizado é da marca TA *Instruments* modelo Q50, do laboratório de materiais da UNISOCIESC, com taxa de aquecimento de 10° C.min⁻¹, em atmosfera de nitrogênio, com temperatura de 20° C a 600° C.

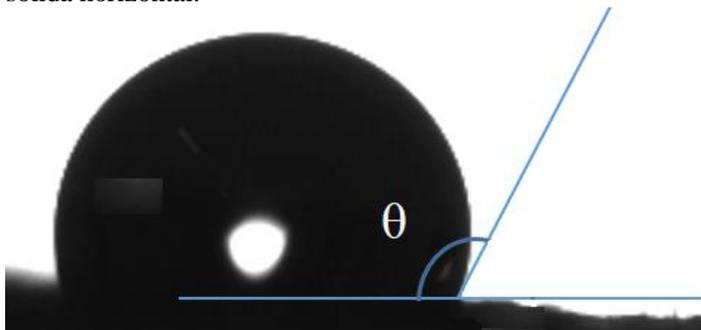
6.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Análises de MEV foram utilizadas nas amostras de MRD, antes e após o tratamento por plasma, com o objetivo de avaliar possíveis mudanças morfológicas. A análise foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis. O equipamento é um microscópio de varredura convencional, com filamento de tungstênio, do modelo JSM-6390LV da marca JEOL. As análises foram realizadas com tensão de aceleração de 0,5 a 30 kV e magnificação de 25 a 2.500 vezes. As resoluções em alta e baixa tensão foram fixadas em 3 e 4 nm, respectivamente, e todas as imagens foram obtidas em baixo vácuo.

6.9 ANÁLISE DE ÂNGULO DE CONTATO

Esta análise é frequentemente empregada de forma a avaliar a molhabilidade de uma superfície, sendo que um baixo valor no ângulo de contato indica que a superfície molha bem, ou seja, é hidrofílico, assim como, um alto valor indica um pior molhamento, caracterizando material hidrofóbico (KONTAKIOTIS EG, TZANETAKIS GN, 2007). A molhabilidade é definida como a tendência de um fluido aderir ou espalhar sobre uma superfície sólida. O ângulo de contato é definido como o ângulo formado entre a superfície sólida e a tangente da gota do líquido em contato com a superfície, representado esquematicamente na Figura 13.

Figura 13. Ângulo de contato entre uma gota líquida e uma superfície sólida horizontal.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Quanto menor o ângulo que uma gota de água forma com a superfície, mais ela molha. Assim, superfícies que formam ângulo com valores próximo a 0° apresentam excelente molhabilidade e são denominadas hidrofílicas. Por outro lado, ângulos de contato superiores a 90° são altamente repelentes ao líquido, sendo denominadas hidrofóbicas (BANERJEE; DIONYSIOU; PILLAI, 2015). Por meio destas análises, busca-se verificar a ocorrência de alterações nos valores do ângulo obtido pelas amostras, antes e após o tratamento por plasma, sendo que para este estudo, a alteração não é desejada, pois a MRD possui uma estrutura tridimensional porosa e hidrofílica.

6.10 REIDRATAÇÃO

A estrutura da MRD é porosa, favorecendo que as amostras apresentem característica de hidrofiliabilidade. A técnica da reidratação tem como objetivo verificar se esta propriedade foram ou não afetadas após o processo de liofilização e, também, após o tratamento por plasma. A análise foi realizada no Laboratório de Polímeros e Materiais Compósitos na Universidade Federal de Santa Catarina, em Joinville. A reidratação ocorreu em duas etapas: na primeira etapa as amostras ficaram imersas em soro fisiológico por 24 horas, após este tempo, foram pesadas e liofilizadas; na segunda etapa, as amostra liofilizadas foram imersas em soro fisiológico por 24h e, posteriormente, pesadas.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

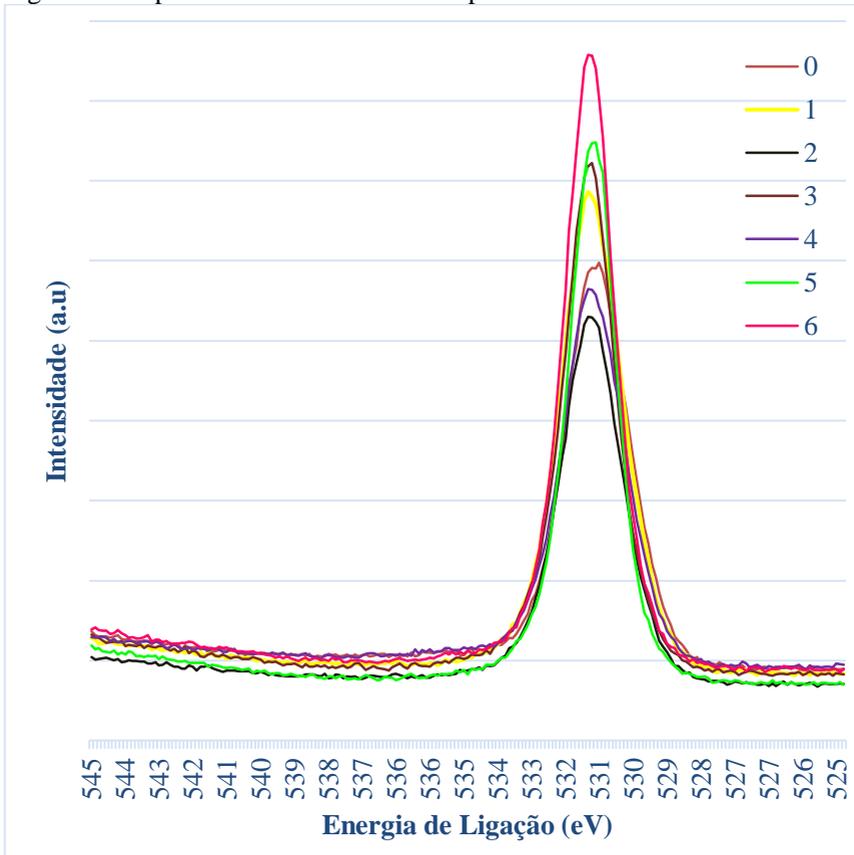
7.1 ESPECTROMETRIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (XPS)

Nesta seção serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no presente estudo.

A análise de XPS foi realizada com o objetivo de examinar as possíveis alterações na estrutura e na composição química das amostras de MRD após o tratamento por plasma de argônio. A concentração atômica de oxigênio (O) antes e após o tratamento da superfície pode ser observada na Figura 14. De acordo com a figura é possível observar a presença apenas do orbital O1s. Em cada espectro há apenas um pico simétrico em uma posição média de 531,79 eV, valor médio dos 7 espectros. A Largura à meia altura *full width at half maximum* FWHM é praticamente a mesma para todos, valor médio de 1,81 eV. Este resultado indica que não houve mudança na estrutura química das amostras em função do tempo e das condições de tratamento. O pico na energia de 531,7 eV ocorre devido a estrutura química da MRD apresentar o elemento oxigênio em sua cadeia polimérica, fenômeno este observado também nos estudos de Vilaplana et al. (2014), verificou-se que os tratamentos de plasma no ar, hélio e argônio resultam em superfícies com uma composição química similar: principalmente as funcionalidades de contenção de oxigênio são incorporadas após o tratamento com plasma (JACOBS et al., 2013; JORDÁ-VILAPLANA et al., 2014).

Comparando o espectro da amostra não tratada com os demais espectros das amostras da MRD, tratadas por plasma de argônio, verifica-se que a intensidade dos picos de O (1s) apresentaram variações em termos de intensidade. Neste comportamento é possível visualizar que a intensidade dos picos de O (1s) diminuíram, o que também indica uma menor concentração de grupos contendo oxigênio, tal afirmação está de acordo com os relatos de Demina et al. (2012), que estudou membranas poliméricas, tratadas por plasma de argônio e enxertado com *cysteamine*, determinando a concentração de elementos na superfície do polímero por XPS, com eixos detectores em diferentes ângulos (0° e 81°). Em suas análises, observou que a concentração de oxigênio foi maior para as amostras analisadas sob o ângulo de 0°, o qual permite atingir em torno de 6 até 8 camadas atômicas. A partir destes resultados, supõe-se que o tratamento por plasma não alterou a composição da MRD.

Figura 14. Espectros XPS do orbital O1s para amostras 0-6.

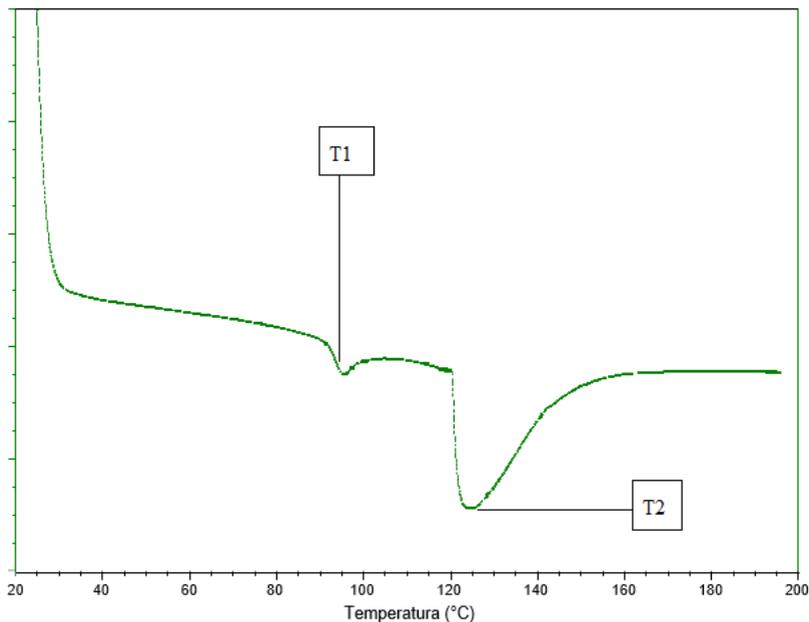


Fonte: Elaborada pela autora (2018).

7.2 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Foi realizado um ensaio piloto de DSC com a amostra não liofilizada e não tratada por plasma, cujo resultado pode ser observado na Figura 15, neste ensaio pode – se avaliar a influência da água presente na amostra, sendo que o resultado deste teste piloto fez com que fosse necessário o uso de um ensaio de liofilização para eliminar a água presente no material e assim reduzir mais uma variável no estudo, permitindo que os resultados futuros sejam mais precisos.

Figura 15. Análise de DSC da MRD não tratada e não liofilizada de MRD.

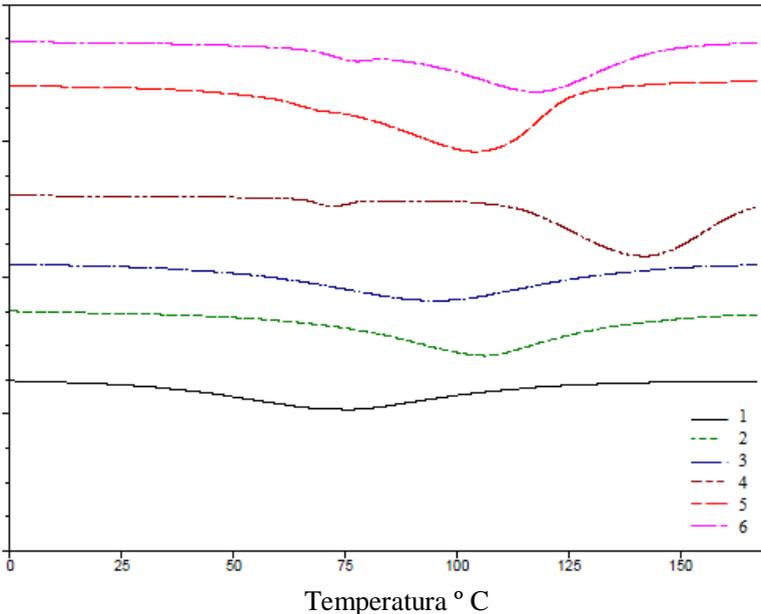


Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Analisando o gráfico da análise de DSC, apresentado na Figura 15, pode-se verificar a presença de dois picos: T₁ no qual ocorreu a desnaturação do colágeno entre 80° e 100° C e T₂ com temperatura entre 120° e 130° C referente a hidrólise do colágeno. Entretanto, o resultado foi inconclusivo, divergindo da literatura. Rochdi et al. (2000) mencionaram temperaturas de desnaturação de colágeno, da camada de reveste o musculo bovino (epimísio) e colágeno intramuscular, entre 58,6° e 61,6° C e entalpia (J/g de amostra seca) de $45,6 \pm 0,2$ a $78,1 \pm 1,2$ (ROCHDI; FOUCAT; RENO, 2000). A temperatura de desnaturação do colágeno da pele de bovinos está entre 60° e 65° C (LI et al., 2009). Outros estudos mencionaram temperaturas de desnaturação do colágeno, variando entre 30° e 60° C, dependendo da origem e tipo de colágeno testado, sendo evidenciadas menores temperaturas para os colágenos de pescados e maiores para os de origem bovina (LIU et al., 2014a; SINTHUSAMRAN; BENJAKUL; KISHIMURA, 2013). Esta divergência se deve, possivelmente, ao fato da água presente na amostra

atuar sobre o polímero como um plastificante, alterando sua temperatura de desnaturação, fenômeno indesejado para a finalidade deste estudo (CANEVAROLO JR., 2006). Desta forma, se fez necessário a realização de novas análises, apresentadas na Figura 16, com as amostras liofilizadas e sem a camada de silicone da MRD.

Figura 16. Análise de DSC das amostras de 1 a 6 após o tratamento por plasma de argônio.



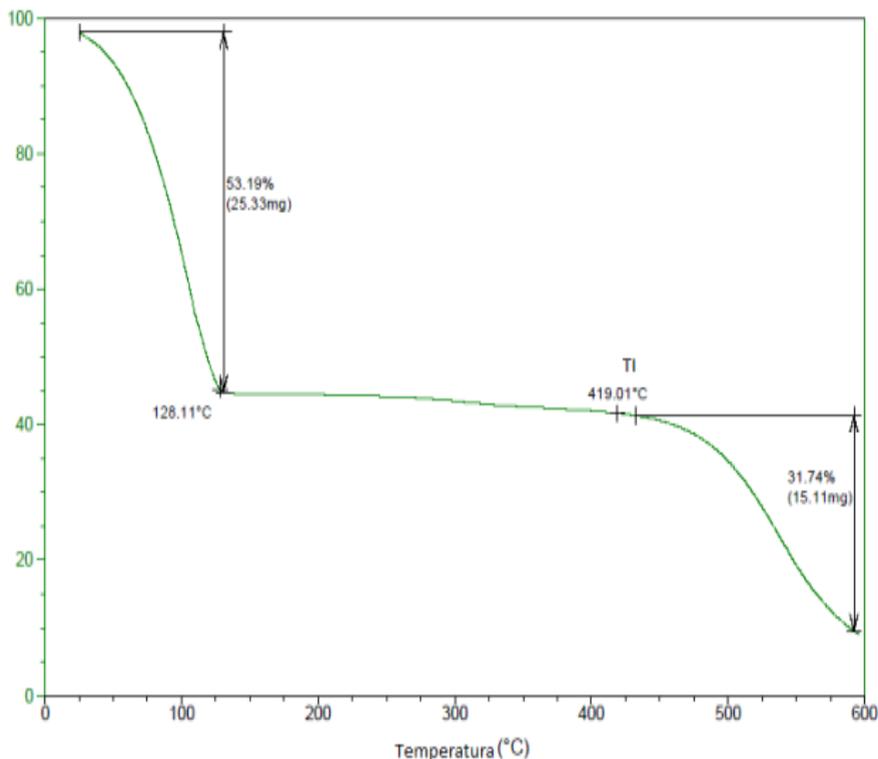
Fonte: Elaborada pela autora 2018.

Na Figura 16 são apresentados os resultados da análise de DSC, das amostras de 1 a 6. Os resultados indicam que houve, para as amostras 4, 5 e 6, um fenômeno conhecido como desnaturação do colágeno, na faixa de temperatura de 60° a 75° C, caracterizado pela curva características do fenômeno (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; LIU et al., 2014b). Por outro lado, as amostras 1, 2 e 3 não apresentaram este comportamento, devido, possivelmente, a menor temperatura atingida pelo substrato, durante à exposição ao plasma (COSTA et al., 2015), esta condição experimental evitou o processo de desnaturação, mas, por outro lado, promoveu a mobilidade das cadeias, fechando os poros. Os resultados obtidos no tratamento por plasma são indesejados, pois alterar a estrutura morfológica da MRD.

7.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA TG

Neste ensaio foi avaliada a degradação e a perda de massa, apresentada pela MRD hidratada, como é armazenada e comercializada. Com este resultado é possível determinar qual a temperatura que pode ser alcançada, durante o tratamento por plasma, sem que haja degradação, ou seja, permitindo que mantenha suas propriedades originais. A Figura 17 apresenta a perda de massa, em função da temperatura obtida para a MRD hidratada.

Figura 17. Análise termogravimétrica, evidenciando a perda de massa em porcentagem, em função da temperatura da MRD não liofilizada.



Fonte: Elaborada pela autora (2016).

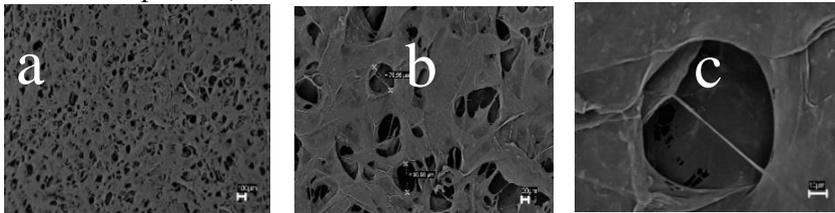
Analisando a Figura 17, pode-se observar um resultado similar ao obtido por Pedrosa 2009, o qual estudou o comparativo de colágeno

hidrolisado e comercial, com adição de Poliacetato de Vinila (PVA) (PEDROSO, 2009; RODRIGUES; MARTINS; PLEPIS, 2006). Na Figura 17 pode-se observar que, entre a temperatura de 25 ° e 128° C, há uma redução de 53% em massa do material analisado, que se refere a perda da água presente no material, que é originalmente hidratado. Este processo, de perda de água, inicia-se à 125° C, devido a presença de água previamente adsorvida na estrutura do material. Na temperatura de 419° C, inicia-se a degradação térmica TI, sendo que, cerca de 32% em massa é degradada entre 419° a 600° C.

7.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de MEV foram realizadas com o objetivo de investigar as características morfológicas da MRD, sem e com tratamento por plasma de argônio. Na Figura 18 são apresentadas as micrografias, obtidas por MEV da MRD, após o processo de liofilização, com diferentes ampliações. Analisando as imagens, verifica-se que este tipo de material apresenta grande porosidade com o tamanho dos poros, variado de 20 a 70 μm . Este tipo de característica é desejado na membrana, para que as células possam permeá-la, pois a variação do tamanho de poro controla a velocidade e a quantidade de células regeneradoras da derme. (BÖTTCHER-HABERZETH *et. al.*, 2010; SLEPIČKA *et al.*, 2014)

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura da matriz de regeneração dérmica, sem tratamento liofilizadas: a) 100x; b) 500x, evidenciando o tamanho de poros; c) 2500x.

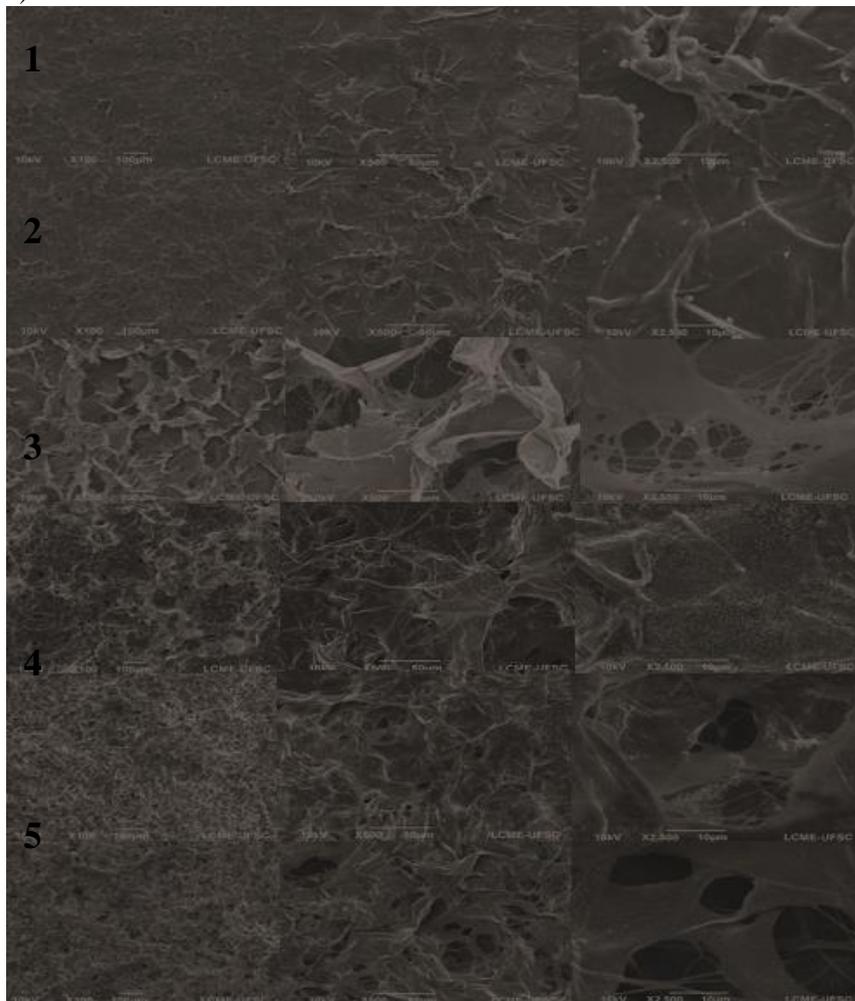


Fonte: Elaborada pela autora (2016).

É possível observar, na Figura 18, que a membrana liofilizada, sem tratamento por plasma, apresenta superfície amorfa, homogênea e com poros irregularmente distribuídos. Este resultado é similar ao apresentado no estudo de membranas e justifica a absorção total da água, verificada no ensaio de ângulo de contato (PEDROSO, 2009).

Após o tratamento, por plasma de argônio, foram obtidas imagens de MEV, para as 6 amostras de MRD, como apresentadas na Figura 19, que mostra as amostras após o tratamento por plasma de argônio, em diferentes condições.

Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura MEV da MRD, com tratamento por plasma, com diferentes magnificações: a) 100x; b) 500x e c) 2500x.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Ao analisar as micrografias, das amostras apresentadas na Figura 19, pode-se observar uma alteração morfológica da MRD. Verifica-se um fechamento dos poros, que pode estar relacionado com a mobilidade das cadeias, sendo este comportamento mais pronunciado nas amostras 1, 2 e 3. Resultado não desejado para o estudo, ao analisar as micrografias das amostras 4, 5 e 6, pode-se observar a formação de uma segunda fase, efeito denominado desnaturação do colágeno. Este comportamento pode ser confirmado comparando as análises de MEV com as análises de DSC, apresentado no item 7.2. A desnaturação é um processo indesejável para o estudo, pois a mesma pode causar alteração funcional no arranjo estrutural do colágeno, não sendo mantida a tripla hélice e a estrutura helicoidal do colágeno que é responsável, em grande, parte por suas propriedades mecânicas e biológicas (RABBERS et al., 2015).

7.5 ANÁLISE DE REIDRATAÇÃO

Ao realizar o ensaio da capacidade de reidratação da MRD, pode-se observar que, após a liofilização, a membrada permaneceu com a capacidade de hidratar-se, como mostra a Tabela 2, resultado importante para a finalidade do material. Observou-se que a hidratação, após a liofilização, foi maior que antes de liofilizar, provavelmente, pelo fato que a camada de silicone foi retirada após o processo e descontada a sua massa, e assim, a área de contato com a solução fisiológica aumentou, permitindo deste modo, uma reidratação maior.

Tabela 2. Análise de reidratação da MRD após liofilizar.

Amostra	Sem liofilizar(g)	Liofilizada(g)	Hidratada após liofilizar(g)
1	0,45	0,134	0,685
2	0,54	0,166	0,847
3	0,55	0,131	0,796
4	0,42	0,154	0,813
5	0,54	0,165	0,81
6	0,48	0,157	0,794

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

7.6 ANÁLISE DE ÂNGULO DE CONTATO DA MRD

Esta técnica permite analisar se a MRD é hidrofílica ou hidrofóbica. Os resultados desta análises foram dificultados pela característica morfológica da superfície da MRD, que apresenta a característica de absorver toda a gota de água durante o ensaio, em amostras não tratadas por plasma, neste caso, o equipamento não mediu o ângulo de contato, pois a MRD é tridimensional e porosa (WALSTRA, P; VAN VLIET, 2010), já as amostras tratadas por plasma tornaram-se hidrofóbicas.

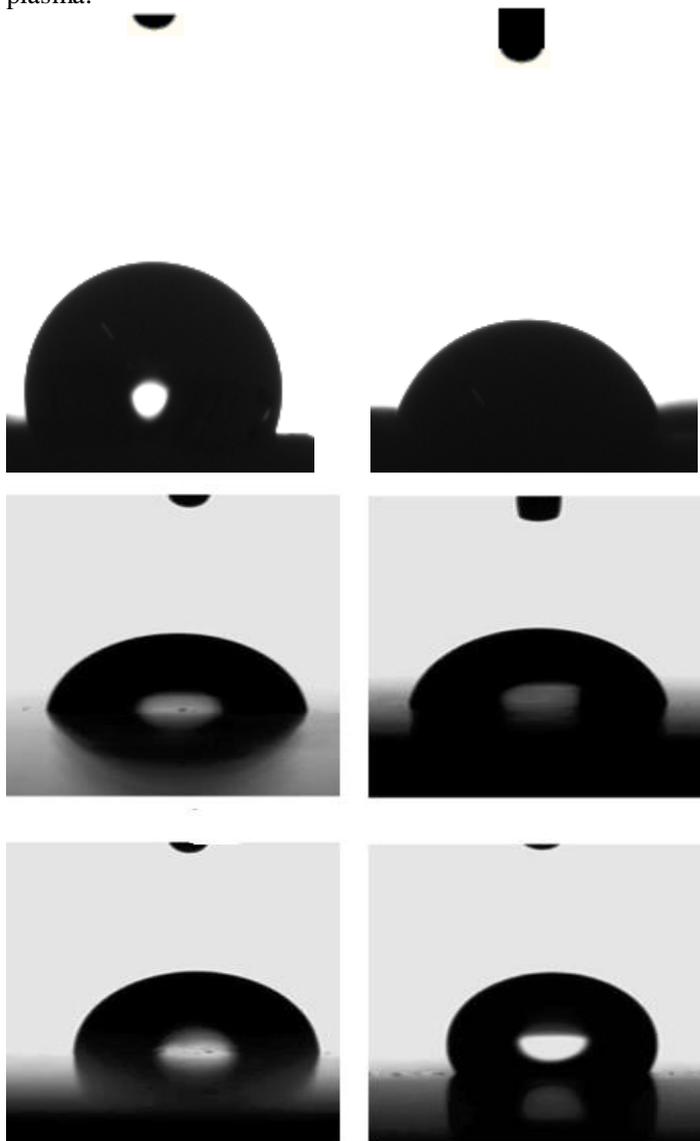
Os ângulos obtidos são apresentados na Tabela 3, para cada amostra tratada, em diferentes tempos de exposição ao plasma, mostrado no item 6.3. A Figura 20 mostra uma imagem da amostra não tratada, após ter sido gotejada com água de volume de 1 mL, que totalmente absorvida, a Figura 21 mostra a gota na superfície da MRD tratada por plasma e com a característica alterada para hidrofóbica, característica não desejada para este estudo.

Figura 20. Amostra de MRD não tratada, com gotas de água absorvidas no teste de ângulo de contato.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Figura 21. Gota de água na superfície da MRD, após tratamento com plasma.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Tabela 3. Ângulo de contato das amostras de MRD, após tratamento com plasma.

Amostra	Tempo de tratamento	Tensão (V)	Ângulo de contato
0	0	0	0
1	120	450	75,16
2	150	450	66,36
3	60	450	75,79
4	60	400	85,63
5	120	400	93,69
6	180	400	62,82

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Após o tratamento por plasma, as amostras no ensaio de ângulo de contato não absorveram a gota de água, mostrando assim, um comportamento hidrofóbicas, isso ocorreu pelo fato de o tratamento por plasma ter provocado mobilidade das cadeias de colágeno, na superfície, fechando os poros da matriz, as micrografias obtidas por MEV, corroboram com esta afirmação, característica não é desejada para o estudo, pois os poros e a hidroflicidade são características almejadas para este material.

A análise comparativa, entre tratamento por plasma e porosidade da matriz, foram dificultadas pela instabilidade gerada no plasma durante o tratamento, em estudos futuros sugere-se a realização de um tratamento por plasma com maior estabilidade e/ou outros gases.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se a influência do plasma de argônio na modificação da superfície da MRD analisada, o tratamento promoveu alterações no material, não mantendo preservada a microestrutura da MRD. As características de molhabilidade (hidrofilicidade/hidrofobicidade) e morfologia foram alteradas pelo tratamento por plasma de argônio. Estas propriedades são essenciais para a biocompatibilidade do polímero.

As análises de MEV evidenciaram a mudança na superfície morfológica e o fechamento dos poros, causados pelo tratamento com plasma. Este tratamento provocou a desnaturação do colágeno, o resultado da análise de DSC corrobora para esta afirmativa, nele é possível identificar os vales característicos de desnaturação do colágeno.

Este estudo também confirmou que a MRD teve suas concentrações de oxigênio praticamente inalteradas pelo tratamento por plasma, resultado obtido através da análise de XPS.

As modificações ocasionadas pelo tratamento, por plasma de argônio, levaram a não realização do ensaio de viabilidade, pois as características alteradas são essenciais para a viabilidade celular, sendo que a ausência das mesmas tornam indesejável o ensaio.

Frente aos resultados expostos, conclui-se que o tratamento por plasma na MRD tem influência indesejada para a finalidade do material, pois, conforme os dados obtidos, a MRD apresentaram hidrofobicidade e redução de poros, tornando-a incompatível para o objetivo de aplicação do material.

9 REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, K.; BAIJAL, J. S.; MENDIRATTA, R. G. Substrate influence on the structure of thin films. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 41, n. 11, p. 1271–1272, 1980.
- AL-JUMAILI, A. et al. Plasma Treatment of Polymeric Membranes. **Non-Thermal Plasma Technology for Polymeric Materials**, p. 211–240, 2019.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**, 2008. (Nota técnica).
- BANERJEE, S.; DIONYSIOU, D. D.; PILLAI, S. C. Self-cleaning applications of TiO_2 by photo-induced hydrophilicity and photocatalysis. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 176–177, p. 396–428, 2015.
- BARROS, L. P. R. C. **Modificação superficial do tecido de malha de ácido polilático (PLA) por tratamento plasma**. [s.l: s.n.].
- BELMONTE, G. K. **Modificação superficial de polímeros fotoinduzida por radiação UV, VUV e EUV**. 2015.
- BOGAERTS, A. et al. Gas discharge plasmas and their applications. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 4, p. 609–658, 2002.
- BORELLI, V. et al. **Biocompatibilidade de materiais: estudo exploratório sobre aplicação da ISO 10.993**. 2009.
- BÖTTCHER-HABERZETH, S.; BIEDERMANN, T.; ERNEST, R. **Tissue engineering of skin**. Burns Tissue engineering of skin. n. December 2009, 2010.
- BÖTTCHER-HABERZETH, S.; BIEDERMANN, T.; REICHMANN, E. Tissue engineering of skin. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 36, n. 4, p. 450–60, jun. 2010.
- BURKE, J. F. et al. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Annals of surgery**, v. 194, n. 4, p. 413, 1981.
- CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros - Um texto básico para**

tecnólogos e engenheiros. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**, p. 139–168, 2006.

CARDOSO, M. J. B. et al. Estudo físico-químico e morfológico de superfície do PEUAPM modificada. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 2, p. 68–73, 2013.

CASTRO FERREIRA, M. et al. Skin substitutes: current concepts and a new classification system. **Rev. Bras. Cir. Plást**, v. 26, n. 4, p. 696–702, 2011.

CHAPMAN, B. **Glow Discharge Processes**. New York: [s.n.].

CHERUTTI, G. **Desenvolvimento e caracterização de dispositivo de PLLA/Trietil-Citrato associado à derme suína acelular para reparação de lesões cutâneas**. [s.l.: s.n.].

CHICHTI, E. et al. Effects of Ar-N₂-O₂ Microwave Plasma on Poly-L-Lactic Acid Thin Films Designed for Tissue Engineering. **Plasma Processes and Polymers**, v. 10, n. 6, p. 535–543, 2013.

CHOI, J. W. et al. The influences of skin visco-elasticity, hydration level and aging on the formation of wrinkles: A comprehensive and objective approach. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2013.

CHUA, P. .; CHENA, J. .; WANGA, L. **Plasma-surface modification of biomaterials**. v. 36, n. 5–6, p. 143–206, 2002.

COSTA, B. D. et al. **Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos**. 1. v. 35, n. 2, p. 177–187, 2015.

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

DEMINA, T. et al. DC discharge plasma modification of chitosan/gelatin/PLLA films: Surface properties, chemical structure and cell affinity. **Surface and Coatings Technology**, v. 207, p. 508–516, 2012.

DIECKMANN, C. et al. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. **Experimental Dermatology**, v. 19, p. 697–706, 2010.

ESPOSITO, A. R. et al. **Study of Vero cells/PLGA Interaction after**

Surface Modification by Oxygen Plasma. p. 164–172, 2007.

FEREIRA, M. C. et al. **Substitutivos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação.** v. 26, n. 4, p. 696–702, 2011.

FERREIRA, B. M. P. et al. Plasma surface treatments of poly(l-lactic acid) (PLLA) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV). **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 3, p. 806–813, 2009.

FRIDMAN, A. A. **Plasma Chemistry.** New York: [s.n.].

GARCIA, G. P. **Efeito do tratamento de polímeros em plasmas de nitrogênio.** [s.l: s.n.].

GEHLEN, M. H. et al. Fotoiniciação de polimerização vinílica. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 794–801, 1998.

GOISSIS, A. P. A. **Análise estrutural do colágeno tipo I: correlação estrutura-atividade biológica.** [s.l: s.n.].

GREGOR, A.; HOŠEK, J. 3D printing methods of biological scaffolds used in tissue engineering. **Romanian Review Precision Mechanics, Optics and Mechatronics**, v. 3, n. 40, p. 143–148, 2011.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Mater**, v. 48, n. 1, p. 263–277, 2000.

GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering – in vivo and in vitro applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 4–5, p. 352–366, 2011.

HEDAYATI, R.; SADIGHI, M.; ZADPOOR, A. A. Analytical relationships for the mechanical properties of additively manufactured porous biomaterials based on octahedral unit cells. **Applied Mathematical Modelling**, 2017.

HODGKINSON, T.; BAYAT, A. **Dermal substitute-assisted healing: Enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design** *Archives of Dermatological Research*, 2011a.

HODGKINSON, T.; BAYAT, A. Dermal substitute-assisted healing: enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design. **Archives of dermatological research**, v. 303, n. 5, p. 301–15, jul. 2011b.

HORCH, R. E. et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes. **Journal**

of cellular and molecular medicine, v. 9, n. 3, p. 592–608, jan. .

HORCH, R. E. et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 3, p. 592–608, 2005.

HOSHI, K. et al. The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 273–280, 1999.

HWANG, K.-A.; YI, B.-R.; CHOI, K.-C. Molecular Mechanisms and *In Vivo* Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. **Laboratory Animal Research**, v. 27, n. 1, p. 1, 2011.

IONASHIRO, M. **Giolito - Fundamentos da Termogravimetria Análise Térmica Diferencial Calorimetria Exploratória Diferencial**. [s.l: s.n.].

JACOBS, T. et al. Plasma Surface Modification of Biomedical Polymers: Influence on Cell-Material Interaction. **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, v. 32, n. 5, p. 1039–1073, 2012.

JACOBS, T. et al. Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 2, p. 469–478, 2013.

JIA, W. et al. **Synthesis, characterization, and thermal properties of biodegradable polyetheresteramide-based polyurethane**. v. 60, p. 3686–3692, 2006.

JONES, I.; CURRIE, L.; MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. **British journal of plastic surgery**, v. 55, n. 3, p. 185–193, 2002.

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

JR, A. R. S.; WADA, M. L. F. **Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual**. v. 17, p. 308–317, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

JUSTINIANO, D.; SOUZA, D. **Incorporação de colágeno de rã-touro em membranas de nanocelulose visando aplicação em medicina regenerativa.** 2015.

KALE, K. H.; DESAIA, A. N. Atmospheric pressure plasma treatment of textiles using non-polymerising gases. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v. 36, n. 3, p. 289–299, 2011.

KALIA, S. et al. Surface modification of plant fibers using environment friendly methods for their application in polymer composites, textile industry and antimicrobial activities: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 97–112, 2013.

KARTHIK, T.; MURUGAN, R.; VIJAYAN, M. Optimization of plasma treatment variables to improve the hydrophilicity of polylinen[®] fabrics. **Journal of the Textile Institute**, v. 104, n. 5, p. 481–493, maio 2013.

KESSLER, F. **Fotofuncionalização Superficial de Polímeros : indução de biocompatibilidade e biodegradabilidade Fotofuncionalização Superficial de Polímeros : indução de biocompatibilidade e biodegradabilidade.** [s.l: s.n.].

KONTAKIOTIS EG, TZANETAKIS GN, L. AL. **A comparative study of contact angles of four different root canal sealers.** - PubMed - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320719>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

KUMAR, P. Classification of skin substitutes. **Burns**, v. 34, n. 1, p. 148–149, fev. 2008.

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. DE G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: Preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Quimica Nova**, p. 267–271, 1998.

LAPORTE, R. J. **Hydrophilic Polymer Coatings for Medical Devices: Structure/Properties, Development, Manufacture and Applications.** [s.l: s.n.].

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1–2, p. 1–22, 2001.

LI, D. et al. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 5, p. 605–609, 2009.

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

LIU, W. et al. Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis. **Thermochimica Acta**, v. 581, p. 32–40, 2014b.

MACÊDO, M. O. C. et al. **Estudo comparativo da modificação superficial de membranas de quitosana tratadas por plasma de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio**. v. 2, p. 95–103, 2012.

MAES, N. B. ET AL. **Uso de matriz de regeneração dérmica em pacientes vítimas de queimaduras em hospital infantil de referência de Santa Catarina: nove anos de experiência**. v. 11, n. 1, p. 6–14, 2012.

MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. [s.l: s.n.].

MARTINS, W. F. M. **Tratamento da superfície de tubos de poliamida 11 por plasma ac, flambagem e peróxido de hidrogênio para deposição de revestimento hidrofílico biomédico**. [s.l: s.n.].

METCALFE, A D.; FERGUSON, M. W. J. Skin stem and progenitor cells: using regeneration as a tissue-engineering strategy. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 1, p. 24–32, 2008.

MEZARоба, C. et al. **Nano-rugosidade gerada em amostras de polímero PEAD através de plasma Nano-roughness on PEAD polymer produced through N₂/O₂ RF plasma**. 2018.

MILES, C. A.; GHELASHVILI, M. Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 3243–3252, 1999.

MORAES, C. R. et al. **Inflüência do plasma na superfície da membrana do poli (L-ÁCIDO LÁTICO)**. n. 6, p. 6–7, 2013.

MOTTA, A. **síntese e caracterização do poli(l-ácido láctico)- PLLA e poli (L-ácido láctico-co-ácido-glicólico)- PLGA e estudo da degradação in vitro**. [s.l: s.n.].

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.** 6ª ed. [s.l: s.n.].

NIMNI, M. E. et al. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 21, n. 6, p. 741–771, 1987.

ONG, Y. L. et al. Adhesion forces between E. coli bacteria and biomaterial surfaces. **Langmuir**, v. 15, n. 8, p. 2719–2725, 1999.

PEDROSO, M. G. V. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA.** [s.l: s.n.].

PIATTI, T. M. et al. **Plásticos : características, usos, produção e impactos ambientais.** 2005.

PREIMA, M. JOSÉ L. et al. **Diminuição do tempo de maturação de matrizes de regeneração dérmica quando associados a uso de curativos de pressão negativa.** In: [s.l: s.n.]. v. 12p. 145–152.

PRESTES, R. C. et al. **Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado.** p. 375–382, 2013.

RABBERS, A. S. et al. **Caracterização térmica e espectroscópica de biomaterial a base de colágeno, gelatina e óleo de pequi,** 2015.

RESENDE. aplicações e tipos de biomateriais. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 2005, p. 1689–1699, 2013.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. **Growth of Cultured Mammalian Cells on Secondary Glucose Sources.** In: [s.l: s.n.].

RIDENTI, M. A. **Diagnóstico e modelagem de plasmas gerados por micro-ondas e aplicações.** [s.l: s.n.].

ROCHDI, A.; FOUCAT, L.; RENOU, J. P. NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen. **Food Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 295–299, 2000.

RODRIGUES, F. T.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. DE G. **Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria (ABRATEC).** p. 2006, 2006.

ROSSNAGEL, S. M.; CUOMO, J. J.; WESTWOOD, W. D. **Handbook of Plasma Processing Technology**. New Jersey: [s.n.].

ROTH, J. R. **Industrial plasma engineering. Vol. 2, Applications to nonthermal plasma processing**. [s.l.] Institute of Physics Pub, 2001.

SALMORIA, G. V et al. **Tratamento da Superfície de Cateteres de Poliamida 11 por Plasma de Oxigênio**. v. 23, p. 565–569, 2013.

SCHULZ 3RD, J. T.; TOMPKINS, R. G.; BURKE, J. F. Artificial skin. **Ann Rev Med**, v. 51, p. 231–244, 2000.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Material Science and Engineering**, v. 34, p. 147–230, 2001.

SHENTON, M. J.; LOVELL-HOARE, M. C.; STEVENS, G. C. Adhesion enhancement of polymer surfaces by atmospheric plasma treatment. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 34, n. 18, p. 2754, 2001.

SIMÕES, M. S. **Desenvolvimento e estudo In Vitro de implante biorreabsorvível em poli (L-lactídeo) (PLLA) para artrodese de coluna lombar**. [s.l: s.n.].

SINTHUSAMRAN, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). **Food Chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2435–2441, 2013.

SLEPICKA, P. Controlled biopolymer roughness induced by plasma and excimer laser treatment. **Express Polymer Letters**, v. 7, n. 11, p. 950–958, 2013.

SLEPIČKA, P. et al. Biopolymer nanostructures induced by plasma irradiation and metal sputtering. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 332, p. 7–10, 2014.

SMITH, D. L. **Thin-film deposition : principles and practice**. inertation ed. New York: [s.n.].

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid.

Analytical Biochemistry, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SOETHE, V. L. **Deposição de Filmes Metálicos Sobre Poli (Tereftalato de Etileno) Via Trido-Magnetron-Sputtering: Influência da Corrente e da Voltagem nas Propriedades do Filmes**. [s.l.: s.n.].

TAYLOR, P. et al. The Journal of The Textile Institute. **Optimization of plasma treatment variables to improve the hydrophilicity of polylinen fabrics**. n. July 2015, 2013.

TENDERO, C. et al. Atmospheric pressure plasmas: A review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 1, p. 2–30, 2006.

TIAN, H. et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 237–280, fev. 2012.

VON WOEDTKE, T. et al. Plasmas for medicine. **Physics Reports**, v. 530, n. 4, p. 291–320, 2013.

WALSTRA, P; VAN VLIET, T. Quimica de Alimentos de Fennema. In: **Quimica de Alimentos de Fennema**. [s.l.: s.n.]. p. 611–660.

WILLIAMS, D. F. Biomaterials There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, v. 35, n. 38, p. 10009–10014, 2014.

WRIGHT, N. T.; HUMPHREY, J. D. Denaturation of Collagen Via Heating: An Irreversible Rate Process. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 109–128, 2002.