



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

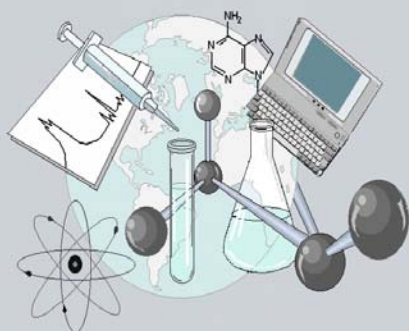
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Desenvolvimento de Filmes Micro e Nanoporosos de Poliestireno Utilizando o Método “Breath Figure”: Aplicação como Scaffolds em Cultura Celular

Dissertação apresentada por **VANESSA HAFEMANN FRAGAL** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química

CEE



Centro de
Ciências Exatas

MARINGÁ, FEVEREIRO/2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Dissertação de Mestrado

*Desenvolvimento de Filmes Micro e
Nanoporosos de Poliestireno Utilizando o
Método “Breath Figure”: Aplicação como
Scaffolds em Cultura Celular*

*Mestranda: Vanessa Hafemann Fragal
Orientador: Prof. Dr. Adley Forti Rubira*

Maringá, Fevereiro de 2013.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

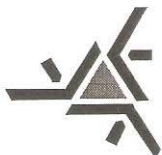
F811d Fragal, Vanessa Hafemann
Desenvolvimento de filmes micro e nanoporosos de poliestireno utilizando o método "breath figure": aplicação como scaffolds em cultura celular / Vanessa Hafemann Fragal. -- Maringá, 2013.
123 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Adley Forti Rubira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

1. Filmes micro e nanoporosos - Poliestireno. 2. Breath figure. 3. Cultura de células - Nanoscaffolds. 4. Química - Filmes finos. I. Rubira, Adley Forti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 542

ECSL-00678



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Vanessa Hafemann Fragal**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 22 de fevereiro de 2013.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Adley Forti Rubira
Presidente - DQI/UEM

Prof. Dr. Eduardo Radovanovic
Membro - DQI/UEM

Profa. Dra. Gizilene Maria de Carvalho
Membro - UEL

Dedico esta dissertação ao meu exemplo de vida, Regina Hafemann Fragal que sempre me estimulou a dar este grande passo. Essa pessoa com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação esteve ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por ser minha mãe, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

Agradecimentos

Agradecer é sempre uma tarefa difícil, pois muitas vezes, em meio aos agradecimentos, nos esquecemos de alguma pessoa importante em nossa caminhada. De antemão gostaria de pedir perdão àqueles que, por ventura eu esqueça neste momento; lembrando que a gratidão verdadeira não é aquela que se faz quando se escreve e sim aquela que se pratica.

Quero agradecer primeiramente a Deus todo poderoso criador de todas as coisas, pelo dom da vida, da saúde, pela sabedoria, paciência, perspicácia, e pela minha fé.

Agradeço ao Prof. Adley Forti Rubira pela orientação, ensinamentos, paciência, confiança e consideração de ter aceitado a orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

A minha mãe e meu pai por ter sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

Agradeço, de forma muito carinhosa, aos meus irmãos, Vanderson, Elizângela e Everton pelas lições de vida e pela convivência feliz que sempre tivemos e principalmente pela compreensão e paciência no período da construção deste trabalho.

A professora Gizilene por me inserir no Grupo de Materiais Poliméricos e Compósitos (GMPC).

Ao Rafael, Guilherme, Thelma e Prof Marcos Kunita pela amizade, discussões, auxílios e contribuições desse trabalho, assim como, nos trabalhos de iniciação científica.

Ao professor Eduardo Radovanovic pela ajuda na obtenção das imagens de MET e pelas contribuições valiosas neste trabalho.

Aos demais professores do grupo GMPC pelas contribuições diretas ou indiretas ao trabalho.

Aos Professores do Departamento de Química responsáveis pela minha formação acadêmica.

Aos colegas de laboratório: Pablo, Marcos Rogério, Barbara, Pamela, Bruna, Ernandes, Manuel, Cristiane, os quais proporcionam um ambiente de trabalho produtivo, agradável e descontraído.

A Mychelle Vianna pelas imagens de TEM e pelas discussões dos resultados de viabilidade celular.

A Juliana Piai pela ajuda nas análises de viscosidade e crescimento de células.

Ao Marcos Roberto por sugerir a utilização do spin coating nesse trabalho.

Ao Cleiser por me ensinar a operar o spin coating e tratar com plasma de oxigênio os polímeros virgens.

A Sheila pela obtenção do substrato de PDMS.

Ao professor Emerson Giroto por conceder utilização do spin coating e da câmara de plasma.

A Thelma por me ensinar a operar o MEV e MFA, além de ser minha querida e amada amiga e sempre me ajudar em todos os momentos da graduação e do mestrado.

Aos amigos Sílvia, Carlos, Thiago, Camila, Mariete, Mariane, Letycia, Sheila, Ronnie e Kalil pela amizade, momentos de distração e por sempre me apoiarem nas horas difíceis.

As minhas amigas do mestrado, Danielly, Elisangela e especialmente a Vivian por sempre me ajudarem nessa caminhada e serem tão especiais e queridas para mim.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura e ao sua aluna de mestrado Franciele Pelegrin Garcia pelo ensaio de aderência/viabilidade das células Vero, pelas valiosas contribuições na discussão dos resultados e pela constante prestatividade.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Claudemir e a Cristina da secretaria da pós graduação e a Cíntia, e o Fabio da COMCAP pela prestatividade.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino”.

Paulo Freire

Contribuições em Congressos

- ✓ ***Breath Figure: Micro e Nanopores of Polystyrene for Vero cells scaffolds*** de autoria de: Vanessa Hafemann Fragal, Thelma Sley Pacheco Cellet, Edvani Curti Muniz, Francielle Pelegrin Garcia, Celso Vataru Nakamura, Adley Forti Rubira. Ganhou o 1º Lugar no concurso de painéis no Simpósio Sul Brasileiro de Microscopia e Microanálise (SSBMM) realizado no período de 06 a 09 de novembro de 2012 em Maringá, Paraná.

- ✓ ***Breath Figure Micro and Nanopores Prepared by Spin Coating of Polystyrene on the Surface of Polymer films*** de autoria de Vanessa H. Fragal, Rafael Silva, Thelma Sley P. Cellet, Vivian A. Tomaz, Elizângela H. Fragal, Guilherme M. Pereira, Edvani C. Muniz, Adley F. Rubira. Trabalho aceito como pôster no congresso Third Internacional Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterial (HYMA) – 3-7 March 2013, Sorrento, Italy.

- ✓ ***Dendritic Polyamidoamine Synthetized by One-Step Solid State Reaction*** de autoria de Vivian A. Tomaz, Vanessa H. Fragal, Rafael Silva, Edvani C. Muniz, Adley F. Rubira. Trabalho aceito como pôster no congresso Third Internacional Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterial (HYMA) – 3-7 March 2013, Sorrento, Italy.

Publicações

- ✓ ***Hierarchical Micro and Nanoporous Linear Polystyrene Thin Film deposited On Polymer Surfaces*** de autoria de Vanessa H. Fragal, Rafael Silva, Thelma Sley P. Cellet, Vivian A. Tomaz, Elizângela H. Fragal, Guilherme M. Pereira, Eduardo Radovanovic, Edvani C. Muniz e Adley F. Rubira. ***Submetido para a revista Langmuir.***

- ✓ ***Breath Figure: Micro e Nanopores of Polystyrene for Vero cells scaffolds*** de autoria de: Vanessa Hafemann Fragal, Thelma Sley Pacheco Cellet, Edvani Curti Muniz, Francielle Pelegrin Garcia, Celso Vataru Nakamura, Adley Forti Rubira. ***Em fase de redação.***

- ✓ ***Hosted formation of PbS crystals on polyethylene modified surface films*** de autoria de: Vanessa H. Fragal, Rafael Silva, Thelma Sley Pacheco Cellet, Guilherme M. Pereira, Marcos H. Kunita, Edvani C. Muniz e Adley F. Rubira. ***Aceito na revista JBCS.***

- ✓ ***Dendritic Polyamidoamine Synthetized by One-Step Solid State Reaction Using Solid Salt Architecture*** de autoria de Vivian A. Tomaz, Vanessa H. Fragal, Rafael Silva, Edvani C. Muniz, Adley F. Rubira. ***Em fase de redação.***

Resumo

Estruturas ordenadas sempre promoveram fascinação e interesse nos filósofos, matemáticos e artistas, tanto pela matemática envolvida quanto pelas suas qualidades estéticas. Atualmente, os cientistas de materiais estudam as aplicações que as estruturas ordenadas podem proporcionar, sendo que os filmes poliméricos finos com superfícies porosas com padrão específico são uma grande promessa para diversas aplicações. Existem vários métodos para a obtenção de superfícies porosas, como por exemplo, os que utilizam técnicas de litografia, os métodos baseados na automontagem de padrões e recentemente o método denominado breath figure. O método “breath figure” permite a formação de matrizes hexagonais bem ordenadas na superfície de substratos por meio de um processo simples, rápido, dinâmico, econômico e reprodutível. Foi possível obter por este método filmes porosos de poliestireno suportados em diferentes substratos poliméricos. Os fatores velocidade do spin coating, substrato, concentração de poliestireno e solvente influenciaram na formação, diâmetro e profundidade dos poros nas estruturas ordenadas de poliestireno. As rotações do spin coating estudadas induziram a formação de poros com diâmetro médio que variou de 1,2 μm a 202 nm com rugosidade média de 130 a 25 nm, respectivamente. Os substratos estudados promoveram filmes nanoporos de PS com diâmetro médio de 507 a 123 nm e com rugosidade média de 132 a 6 nm, respectivamente. Filmes porosos com diâmetro médio de 346 e 256 nm e com rugosidade média de 96 e 22 nm, respectivamente, suportados no poli (tereftalato de etileno) foram avaliados como nanoscaffolds frente às células Vero. Os resultados demonstraram viabilidade celular superior quando comparados ao controle constituído de placa de poliestireno. Este fato infere que os nanoscaffolds obtidos de maneira inédita, são capazes de mimetizar as interações que as células possuem com as nanoproteínas da matriz extracelular.

Abstract

Ordered structures always promoted fascination and interest in the philosophers, mathematicians and artists as much as the math involved in their esthetic qualities. Currently, scientists of materials have been studying the applications that the ordered structures can provide, among the materials studied thin polymer films with porous surfaces with specific pattern have special attention due to its various applications. Several methods for obtaining porous surfaces, such as those using lithography techniques, methods based on self-assembly patterns and recently the method known as *breath figure*. The method *breath figure* permits the formation of well ordered hexagonal arrays on the surface of substrates by a process simple, quick, dynamic, economical and reproducible. By this method was possible to obtain porous film of polystyrene supported on various polymeric substrates. Factors like speed spin coating, substrate concentration of polystyrene and solvent influenced the formation, pore diameter and depth of the ordered structures of polystyrene. The rotations of the spin coating studied induced the formation of pores having average diameter between 1,2 μm to 202 nm with a roughness average 130 to 25 nm, respectively. The substrates studied promoted nanoporous films of PS with average diameter 507 to 123 nm and average roughness 132 to 6 nm, respectively. Porous films with average diameter of 346 nm and 256 nm and with roughness average of 96 and 22 nm, respectively, supported on poly (ethylene terephthalate) were evaluated as nanoscaffolds compared with Vero cells. The results showed higher cell viability compared to control consisting of polystyrene plate. This fact implies that the nanoscaffolds obtained of unprecedented way, are able to mimic the interactions that have cells with the nano-protein of extracellular matrix.

Índice de Figura

Figura 1.1- Mecanismo do breath figure sugerido por Srinivasarao e colaboradores ligeiramente modificado a partir da versão original ^[27]	7
Figura 1.2- Esquema do mecanismo de formação das membranas propostos por Pitois e François. O esquema foi ligeiramente modificado a partir da versão original ^[26]	8
Figura 1.3- Mecanismo de Shimomura na formação do breath figure de um complexo poli-iônico. O esquema foi ligeiramente modificado a partir da versão original ^[61]	9
Figura 2.1 – Espectro de RMN ¹ H do PS.....	23
Figura 2.2 - Micrografias de MEV dos polímeros virgens (a) PET, (c) PEBD e (e) PDMS e dos polímeros (b) PET, (d) PEBD e (f) PDMS após deposição de uma solução de 10% m/v de PS com THF pelo método solvent casting.....	26
Figura 2.3 – Micrografias de MEV do PET com a 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de (a) 1000 (b) 3000 (c) 5000 e (d) 9000 rpm.....	28
Figura 2.4 – Imagens do MFA em 3D do PET com 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: (a) 1000, (b) 3000, (c) 5000 e (d) 9000 rpm.....	29
Figura 2.5 - Micrografias do MFA em 2D do PET após deposição de solução 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: (a) 1000, (b) 3000, (c) 5000 e (d) 9000 rpm.....	30
Figura 2.6 – Considerações feitas para atribuir o quanto a gota de água afundou na solução polimérica, em (a) ($r = p$) considera-se que metade da gota afundou na solução; (b) ($r > p$) considera-se que menos que a metade da gota afundou e (c) ($r < p$) considera-se que mais da metade da gota de água afundou.....	31
Figura 2.7- Microscopias do MET do PET após deposição de solução 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: (a) e (b) 1000, (c) e (d) 3000, (e) e (f) 5000 e (g) e (h) 9000 rpm.....	34-35

Figura 2.8- Foto do PET virgem (a) e PET após a deposição de solução de 10% PS (m/v) a 1000 (b) , 3000 (c) , 5000 (d) e 9000 rpm (e)	36
Figura 2.9- Foto dos filmes de PS obtidos: sem spin (solvent casting) (a) e a 1000 (b) , 3000 (c) , 5000 (d) e 9000 rpm (e)	37
Figura 3.1 – Micrografias de MEV dos polímeros virgens (a) PEBD, (b) PET, (c) PDMS, (d) PTFE e (e) vidro.....	46
Figura 3.2 – Micrografias do MFA dos polímeros virgens a) PEBD (b) PET (c) PDMS e (d) PTFE e (e) vidro.....	47
Figura 3.3 – Micrografias de MEV dos polímeros virgens (a) PEBD (c) PET (e) PDMS e (g) PTFE e dos polímeros tratados com plasma de oxigênio (b) PEBD (d) PET (f) PDMS e do triboeletrizado (h) PTFE e (i) vidro após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.....	48-49
Figura 3.4 – Micrografias de MFA em 3D dos polímeros virgens (a) PEBD (c) PET e (e) PDMS e dos polímeros tratados com plasma de oxigênio (b) PEBD (d) PET (f) PDMS e do triboeletrizado (g) PTFE e (h) vidro após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.....	49-50
Figura 4.1 – Micrografias de MEV do PET após a deposição de soluções com (a) 5%, (b) 10% e (c) 20%, (d) 25%, (e) 30% e (f) 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.....	61
Figura 4.2 – Micrografias do MFA do polímero PET após a deposição de soluções de (a) 10%, (b) 20%, (c) 25%, (d) 30% e (e) 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.....	62
Figura 4.3 - Gráfico de viscosidade versus concentração de PS. A viscosidade foi obtido com uma taxa de cisalhamento de 30 a 40 s ⁻¹	65
Figura 4.4- Esquema da diferença de profundidade das gotículas de água na solução polimérica com baixa concentração (a) e com alta concentração (b)	65
Figura 5.1 – Micrografias de MEV do polímero PET com 10% (m/v) de PS em (a) CH ₃ (CO)CH ₃ , (b) CHCl ₃ , (c) THF e (d) C ₄ H ₁₀ O rotacionados a 3000 rpm.....	73
Figura 6.1 – Imagens do microscópio invertido das células Vero com 2 horas de crescimento em (a) controle (fundo da placa de poliestireno); e do PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com as seguintes rotações (b) 1000, (c) 3000 e (d) 5000 rpm.....	86

Figura 6.2 – Imagens do microscópio invertido das células Vero com 4 horas de crescimento em (a) controle (fundo da placa de poliestireno); e do PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com as seguintes rotações (b) 1000, (c) 3000 e (d) 5000 rpm.....87

Figura 6.3 – Imagens do microscópio invertido das células Vero com 6 horas de crescimento em (a) controle (fundo da placa de poliestireno); e do PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com as seguintes rotações (b) 1000, (c) 3000 e (d) 5000 rpm.....88

Figura 6.4 – Imagens do microscópio invertido das células Vero com 24 horas de crescimento em (a) controle (fundo da placa de poliestireno); e do PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com as seguintes rotações (b) 1000, (c) 3000 e (d) 5000 rpm.....89

Figura 6.5 - Micrografias de MEV das células Vero com 24 horas de crescimento nos controles negativos (a) vidro, (b) PET e do PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com as seguintes rotações (c) e (d) 1000, (e) e (f) 3000 rpm, (g) e (h) 5000 rpm.....90-91

Figura 6.6- Esquema ilustrativo da morfologia das células quando as mesmas são semeadas e posteriormente crescem e se proliferam.....91

Figura 6.7 - Viabilidade das células Vero determinada pelo corante fluorescente sulforodamina B no controle positivo (placa de PS) e nos controles negativos (vidro e PET) e no PET após a deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF com rotações de: 1000, 3000 e 5000 rpm.....93

Figura I- Micrografias de MEV em diferentes ampliações de PET após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF rotacionadas a (a) e (b) 1000 e (c) 3000 rpm.....112

Figura II- Micrografias de MFA em diferentes ampliações de PET após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF rotacionadas a (a) 1000 e (b) 9000 rpm.....113

Figura III - Rugosidade ou profundidade média dos micro e nanoporos obtidos após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF com diferentes rotações113

Figura IV- Histogramas de distribuição de diâmetro dos nanoporos de PS suportados no PET após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: (a) 1000, (b) 3000, (c) 5000 e (d) 9000 rpm.....114

Figura V - Rugosidade ou profundidade média dos nanoporos obtidos após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF em diferentes substratos	115
Figura VI - Histogramas de distribuição de diâmetro dos nanoporos de PS suportados nos polímeros virgens (a) PEBD, (b) PDMS e dos polímeros tratados com plasma de oxigênio (c) PEBD (d) PET (e) PDMS e do triboeletrizado (f) PTFE e (g) vidro após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.....	115-116
Figura VII - Micrografias de MEV em diferentes ampliações após a deposição de soluções com (a) 10%, (b) 20% e (c) 25% (d) 30% e (e) 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.....	117-118
Figura VIII - Rugosidade ou profundidade média dos nanoporos obtidos após deposição de PS em THF em diferentes concentrações.....	119
Figura IX - Histogramas de distribuição de diâmetro dos nanoporos de PS formados no PET com diferentes concentrações: (a) 20%, (b) 25%, (c) 30 % e (d) 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.....	120
Figura X – Micrografias de MEV em diferentes ampliações do PET após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em (a) CH ₃ (CO)CH ₃ , (b) CHCl ₃ , (c) THF, (d) e (e) C ₄ H ₁₀ O a 3000 rpm.....	121
Figura XI - Micrografias de MEV com outras ampliações das células Vero com 24 horas de crescimento nos controles negativos (a) vidro, (b) PET e do PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com as seguintes rotações (c) 1000, (d) 3000 e (e) 5000 rpm.....	122-123

Índice de Tabela

Tabela 2.1- Diâmetro e rugosidade média dos nanoporos e o quanto à gota de água afunda na solução polimérica em diferentes rotações na superfície do PET com 10% (m/v) de PS em THF.....	32
Tabela 2.2- Ângulo de contato obtido em relação ao diâmetro e rugosidade média dos nanoporos sintetizados em diferentes rotações na superfície do PET com 10% (m/v) de PS em THF.....	37
Tabela 3.1 - Diâmetro e rugosidade média dos nanoporos e o quanto à gota de água afunda após a deposição de uma na solução polimérica de 10% (m/v) de PS em THF nos diferentes substratos.....	52
Tabela 3.2 - Propriedades dos substratos poliméricos e do PS.....	53
Tabela 4.1- Diâmetro e rugosidade média dos nanoporos e o quanto à gota de água afunda após a deposição de soluções poliméricas com diferentes concentrações de PS em THF a 3000 rpm no PET..	63
Tabela 5.1- Solventes utilizados e suas propriedades físico químicas.....	74
Tabela 5.2 – Parâmetros de Hansen do PS e seus solventes e suas diferenças de energia relativa.....	77

Índice de Abreviaturas e Siglas

2D- Duas dimensões

3D- Três dimensões

CEUA - Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa

CPG - Cromatografia de Permeação em Gel

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO – Densidade Óptica

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

IPD - Índice de Polidispersividade

IR- Índice de Refração

kPa - Kilopascal

MEC - Matriz Extracelular

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MFA - Microscopia de Força Atômica

Mn- Massa Molar Numérica

Mv- Massa Molar Viscosimétrica

Mw- Massa Molar em Peso

OMS- Organização Mundial da Saúde

p.e. - Ponto de Ebulição

PBS - solução tampão fosfato (pH 7,4)

PDMS - Polidimetilsiloxano

PEBD - Polietileno de Baixa Densidade

PET – Poli (tereftalato de etileno)

PTFE- Politetrafluoretileno

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

rpm - Rotações Por Minuto

s - Segundos

SFB - Soro Fetal Bovino

THF - Tetrahydrofurano

TRC - Tubo de Raios Catódicos

Índice

<i>Resumo</i>	I
<i>Abstract</i>	II
<i>Índice de Figura</i>	III
<i>Índice de Tabela</i>	VII
<i>Índice de Abreviaturas e Siglas</i>	VIII
<i>Capítulo 1</i>	1
<i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	1
<i>1.1. Considerações Gerais</i>	2
<i>1.2. Diferentes abordagens de sínteses de materiais estruturados</i>	3
<i>1.3. O método breath figure</i>	5
<i>1.4. Mecanismo de formação do breath figure</i>	6
<i>1.5. Parâmetros que influenciam a formação do breath figure</i>	9
<i>1.6. Poliestireno</i>	10
<i>1.7. Cultura de células</i>	11
<i>1.8. A importância dos scaffolds na cultura celular</i>	13
<i>1.9. Importância da cultura de células e linhagem de células Vero</i>	14
<i>1.10. Objetivos</i>	16
<i>Capítulo 2</i>	17
<i>SÍNTESE DE MICRO E NANOPOROS DE PS SOBRE PET- EFEITO DA VELOCIDADE DO SPIN COATING</i>	17
<i>2.1. Considerações iniciais</i>	18
<i>2.2 Parte experimental</i>	19
<i>2.2.1. Materiais</i>	19
<i>2.2.2 Análise do PS</i>	19
<i>2.2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de H (RMN ¹H)</i>	19

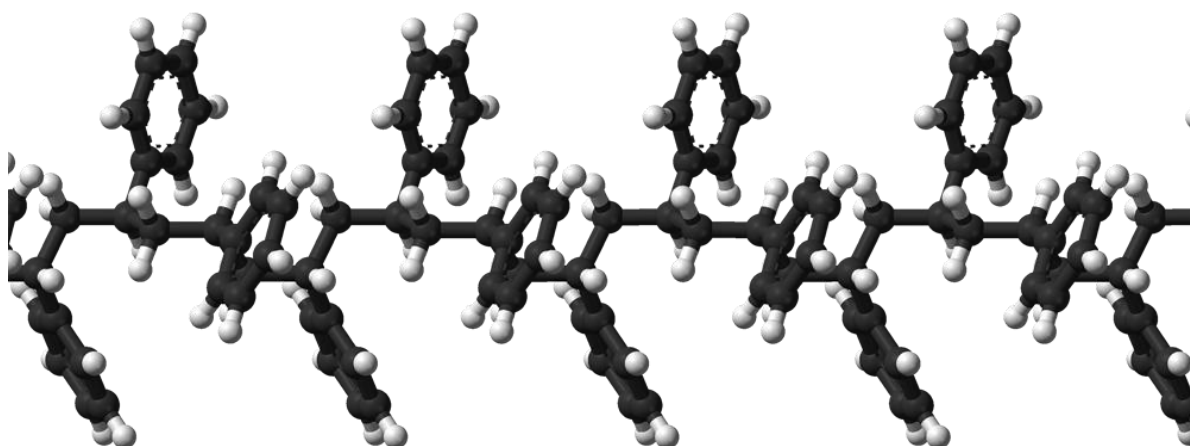
2.2.3. Substratos.....	19
2.2.3.1. Filmes de PET.....	19
2.2.3.2. Filmes de PEBD.....	20
2.2.3.3 Filmes de PDMS.....	20
2.2.4. Filmes de PS sobre substratos poliméricos - secagem estática (solvent casting).....	20
2.2.5. Síntese de micro e nanoporos de PS sobre PET- secagem dinâmica- efeito da velocidade do spin.....	21
2.3. Caracterizações dos filmes de PS porosos.....	22
2.4. Resultados e discussão.....	23
2.4.1 Análises do PS.....	23
2.4.2. Mecanismo proposto.....	24
2.4.3 Filmes de PS sobre substratos poliméricos - secagem estática (solvent casting).....	25
2.4.4 Síntese de nanoporos de PS sobre PET - efeito da velocidade do spin coating.....	27
2.5 Considerações Finais.....	39
Capítulo 3.....	40
SÍNTESE DE NANOPOROS DE PS - EFEITO DO SUBSTRATO.....	40
3.1. Considerações iniciais.....	41
3.2. Procedimentos experimentais.....	42
3.2.1 Materiais.....	42
3.2.2. Filmes de PTFE virgens.....	42
3.2.3. Filmes de PTFE triboeletrizados.....	42
3.2.4. Tratamento com plasma dos filmes de PET, PEBD e PDMS.....	43
3.2.5. Vidro.....	43
3.2.6. Síntese de nanoporos de PS - efeito do substrato.....	43
3.3. Caracterizações dos filmes porosos.....	44
3.4. Resultados e Discussão.....	45

3.4.1. Síntese de nanoporos de PS - efeito do substrato.....	45
3.5. Considerações finais.....	55
Capítulo 4.....	56
SÍNTESE DE NANOPOROS DE PS SOBRE PET- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO	56
4.1 Considerações iniciais.....	57
4.2. Procedimentos experimentais.....	58
4.2.1. Materiais.....	58
4.2.2. Síntese de nanoporos de PS sobre PET- efeito da concentração do PS	58
4.3. Caracterizações dos filmes porosos.....	59
4.4. Resultados e discussão.....	60
4.4.1. Síntese de nanoporos de PS sobre PET- efeito da concentração do PS.....	60
4.5. Considerações finais.....	67
Capítulo 5.....	68
SÍNTESE DE NANOPOROS DE PS SOBRE PET- EFEITO DO SOLVENTE	68
5.1. Considerações iniciais.....	69
5.2. Procedimentos experimentais.....	70
5.2.1. Materiais.....	70
5.2.2. Síntese de nanoporos de PS sobre o PET- efeito do solvente.....	70
5.3. Caracterizações dos filmes porosos.....	71
5.4. Resultados e discussão.....	72
5.4.1. Síntese de nanoporos de PS sobre o PET- efeito do solvente.....	72
5.5. Considerações finais.....	78
Capítulo 6.....	79
ENSAIO DE ADERÊNCIA/VIABILIDADE DAS CÉLULAS VERO.....	79
6.1. Considerações iniciais.....	80
6.2. Procedimentos Experimentais.....	82
6.2.1. Ensaio de aderência/viabilidade das células Vero.....	82
6.3. Caracterizações dos scaffolds e controle com células Vero:	83

<i>6.4. Resultados e discussão</i>	85
<i>6.4.1. Ensaio de aderência/viabilidade das células Vero</i>	85
<i>6.5. Considerações finais</i>	95
<i>Capítulo 7</i>	96
CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	96
<i>Referências</i>	100
<i>Anexo I</i>	111

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL



1.1. Considerações Gerais

Filmes com poros ordenados são estudados devido a sua potencial utilização na preparação de catalisadores, em revestimentos antireflexivos^{[1]-[4]}, dispositivos optoeletrônicos, sensores, microlentes^{[5]-[10]} membranas e meios de cultura de células^{[11]-[13]}.

Várias metodologias têm sido desenvolvidas ao longo das últimas décadas para a obtenção de superfícies porosas: as técnicas de litografia e os métodos baseados na automontagem de padrões^{[14]-[19]}. No entanto, estes modelos apresentam desvantagens por serem de alto custo e não possibilitam controlar dinamicamente o diâmetro dos poros^{[20]-[22]}.

Neste sentido, o método desenvolvido por François e colaboradores, denominado de breath figure^{[23]-[26]}, tem sido utilizado nos últimos anos como alternativa para formar micro e nanoporos ordenados com diâmetros que variam de 0,2 a 20 μm ^[27] na superfície de materiais poliméricos^{[28]-[32]}. Esse método permite a formação de matrizes hexagonais bem ordenadas na superfície de polímeros por meio de um processo simples, rápido, dinâmico, econômico e reproduzível, que envolve a condensação de gotículas de água na superfície de uma solução polimérica durante a secagem do solvente^{[33], [34]}. O fator chave desta técnica envolve a estabilização da gotícula de água condensada na solução volátil. O termo breath figure foi originalmente inserido a partir da observação de que respiração gera gotas de água organizadas sobre uma superfície sólida e fria.

Alguns autores^[35-37] demonstram especial interesse na aplicação biológica dos filmes poliméricos porosos e estruturados como biomateriais, tais como suportes

celulares (scaffolds). Os scaffolds podem ser estruturados de forma personalizada para várias linhas celulares mediante a adaptação da topografia da superfície, tais como a porosidade, o tamanho dos poros e a molhabilidade.

1.2. Diferentes abordagens de sínteses de materiais estruturados

As diferentes técnicas descritas na literatura para a síntese de materiais estruturados incluem a litografia macia ^[38], separação de microfases dos copolímeros ^[39], filmes Langmuir-Blodgett ^[40], e a fotolitografia que é o sistema mais usado para fabricar materiais porosos de forma convencional.

O mecanismo utilizado na fotolitografia é baseado no processo de irradiação de áreas seletivas sobre a superfície. Uma vez que a superfície é exposta à radiação, apenas as áreas irradiadas são estáveis e subsequentemente, torna-se um modelo para o padrão. As áreas não expostas são solúveis em solventes, e podem ser removidas do material. Filmes estruturados com uma resolução menor do que 100 nm são obtidos por esta abordagem.

A técnica de fotolitografia permite a formação de padrões altamente precisos e exatos com micro-resolução sobre uma superfície, um exemplo é a fabricação de chips de computadores. No entanto, a fotolitografia tem algumas limitações. Em primeiro lugar, o custo de funcionamento é significativamente elevado, pois a técnica exige uma sala dispendiosamente limpa para controlar a poeira na atmosfera, evitando assim que as partículas de poeira fiquem sobre a superfície. Além disso, os produtos químicos usados no processo são de toxicidade considerável, fator que influencia as seleções de biomoléculas que podem ser imobilizadas sobre o material ^[41-43].

A litografia macia é outra técnica popular para fabricar substratos porosos usando moldagem com base nos materiais rígidos inorgânicos. Essa técnica é mais simples de operar em comparação com a fotolitografia, pois os complicados processos de preparação do molde não são necessários. A simplicidade deste processo leva um menor tempo, trabalho e custos. No entanto, uma limitação típica da litografia macia está relacionada à propriedade elástica do material macio (como o polidimetilsiloxano, (PDMS)) que muitas vezes se colapsa, promovendo a formação de defeitos nos padrões.

O uso das técnicas litográficas permitem gerar padrões precisos e pequenos, no entanto, a fabricação de substratos maiores com resolução nanométrica para a comercialização ou outras aplicações ainda é um desafio.

As abordagens, tais como a auto-montagem de gotas de água sobre um substrato (técnica do breath figure) é muito simples, desde que as gotas de água condensadas desempenhem o papel de um molde para padronização. O passo de remoção do molde por calcinação ou extração por solvente é eliminado. Além disso, o tamanho dos poros pode ser facilmente controlado por condições externas, tais como umidade e concentração da solução polimérica. O método de breath figure excede todas as outras técnicas em simplicidade e versatilidade. No entanto, o padrão obtido é usualmente limitado a matrizes hexagonais de poros nos tamanhos micros e nanométricos ^[23-32].

1.3. O método *breath figure*

A montagem de padrões pelo método *breath figure* envolve a condensação de vapor de água na forma de gotículas. A condensação do vapor de água em gotas está na base da formação do orvalho, nuvens, chuva, nevoeiro, gotas de água em um copo de cerveja gelada e do *breath figure* ^[43,44]. Em cada um destes processos, os padrões específicos observados e a distribuição de tamanho alcançada são resultados da interação entre a massa e a transferência de calor associado com a transição de fase do vapor para a fase líquida, conforme as propriedades de molhagem do substrato. A nucleação e crescimento de gotículas em substratos sólidos expostos ao vapor saturado têm sido estudados extensivamente no contexto da formação de orvalho e do *breath figure* ^[45-56].

A condensação do vapor de água sobre superfícies frias, como em uma bebida fria é visível na maioria dos dias. Da mesma forma, a formação de orvalho durante a noite ocorre quando superfícies frias - pétalas, folhas, galhos, teias de aranha – são postos em contato com o ar. Estes fenômenos são resultados do arrefecimento do vapor dentro da vizinhança da superfície. A temperatura na qual gotas condensadas aparecem em uma superfície é chamada de ponto de orvalho.

Embora os pontos de orvalho e fenômenos de respiração tenham sido observados desde a antiguidade, seu estudo científico começou a ser atribuído com o trabalho precoce de Waller em 1846 ^[44] e por uma série de artigos de Aitken e Rayleigh em 1911 ^[45-47]. Vários artigos publicados nos subsequentes 75 anos mencionam o método *breath figure* no contexto de modificações das superfícies ^[57-58] ou então para gerar padrões esféricos distribuídos aleatoriamente utilizados no estudo de difração ^{[59-}

^{60]}. No entanto, o primeiro estudo quantitativo do método breath figure, como sistema representativo de transições de fase que implica a formação de gotas de líquido sobre substratos sólidos foi realizada por Beysens e Knobler em 1986 ^[48]. Esses pesquisadores e colaboradores estudaram a formação do breath figure sobre diversos sólidos, bem como em substratos líquidos ^[52]. Dessa forma, os mesmos conseguiram entender os processos essenciais que estão envolvidos nos padrões do breath figure em filmes poliméricos. .

A síntese baseia-se na interação do ar úmido na superfície da solução diluída de polímero em um solvente volátil. O resultado é a condensação e crescimento de gotículas de água que se automontam em uma estrutura hexagonal. Após evaporação completa do solvente, as gotículas de água evaporam, deixando uma matriz impressa de orifícios no filme polimérico. O processo é concluído em poucos minutos, e resulta na criação de uma estrutura porosa altamente ordenada.

1.4. Mecanismo de formação do breath figure

Apesar de intensa pesquisa, o mecanismo exato da técnica do breath figure ainda não está claro. Até o momento, três possíveis teorias têm sido propostas na tentativa de explicar a formação do breath figure. A explicação de Srinivasarao e colaboradores ^[27] é baseada na superfície fria do polímero (solvente volátil) que conseqüentemente conduz à nucleação (isolamento) de gotas de água. Ao longo do tempo, gotículas de água podem crescer. A evaporação rápida e o fluxo de ar sobre a superfície promovem correntes convectivas no solvente e, subseqüentemente, auxilia as gotículas de água na formação da matriz hexagonal. Após as gotas de água estarem ordenadas na solução, a superfície da solução está disponível para a

nucleação e crescimento de gotículas de água para formar outro conjunto ordenado. A evaporação de solvente é então seguida pela evaporação da água. Como resultado, um filme altamente ordenado e poroso são formadas sobre o substrato (**Figura 1.1**)^[27]

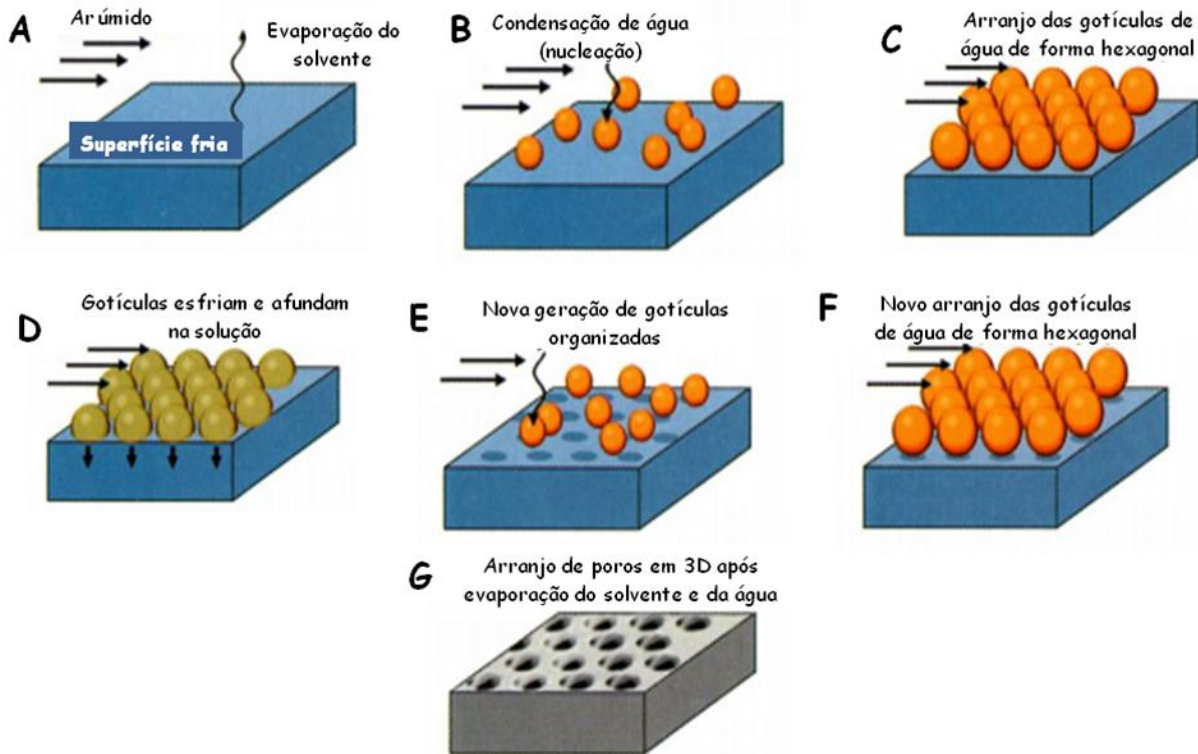


Figura 1.1- Mecanismo do breath figure sugerido por Srinivasarao e colaboradores. O esquema foi adaptado a partir da versão original^[27].

A proposta de Pitois e François é uma explicação bastante diferente: gotículas de água condensadas de tamanho micrométrico não flutuam na superfície, mas ficam em contato com a mesma (**Figura 1.2**)^[26]. Em seguida, o polímero precipita na interface da solução de polímero e da água, assim a solução de polímero se propaga em direção as gotículas de água. Da mesma forma, uma camada sólida é formada para não permitir a coalescência de gotículas.

O arranjo hexagonal é formado após a evaporação da água pela explosão da camada de polímero na parte superior de gotículas depois da completa evaporação do solvente. A matriz altamente ordenada é resultado das correntes de convecção na superfície e as forças de capilaridade [26].

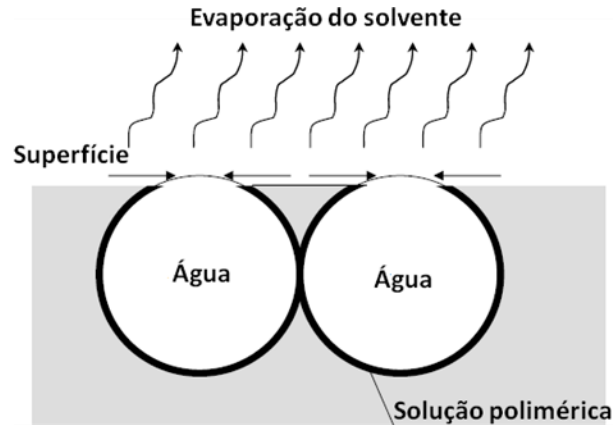


Figura 1.2- Esquema do mecanismo de formação das membranas propostos por Pitois e François. O esquema foi adaptado a partir da versão original [26].

Por último, Shimomura e colaboradores [61] explicam o mecanismo de formação do breath figure com base na termocapilaridade e nas forças de Marangoni (**Figura 1.3**). As flutuações e a ordenação das gotículas de água não são observadas na superfície. A termocapilaridade e as forças de Marangoni não só conduzem as gotas de água a submergir dentro da solução polimérica como também induz o padrão hexagonal na superfície [61].

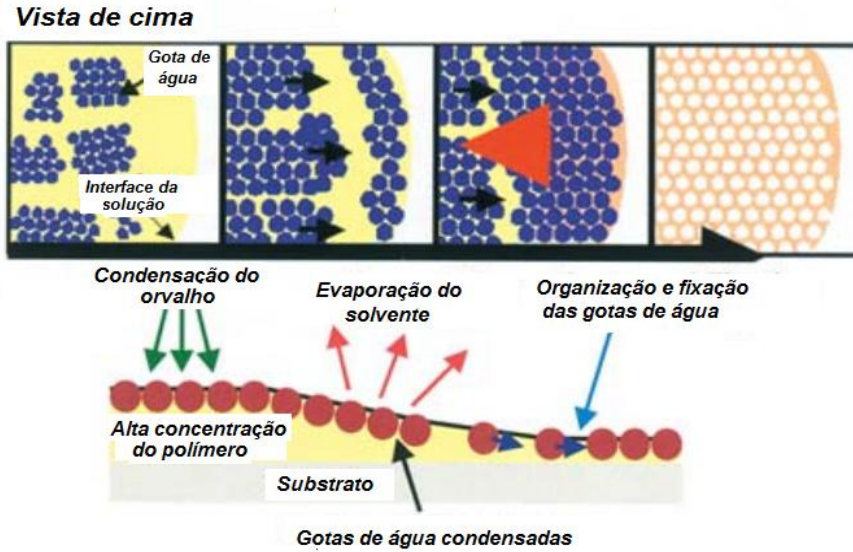


Figura 1.3- Mecanismo de Shimomura na formação do breath figure de um complexo poli-iônico. O esquema foi adaptado a partir da versão original ^[61]

As três rotas mecânicas apresentam explicações muito diferentes como a flutuação, o contato com a superfície e as gotas de água submersas. No entanto, eles compreendem o encapsulamento de gotículas de água por meio da precipitação de um polímero na solução água/interface, resultando na não coalescência das gotículas. Da mesma forma, a proposta dos três mecanismos concorda que os efeitos de convecção, força de Marangoni e termocapilaridade são fatores cruciais na formação de materiais porosos altamente ordenados. Até agora, é difícil revelar o mecanismo exato de uma possível proposta.

1.5. Parâmetros que influenciam a formação do breath figure

Vários parâmetros podem afetar a formação dos poros, tais como a concentração de polímero, o solvente, o substrato, o gradiente de temperatura entre a solução polimérica e as gotículas de água e a umidade relativa do ar ^{[22], [62]-[66]}.

Uma variedade de polímeros incluindo homopolímeros lineares ^[27], copolímeros em bloco, homopolímeros ou copolímeros estrelas ^[23] e complexos anfifílicos poliânicos

[17] são capazes de formar estruturas porosas e ordenadas pelo método breath figure, utilizando solventes apropriados. Dados da literatura revelam que dentre os polímeros estudados na formação dos poros ordenados, os mais utilizados são os que possuem o PS como um dos seus componentes [36]. Alguns trabalhos demonstram que não é possível formar poros ordenados com PS linear sem modificações na maioria das condições estudadas [23, 25, 26]. Entretanto, essa formação pode ocorrer pelo método de solvent casting com o solvente clorofórmio [27].

Os solventes mais comumente utilizados na obtenção dos filmes porosos são altamente voláteis, têm baixos pontos de ebulição, limitada ou baixa miscibilidade em água e são bons solventes para os polímeros escolhidos. Entre eles estão o dissulfeto de carbono, benzeno, clorofórmio, diclorometano, 1,2 - dicloroetano e 1,1,2 triclorotrifluoroetano [22]

O substrato mais utilizado para suportar os filmes poliméricos porosos obtidos pelo método breath figure é o vidro [67]. Nesse trabalho diferentes substratos poliméricos serão avaliados.

1.6. Poliestireno

O poliestireno é um polímero obtido pela polimerização do estireno (um líquido oleoso, incolor e de cheiro penetrante). O estireno é um derivado insaturado do benzeno. O poliestireno foi fabricado pela primeira vez em 1929, tendo sido o primeiro polímero a ser produzido industrialmente [68].

A sua unidade fundamental é formada por dois grupos $-CH_2$ com um anel benzênico unido lateralmente. O poliestireno é material transparente como o vidro, sólido, brilhante, inodoro, não prejudicial à saúde, resistente à umidade. Mediante um

processo análogo ao da formação de uma espuma, obtém-se o poliestireno expandido, vulgarmente denominado de esferovite, que é um material leve e esponjoso, muito utilizado como isolante e em embalagens ^[69]. Além da sua principal aplicação como isolante, é ainda utilizado em materiais eletrônicos, objetos de consumo, vernizes de resina, bijuterias e como placas de cultura celular. Por fusão, fiação e estiramento do poliestireno obtêm-se fibras e filamentos resistentes e estáveis frente a uma série de ambientes.

As principais características do poliestireno são: fácil processamento por moldagem a quente, fácil coloração, baixo custo, transparente como o vidro, elevada resistência a álcalis e ácidos, baixa densidade e absorção de umidade, baixa resistência a solventes orgânicos, calor e intempéries ^[70].

1.7. Cultura de células

O cultivo celular é um método descoberto por cientistas japoneses em 1961, e utiliza células oriundas de animais ou vegetais. Baseia-se na capacidade das células multiplicarem-se em uma placa de cultura de tecidos em condições adequadas, fora de um organismo vivo e mantendo suas características próprias. A cultura de tecidos implica em uma desagregação anterior, mecânica ou enzimática do tecido original e o cultivo de tais células é feito em uma camada aderente, em um substrato sólido ou em suspensão em uma cultura. Portanto, células adultas apresentando funções específicas voltariam a ter características embrionárias e com isso restaurariam sua capacidade de produzir um novo ser. Os experimentos com cultura de células podem ser feitos *in vitro* ou *in vivo*. O termo *in vitro* é aplicado para reações bioquímicas que ocorrem fora da célula viva, enquanto o termo *in vivo* é aplicado para qualquer reação que ocorra

dentro de uma célula viva ^[71]. A cultura de células deve ser feita em condições ótimas de temperatura conforme o tipo de células em estudo, assim como devem ser mantidas condições adequadas de pH.

Para as células se manterem vivas uma nutrição adequada com aminoácidos e carboidratos deve ser fornecida as células da mesma forma como se as mesmas estivessem dentro de um organismo vivo. Desde os primeiros experimentos com células em cultura, ficaram evidentes as transformações significativas ocorridas quando as células foram mantidas fora do organismo de origem. Em alguns casos, ocorre um processo de degeneração e posteriormente a morte. Em outros casos, as células modificam-se e se tornam cancerígenas e conseqüentemente, acabam se proliferando intensamente. Em determinadas circunstâncias podem passar por um processo chamado de diferenciação celular, transformando-se em células com funções mais especializadas ^[74].

O cultivo de células é um modelo de função fisiológico muito contraditório, devido à perda de características que ocorre durante o seu desenvolvimento em cultura. A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*. Assim, por mais próximo que esse modelo esteja da realidade, o processo *in vitro* ainda causa problemas para o desenvolvimento celular. Sua adesão célula-célula e célula-matriz são reduzidas, além de não possuir as características (heterogeneidade e arquitetura tridimensional) de um tecido *in vivo*, uma vez que seu meio nutricional e hormonal está modificado ^[72].

Células que, num momento anterior, cresciam tridimensionalmente agora se encontram em um meio que favorece o espalhamento, a migração e a proliferação de células não especializadas que expressem diferentes funções.

1.8. A importância dos scaffolds na cultura celular

O cultivo celular é um processo complexo pelo qual as células são cultivadas sob condições controladas, geralmente fora do seu ambiente natural e em substratos com apenas duas dimensões, o que acarreta dificuldades no seu estudo e viabilidade [73]. Assim, a escolha do meio ideal é um caminho a se seguir para a obtenção de uma cultura que expresse uma função específica. Em relação à arquitetura tridimensional as matrizes extracelulares (MEC), também denominadas scaffolds são bastante utilizadas para promover três dimensões nos substratos, podendo ser aplicadas na cultura de células e na engenharia de tecidos [74].

A matriz extracelular de um tecido natural é uma mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, lipídeos, glicolipídeos e mucopolissacarídeos. As macromoléculas que constituem a matriz são secretadas por células locais, especialmente fibroblastos. Essa matriz contém três importantes proteínas fibrosas que são o: colágeno, elastina e fibronectina, as mesmas estão contidas em um gel hidratado formado por uma rede de cadeias de glicosaminoglicanos. Todas essas macromoléculas são secretadas localmente pelas células em contato com a matriz.

Scaffolds na escala micrométrica não apresentam resultados tão relevantes quando comparados com os scaffolds em escala nanométrica. Este fenômeno pode ser justificado devido aos materiais nanométricos possuírem maior superfície de contato, maior rugosidade e maior área de superfície em relação ao volume [75]. Nesse sentido, os nanoscaffolds possuem grande potencial para mimetizar com maior eficiência, que os microscaffolds, as propriedades de superfície (topografia, energia, entre outros) de MECs naturais, uma vez que as células interagem com a MEC por meio de

nanoproteínas (por exemplo, fibrilas de colágeno possuem uma gama de diâmetros que estão entre 50 a 200 nm, fibronectinas que estão entre 60 a 70 nm de comprimento e possuem de 2 a 3 nm de espessura) que respondem aos estímulos das diversas atividades celulares, modulando o ambiente ^[76].

Em geral, os metais, cerâmicas e polímeros são potenciais candidatos como biomateriais. Os polímeros são os melhores biomateriais para scaffolds, uma vez que conseguem preencher os requisitos necessários que são: alta porosidade e tamanho de poros controlados, biodegradabilidade, integridade mecânica mantendo a estrutura desejada, biocompatibilidade e interação positiva com células incluindo maior crescimento celular, adesão, migração e função diferenciada.

1.9. Importância da cultura de células e linhagem de células Vero

Existem muitas vantagens no uso da cultura de células como modelo experimental, tais como, o controle do ambiente de preparo, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia. Atualmente, com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa.

Outra importante contribuição do cultivo de células está relacionada com o uso e aperfeiçoamento da mesma em monocamadas aos quais promoveram grandes descobertas científicas como, por exemplo, a produção em larga escala de vacinas antivirais, maior compreensão dos mecanismos moleculares da célula e de fenômenos de neoplastia, estudo de imunologia e ensaios de fármacos e cosméticos *in vitro* ^[77].

Dessa forma, pretende-se aplicar os poros obtidos pelo método breath figure como micro e nanoscaffolds em culturas celulares.

Em 1962, pesquisadores no Japão, estabeleceram a linhagem Vero oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Esta linhagem de células foi cultivada neste trabalho, pois essa é uma das poucas células aprovadas para o uso em produção de vacinas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que a torna um excelente modelo de pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas. Atualmente, as células Vero são utilizadas em vacinas antirrábicas, contra febre amarela e H1N1 [72].

A quantificação do crescimento celular, incluindo proliferação e viabilidade, tornou-se uma ferramenta essencial em qualquer trabalho de laboratório baseado em estudos celulares.

1.10. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver filmes micro e nanoporosos de PS pelo método breath figure, suportados em substratos de: PEBD, PET, PTFE e PDMS (virgens e com tratamento prévio) e do vidro.

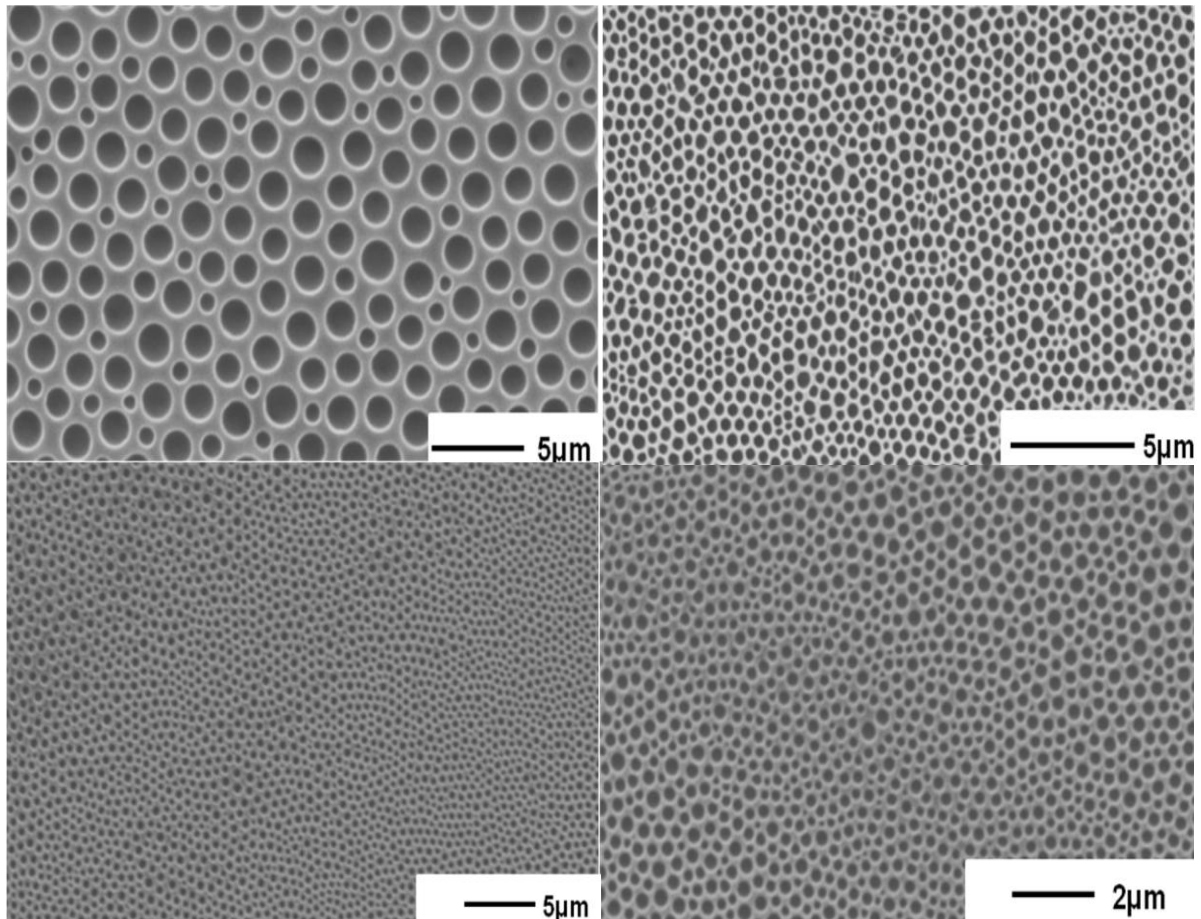
Os objetivos específicos foram:

(i) Analisar a influência dos fatores: método de secagem, velocidade do spin coating, tipo de substrato, solvente e concentração da solução do PS relacionados à formação, diâmetro médio e profundidade média dos micro e nanoporos nos filmes de PS;

(ii) Avaliar o potencial dos materiais produzidos na mimetização de matrizes extracelulares (do inglês “scaffolds”) por meio da adesão e viabilidade das células Vero.

Capítulo 2

SÍNTESE DE MICRO E NANOPOROS DE PS SOBRE PET - EFEITO DA VELOCIDADE DO SPIN COATING



2.1. Considerações iniciais

Fatores como massa molar e polidispersão do poliestireno influenciam na formação dos filmes poliméricos porosos e estruturados, sintetizados pelo método breath figure ^[78,79]. Assim, essas características do polímero foram analisadas previamente.

Nesse capítulo serão analisados os métodos de secagem estática (solvent casting) e dinâmica (spin coating) em relação à formação, diâmetro, profundidade média e molhabilidade dos filmes de PS micro e nanoporosos. A temperatura, a umidade relativa do ar, o substrato, a concentração de PS e o solvente foram mantidos constantes em todos os experimentos, uma vez que influenciam diretamente na organização das gotículas de água bem como na formação de poros no PS. Vale ressaltar que nesse trabalho priorizaram-se procedimentos de boa reprodutibilidade, de fácil execução e envolvendo reagentes de baixo custo.

2.2 Parte experimental

2.2.1. Materiais

Poliestireno – PS (Sigma Aldrich), massa molar média entre 4.000 a 200.000 Da, Polietileno de baixa densidade – PEBD (Sigma Aldrich), Poli (tereftalato de etileno) - PET (Comercial Mylar), Polidimetilsiloxano - PDMS (Sylgard 184), Tetrahidrofurano P.A - THF (Nuclear). Todos os reagentes foram utilizados sem tratamento prévio.

2.2.2 Análise do PS

2.2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de H (RMN ¹H)

O espectro de RMN ¹H do PS foi obtido em um espectrômetro da marca Varian, modelo Mercury Plus 300 MHz. Para a obtenção do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), 20 mg de PS foram solubilizadas em 0,7 mL de tetrahidrofurano deuterado. Os parâmetros principais para as análises foram: temperatura ambiente (22 ± 2 °C), tempo de aquisição (at) de 2,0 s, pulso (pw) de 45°, 128 repetições e uma faixa espectral (sw) de 0 a 12 ppm e TMS como referência interna.

2.2.3. Substratos

2.2.3.1. Filmes de PET

Filmes de PET comercial com espessura de 111 ± 1 µm foram cortados na dimensão de 3 cm x 3 cm. O processo de limpeza da superfície dos filmes foi realizado em um extrator Soxhlet por 24 horas, utilizando acetona como solvente.

2.2.3.2. Filmes de PEBD

Os filmes de PEBD foram preparados utilizando PEBD na forma de *pellets*, em que a temperatura de fusão varia entre 104 a 115 °C. Os *pellets* foram colocados em um espaçador retangular de 3 cm x 3 cm e levados a uma prensa com aquecimento. Os pellets foram submetidos à pressão de 30,1 MPa na temperatura de 120 °C por 3 minutos e em seguida resfriados a temperatura ambiente. Os filmes possuem espessura de $718 \pm 54 \mu\text{m}$. O processo de limpeza da superfície dos filmes foi realizado em um extrator Soxhlet por 24 horas, utilizando acetona como solvente.

2.2.3.3 Filmes de PDMS

Os filmes de PDMS foram preparados com uma mistura líquida 10:1 (m/m) de elastômero (184) e agente de cura (sylgard), respectivamente. Para remover as bolhas contidas na mistura foi utilizada uma câmara de vácuo. Em seguida, a mistura foi colocada na placa de Petri e curada a 90° C por 3 horas. A dimensão dos filmes de PDMS foram de 3 cm x 3 cm com espessura de $2,46 \pm 0,4 \text{ mm}$. O processo de limpeza da superfície dos filmes foi realizado em um extrator Soxhlet por 24 horas, utilizando acetona como solvente.

2.2.4. Filmes de PS sobre substratos poliméricos - secagem estática (solvent casting)

Sobre um filme de PET foi adicionado 150 μL de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF. A secagem da solução de PS foi realizada de forma estática. O experimento foi realizado a 25 °C com umidade relativa do ar igual a 81% (solução saturada de sulfato de amônio). O mesmo procedimento foi realizado com os polímeros PEBD e PDMS como substratos.

2.2.5. Síntese de micro e nanoporos de PS sobre PET- secagem dinâmica- efeito da velocidade do spin

Sobre um filme de PET, colocado no equipamento spin coating (Modelo: SCS G3P-8 Spincoat Speciality Coating Systems), foram adicionados 150 μ L de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF. O sistema foi rotacionado por 10 s a 1000 rpm. O mesmo procedimento foi repetido para as rotações de 3000, 5000 e 9000 rpm. Os experimentos foram realizados a 25 °C com umidade relativa do ar igual a 81% (solução saturada de sulfato de amônio).

2.3. Caracterizações dos filmes de PS porosos

A morfologia dos filmes de PS foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando equipamento da marca Shimadzu, modelo SS 550 Superscan. Os parâmetros utilizados foram: voltagem de aceleração de 10 kV e intensidade de corrente de 41 μ A. A superfície das amostras foi previamente coberta com uma fina camada de ouro. Imagens de MFA e valores da rugosidade média das superfícies foram obtidas em equipamento Shimadzu SPM-9500J3. Para determinar a espessura das camadas de PS depositadas sobre os substratos poliméricos, as amostras foram cortadas verticalmente com espessura de 120 nm em um ultramicrótomo. Em seguida, foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) - JEM-1400, JEOL, aplicando uma voltagem de aceleração de 80 kV. A molhabilidade dos filmes porosos foi determinada pelo equipamento de medida de ângulo de contato estático (Tantec, Model Cam-Micro).

2.4. Resultados e discussão

2.4.1 Análises do PS

A técnica RMN ^1H foi utilizada para caracterizar o PS (**Figura 2.1**). Analisando a **Figura 2.1** é possível identificar os picos em δ 2,7 e 4 que são referentes ao THF deuterado. No espectro também é possível identificar a ressonância esperada para os prótons aromáticos do PS com o aparecimento dos sinais em δ 7,0 e 7,50, sendo esses referentes aos prótons aromáticos não simétricos do PS. O sinal em δ 1,90 é característico dos prótons metilênicos e o sinal em δ 2,40 é referente a grupos CH ligados diretamente ao anel aromático.

Pode-se verificar na **Figura 2.1** a presença de picos alargados, devido à combinação do acoplamento spin-spin e às diferentes configurações do mesmo ^[80].

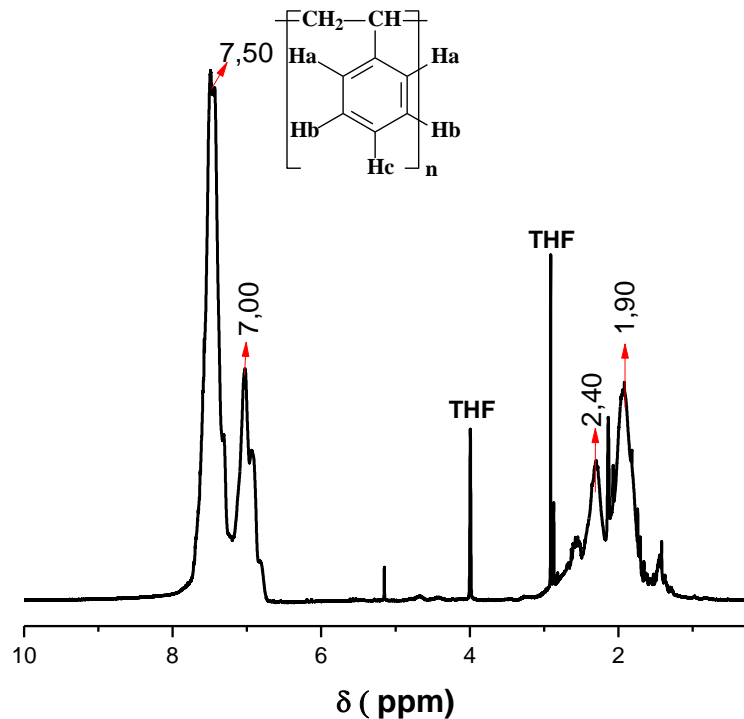
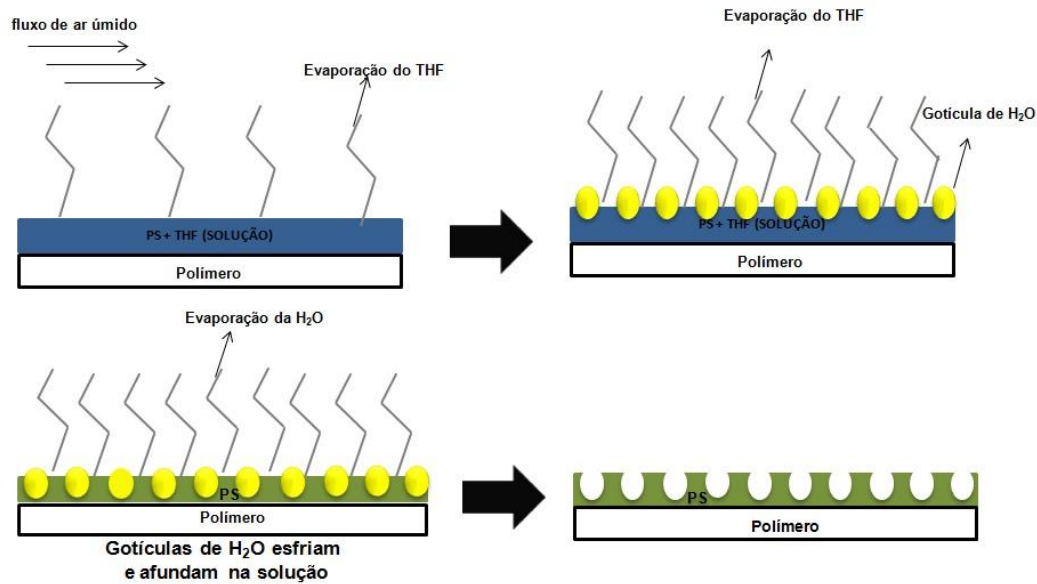


Figura 2.1 – Espectro de RMN ^1H do PS.

2.4.2. Mecanismo proposto

O método de modelagem dinâmica breath figure foi escolhido, pois permite a formação de micro e nanoporos em superfícies poliméricas em uma única etapa e sem resíduos de solvente. Assim, os nanoporos formados podem ser aplicados em membranas^[81] e scaffolds^[82].

No **Esquema 2.1** é apresentado o mecanismo esperado de formação dos poros de PS sobre os polímeros, por meio do método breath figure que está de acordo com Srinivasarao e colaboradores^[27]. Na primeira etapa ocorre a evaporação do solvente (THF) que esfria a superfície da solução de PS/THF iniciando assim a nucleação e crescimento de gotículas de água. Devido às correntes de convecção que surgem a partir da evaporação bem como o fluxo de ar que passa pela superfície, durante o processo de spin coating gotículas de água se organizam como uma matriz hexagonal e em seguida penetram na solução PS/THF. Após a evaporação do solvente, o filme retorna à temperatura ambiente, permitindo assim que as gotículas de água evaporem, formando poros na monocamada de poliestireno depositada sob os polímeros. A autorremoção das gotículas de água elimina a necessidade de etapas posteriores. Esse fato faz com que o método breath figure seja realizado em um menor tempo e custo de produção.



Esquema 2.1- Modelo do mecanismo de formação dos nanoporos de poliestireno pelo método breath figure. As imagens são codificadas, com **azul** e **amarelo** denotando temperaturas baixas e elevadas, respectivamente, em relação à temperatura ambiente (**verde**).

2.4.3 Filmes de PS sobre substratos poliméricos - secagem estática (solvent casting)

A morfologia obtida após a deposição de solução 10% (m/v) de PS em THF com secagem estática sobre os polímeros PET, PEBD e PDMS foi verificada por MEV. Na **Figura 2.2** são apresentadas as micrografias de MEV dos polímeros virgens: PET **(a)**, PEBD **(c)** e PDMS **(e)** e dos polímeros após deposição de uma solução de 10% m/v de PS com THF pelo método solvent casting PET **(b)**, PEBD **(d)** e PDMS **(f)**.

Nas **Figuras 2.2 (a), (c) e (e)** verifica-se que a morfologia da superfície dos polímeros virgens é lisa e homogênea. Os polímeros após a deposição da solução de PS **(Figuras 2.2 (b) (d) e (f))** formam pontos na superfície sem ordem específica. Portanto é possível postular que a secagem estática da solução de PS/THF não é eficiente para a formação de micro e nanoporos com os polímeros PET, PEBD e PDMS como substratos.

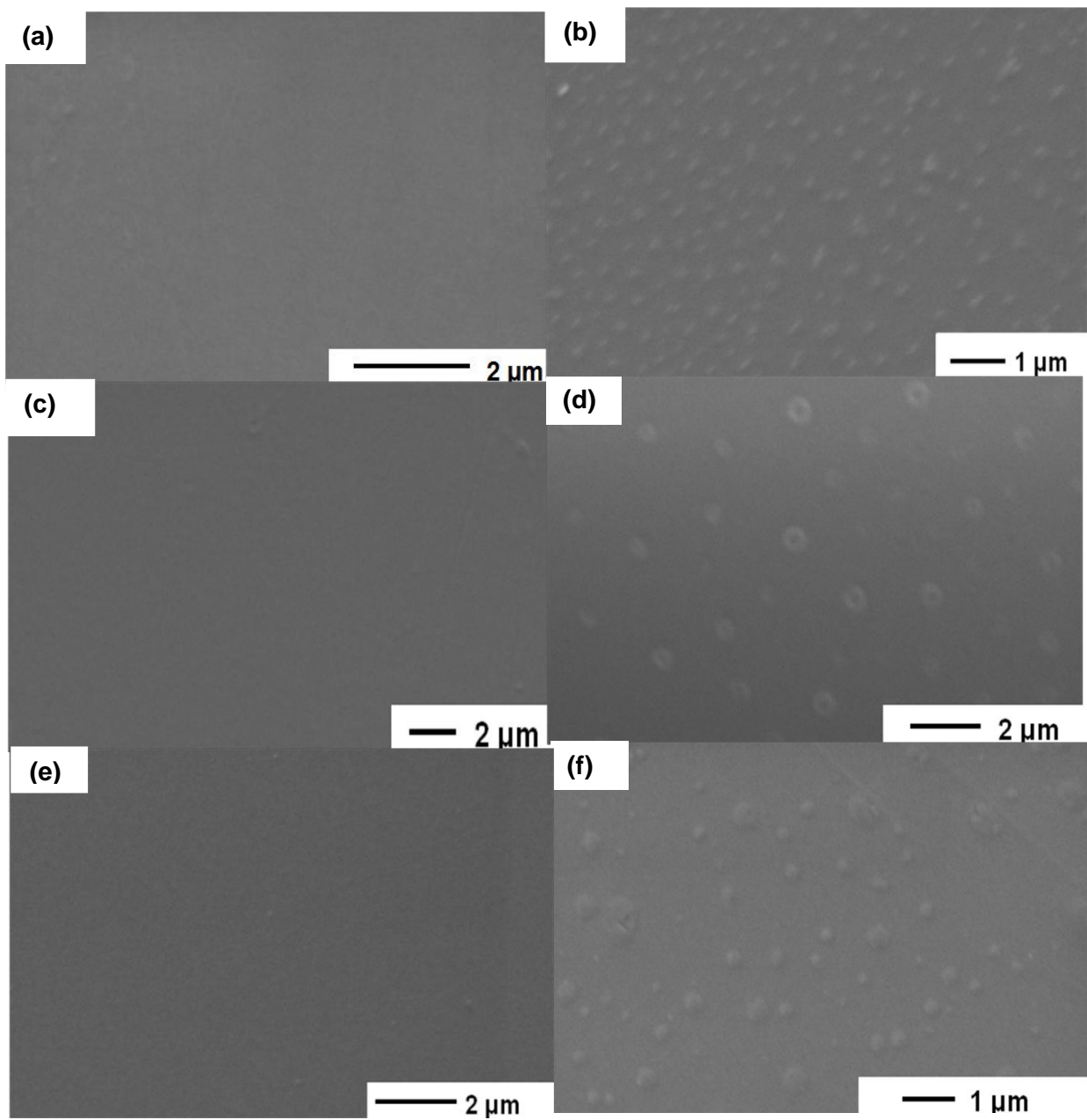


Figura 2.2 - Micrografias de MEV dos polímeros virgens **(a)** PET, **(c)** PEBD e **(e)** PDMS e dos polímeros **(b)** PET, **(d)** PEBD e **(f)** PDMS após deposição de uma solução de 10% m/v de PS com THF pelo método solvent casting.

2.4.4 Síntese de nanoporos de PS sobre PET - efeito da velocidade do spin coating

Na **Figura 2.3** são apresentadas micrografias de MEV após rotação a 1000, 3000, 5000 e 9000 rpm da solução de PS e THF sobre o substrato PET, por spin coating. A partir das imagens da **Figura 2.3** foi possível constatar que houve a formação de micro e nanoporos. O uso do spin coating induziu a formação de padrões organizados diferentemente do que ocorreu com o método de solvent casting. Dessa forma, foi possível obter filmes de PS por meio de um mecanismo complexo que compreende a existência de três processos simultâneos: i) distribuição da solução, ii) equilíbrio entre a viscosidade e força centrífuga e iii) evaporação do fluido^[83].

Foi verificado que a rotação do spin coating influenciou no diâmetro dos nanoporos. Na rotação de 1000 rpm (**Figura 2.3 (a)** e **Figuras I (a) e (b) do Anexo I**) e foi verificado a presença de poros grandes e pequenos. A 3000 rpm (**Figura 2.3 (b)** e **Figura I (c) do Anexo I**) formou-se nanoporos mais homogêneos e com diâmetro médio menor que os nanoporos formados a 1000 rpm. Nas rotações de 5000 e 9000 rpm (**Figura 2.3 (c e d)**) não há diferença significativa no diâmetro médio dos nanoporos e na homogeneidade, já o diâmetro dos poros diminui quando comparados com a rotação de 3000 rpm.

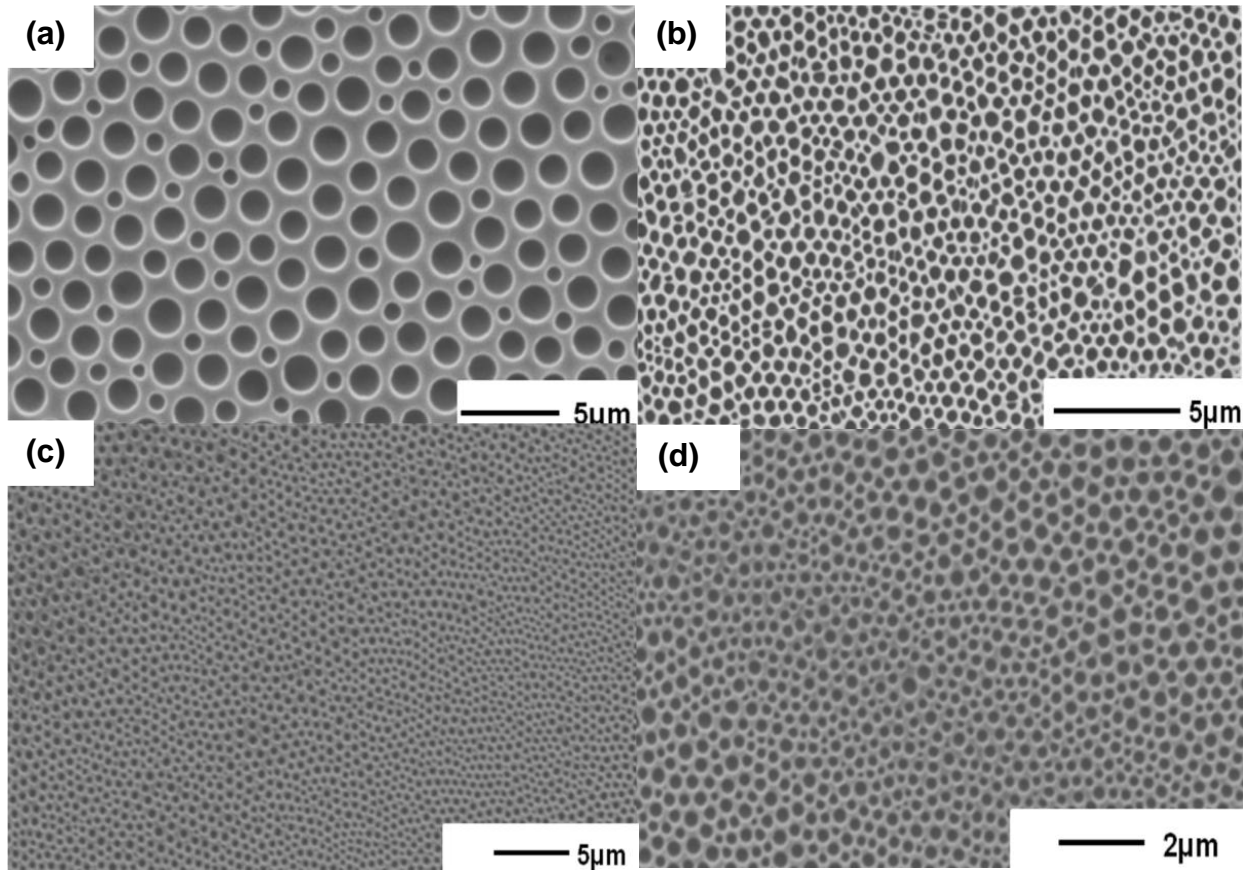


Figura 2.3 – Micrografias de MEV do PET com a 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de (a) 1000 (b) 3000 (c) 5000 e (d) 9000 rpm.

Nas **Figuras 2.4, II do Anexo I e 2.5** são apresentadas imagens de MFA em 3D e em 2D respectivamente, após a rotação em 1000, 3000, 5000 e 9000 rpm da solução de PS e THF sobre o filme de PET, por spin coating. Analisando as micrografias das **Figuras 2.4 e 2.5** é possível observar nitidamente a formação de nanoporos.

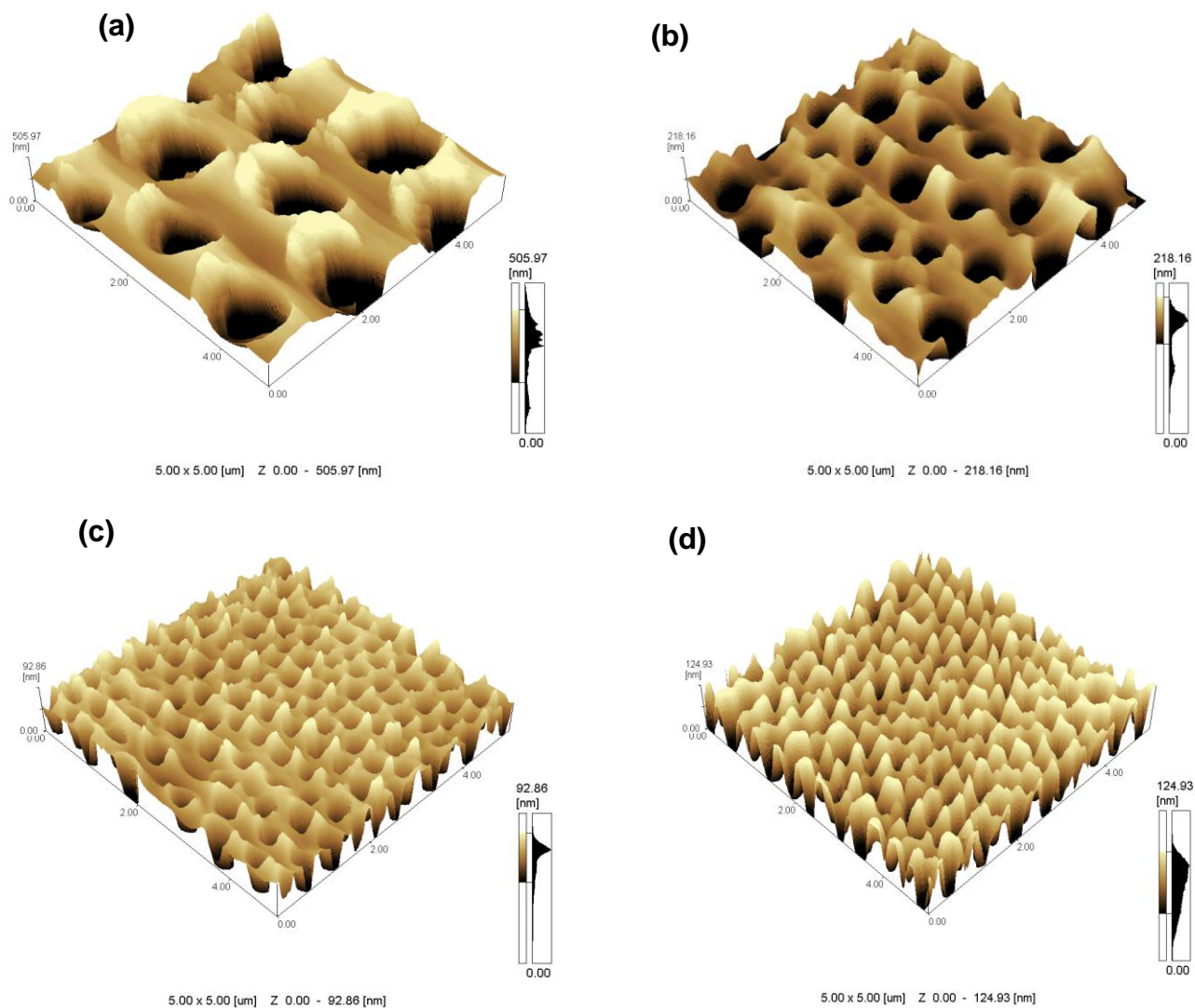


Figura 2.4 – Imagens do MFA em 3D do PET com 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: **(a)** 1000, **(b)** 3000, **(c)** 5000 e **(d)** 9000 rpm.

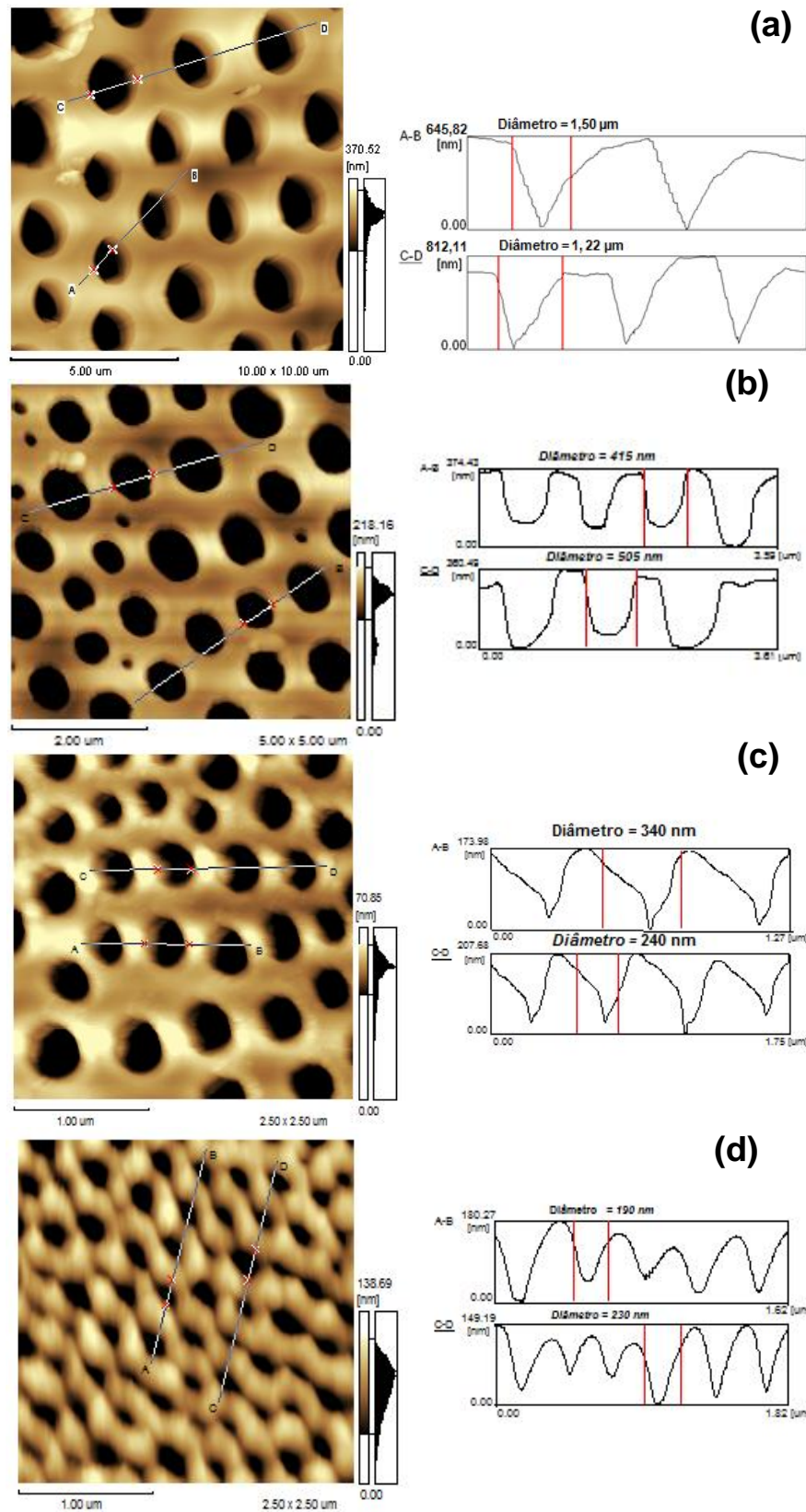


Figura 2.5 - Micrografias do MFA em 2D do PET após deposição de solução 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: (a) 1000, (b) 3000, (c) 5000 e (d) 9000 rpm.

Na **Tabela 2.1** são apresentados os valores da rugosidade (profundidade) média (Ra) dos nanoporos (e **Figura III** do **Anexo I**), correspondentes a média de quatro imagens de MFA nas diferentes rotações bem como o diâmetro médio de 300 nanoporos, observados por MEV. Os histogramas de distribuição do diâmetro médio para o PET com 10% (m/v) de PS em THF nas diferentes rotações estudadas encontram-se na **Figura IV** do **Anexo I**. Foram analisadas também as micrografias do MFA em 2D, com o auxílio das retas A-B e C-D de 10 imagens. O objetivo dessa análise é verificar se a rotação influencia no quanto a gota de água penetra na solução. Para isso determinou-se o diâmetro (d) e a profundidade (p) de cada poro e considerou-se que as gotas de água são esferas perfeitas. Dessa forma, quando o raio (r) era igual à profundidade, isso é $r = p$ considera-se que metade da gota penetrou na solução (**Figura 2.6 (a)**). Quando o raio era maior a profundidade ($r > p$) considera-se que menos que a metade da gota penetrou (**Figura 2.6 (b)**) e quando o raio é menor que a profundidade ($r < p$) considera-se que mais da metade da gota de água penetrou (**Figura 2.6 (c)**).

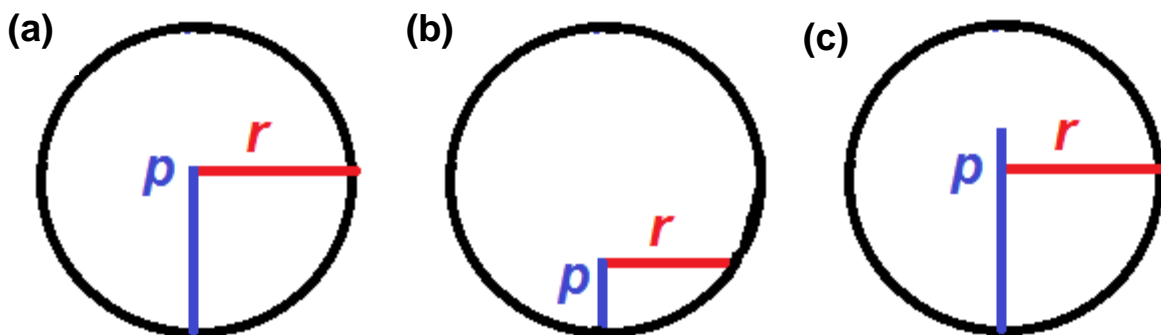


Figura 2.6 – Considerações feitas para atribuir o quanto a gota de água penetrou na solução polimérica, em **(a)** ($r = p$) considera-se que metade da gota afundou na solução; **(b)** ($r > p$) considera-se que menos que a metade da gota afundou e **(c)** ($r < p$) considera-se que mais da metade da gota de água afundou.

Tabela 2.1- Diâmetro e rugosidade média dos nanoporos e o quanto à gota de água penetra na solução polimérica em diferentes rotações na superfície do PET com 10% (m/v) de PS em THF

Rotação (rpm)	Diâmetro médio (nm)	Rugosidade média (Ra) (nm)	Quanto à gota de água penetra na solução
1000	1223 ± 350	130 ± 2,7	Mais da metade
3000	346 ± 63	96 ± 2,5	Mais da metade
5000	256 ± 64	22 ± 3	Metade
9000	202 ± 44	25 ± 2	Metade

De acordo com as imagens de MEV e MFA (**Figuras 2.3 e 2.4 (a) e (b)**) e os dados da **Tabela 2.1** fica evidente que os microporos de PS obtidos a 1000 rpm têm diferença significativa de diâmetro médio e rugosidade média quando comparado aos nanoporos de PS obtidos a 3000 rpm. No entanto, em ambos os casos a gota de água formada na solução polimérica possui o tempo necessário para penetrar em mais da metade na solução.

A diferença de diâmetro médio dos nanoporos de PS formados nas rotações de 3000 e 5000 rpm não é tão grande quanto no caso de 1000 rpm. No entanto, a rugosidade média dos mesmos é bastante diferente sendo que este fato pode ser explicado tomando como base o quanto a gota de água penetra na solução em 3000 rpm (mais da metade), que é maior quando comparado com a de 5000 rpm (metade).

Os nanoporos de PS formados nas rotações de 5000 e 9000 rpm não apresentam diferença significativa no diâmetro médio, rugosidade média e no quanto a gota de água penetra nas distintas rotações de formação e secagem dos filmes de PS.

A redução do diâmetro e profundidade dos nanoporos com o aumento da rotação do spin coating está relacionada ao decréscimo do tamanho das gotículas de água que se condensam na superfície da solução de PS e THF. Esse fato ocorre devido a evaporação do THF ser mais rápida com a maior velocidade de rotação, resultando em tempo insuficiente para o crescimento dos núcleos de gotículas de água^[51]. Em rotações superiores a 5000 rpm a velocidade da evaporação do THF não é alterada significativamente assim, o diâmetro e profundidade dos nanoporos de PS também não sofrem alterações.

A espessura das camadas depositadas de PS sobre o PET nas diferentes rotações foi observada por meio de MET (**Figura 2.7**). Analisando as **Figuras 2.7 ((a), (b), (c) e (d))** pode-se verificar que a camada mais escura corresponde ao filme poroso de PS depositado. Nas rotações de 1000 e 3000 rpm a espessura da camada de PS está em torno de 1 μm . A análise dos filmes obtidos nas rotações de 5000 e 9000 rpm (**Figura 2.7 (d), (e), (f) e (g)**) a camada mais clara corresponde ao filme poroso de PS depositado. Essa mudança de coloração ocorre porque em regiões mais espessas os elétrons se espalham mais, apresentando colorações mais escuras do que nas áreas mais finas na imagem. Assim como nas rotações de 1000 e 3000 rpm a camada depositada (aproximadamente 1 μm) é mais espessa do que em 5000 e 9000 rpm (aproximadamente 100 e 25 nm respectivamente) a coloração mudou de escura para clara.

Por meio destas imagens (**Figura 2.7**) é possível visualizar que nas rotações de 5000 e 9000 rpm a camada depositada possui valores nanométricos, sendo que a partir

da rugosidade média (**Tabela 2.1**) do filme obtido em 9000 rpm é possível inferir que os nanoporos formados alcançam a interface da camada de PS depositada no PET. Dessa forma, os filmes nanoporosos de PS obtidos a 9000 rpm podem ser utilizados como nanofiltros desde que sintetizados em um substrato removível como o gelo.

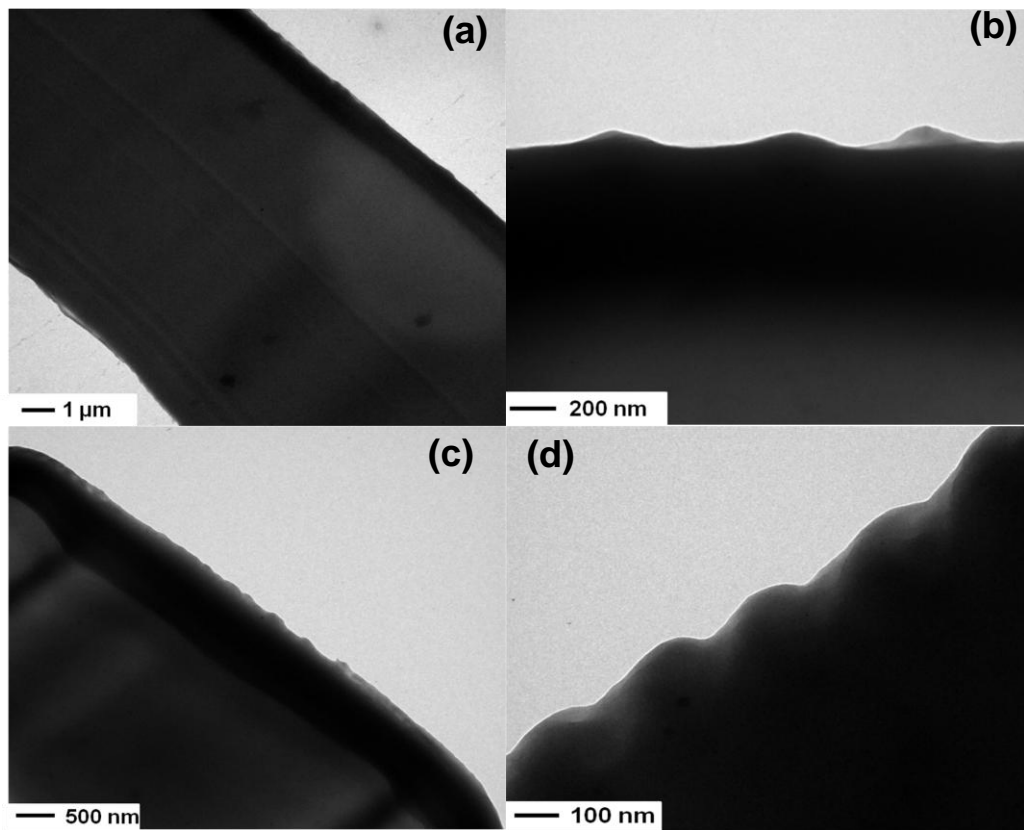


Figura 2.7- Microscopias do MET do PET após deposição de solução 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: **(a)** e **(b)** 1000, **(c)** e **(d)** 3000 rpm.

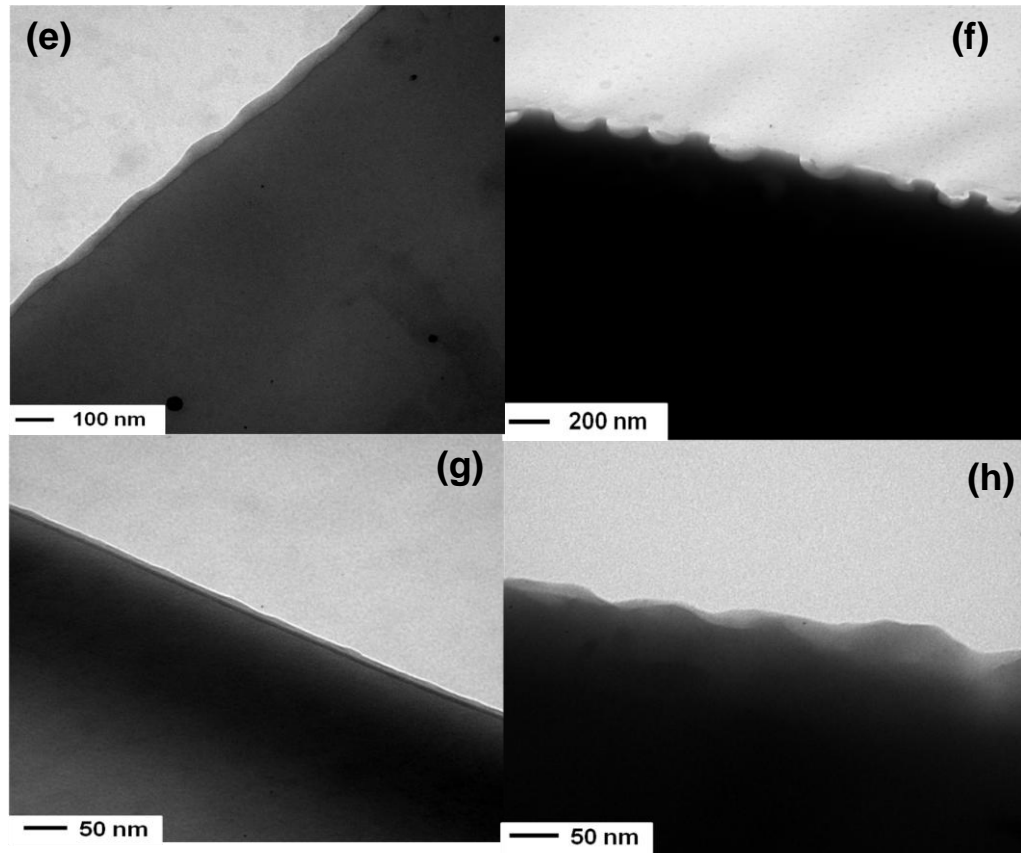


Figura 2.7 (continuação)- Microscopias do MET do PET após deposição de solução 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: (e) e (f) 5000 e (g) e (h) 9000 rpm.

Na **Figura 2.8** são apresentadas imagens do PET antes e após a deposição de uma solução de 10% (m/v) PS/THF nas diferentes rotações estudadas. O fenômeno de iridescência, que pode ser observado no PET após a deposição da solução de PS/THF, ocorre somente em grandes áreas com estruturas altamente ordenadas, pois as mesmas apresentam efeitos de difração e interferência com a incidência de luz ^{[67], [81]}.

Nas amostras obtidas a 5000 e 9000 rpm o fenômeno de iridescência não é tão evidente como em 1000 e 3000 rpm. Este fato é devido à camada depositada de PS ser muito fina, podendo-se observar a transparência do PET ao fundo.

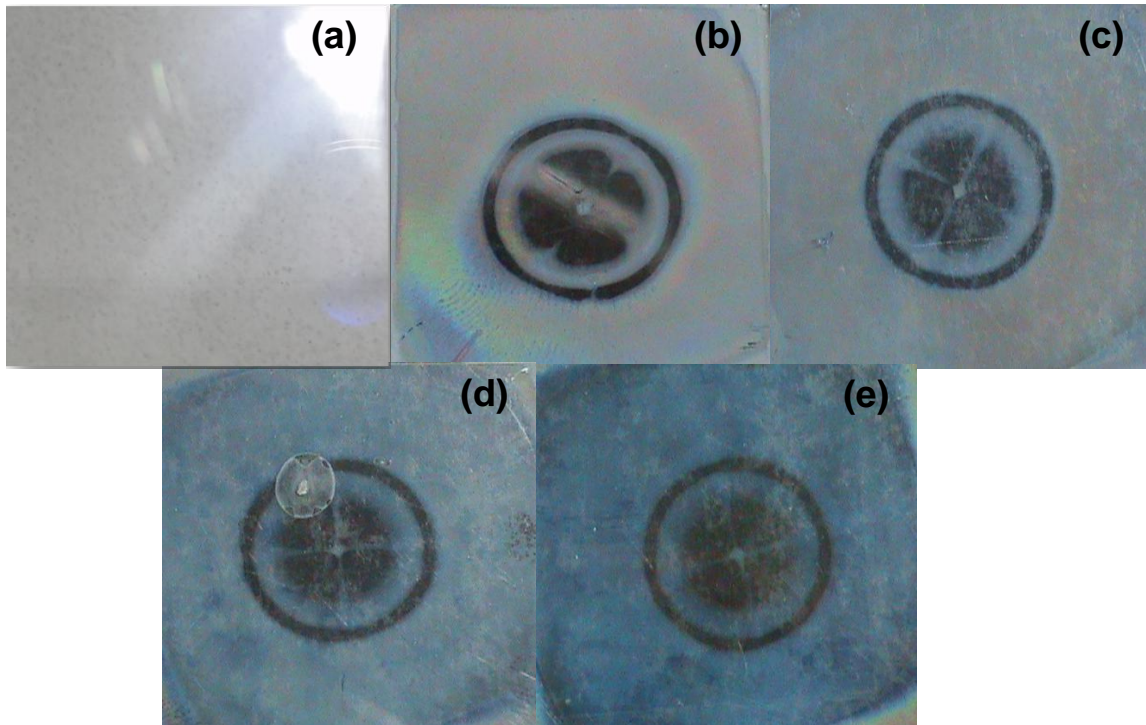


Figura 2.8- Foto do PET virgem (a) e PET após a deposição de solução de 10% PS (m/v) a 1000 (b), 3000 (c), 5000 (d) e 9000 rpm (e).

2.4.5. Estudos da molhabilidade dos filmes antes / depois da deposição dos filmes contendo nanoporos.

Foi analisada a influência que o diâmetro dos nanoporos de PS exerce no ângulo de contato da superfície. Para isso, utilizou-se como controle um filme de PS sobre o PET, obtido por solvent casting. Na **Tabela 2.2** encontra-se os valores do ângulo de contato dos filmes porosos de PS obtidos nas diferentes rotações e na **Figura 2.9** a imagem dos mesmos no momento da mensuração da molhabilidade.

Tabela 2.2- Ângulo de contato obtido em relação ao diâmetro e rugosidade média dos nanoporos sintetizados em diferentes rotações na superfície do PET com 10% (m/v) de PS em THF.

Rotação (rpm)	Diâmetro médio (nm)	Rugosidade média (Ra) (nm)	Ângulo de contato (°)
sem			76 ± 2
1000	1223 ± 350	130 ± 2,7	103 ± 1
3000	346 ± 63	96 ± 2,5	89 ± 2
5000	256 ± 64	22 ± 3	83 ± 2
9000	202 ± 44	25 ± 2	84 ± 3

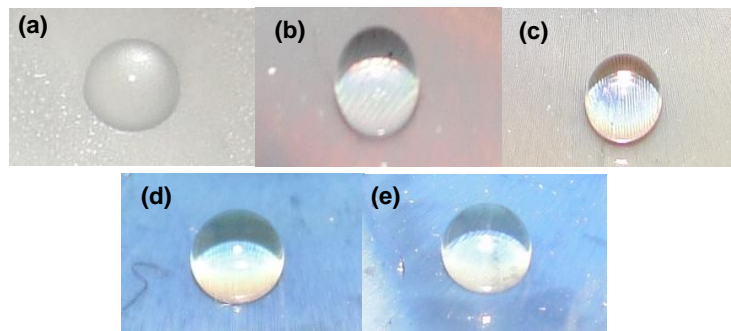


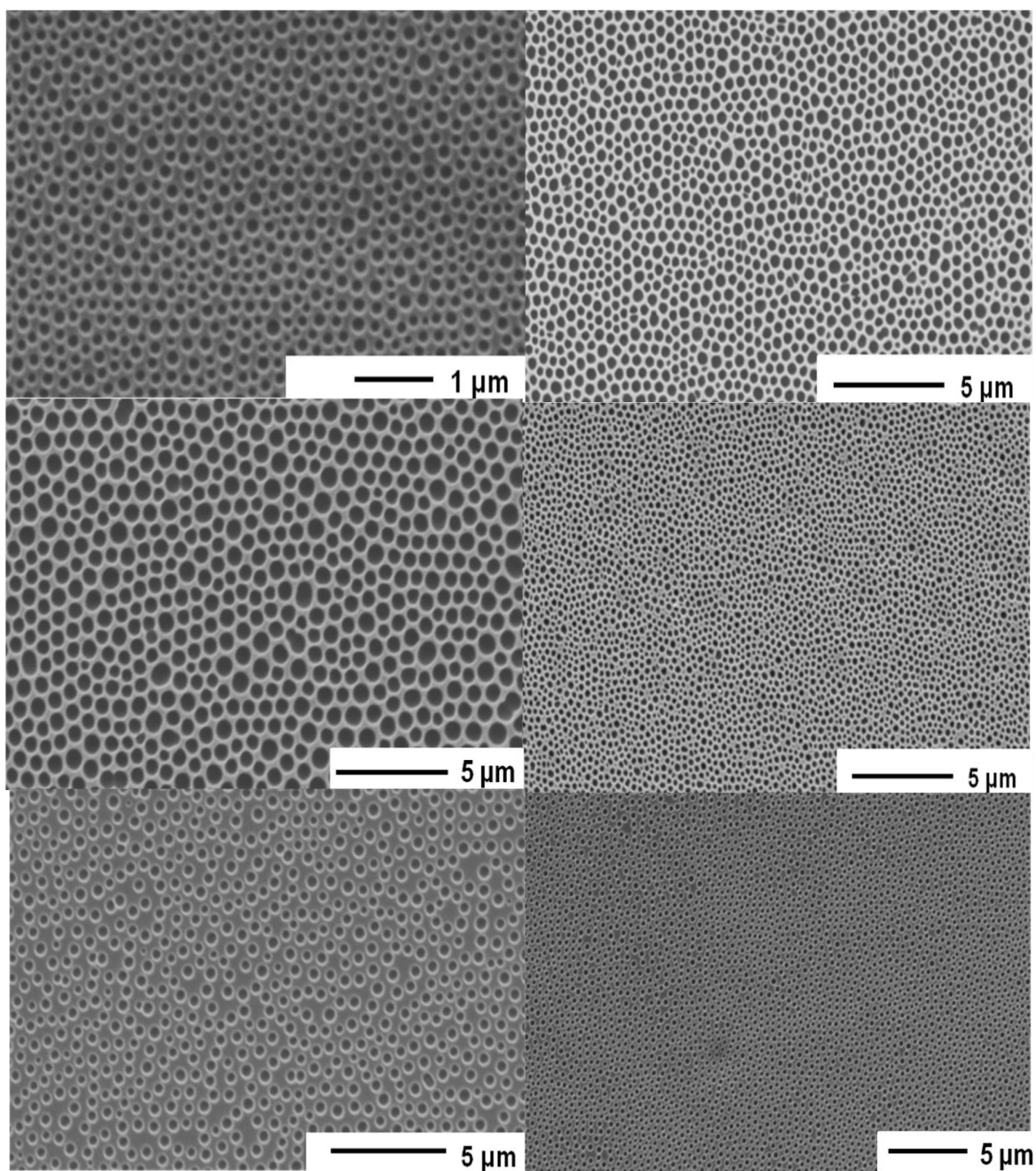
Figura 2.9- Foto dos filmes de PS obtidos: sem spin (solvent casting) (a) e a 1000 (b), 3000 (c), 5000 (d) e 9000 rpm (e).

O poliestireno é um polímero hidrofóbico. No entanto, materiais porosos são muito mais hidrofóbicos do que os planos devido à sua porosidade (rugosidade). Com o efeito dos poros, o ar pode ser aprisionado nos mesmos, resultando na redução da molhabilidade dos materiais. Por esta razão, os filmes porosos apresentam superfície bastante hidrofóbica [84].

Comparando-se a molhabilidade dos filmes nanoporosos (3000, 5000 e 9000 rpm) com os filmes microporosos (1000 rpm) pode-se observar que os filmes nanoporosos possuem maior molhabilidade. Esse fato ocorre porque os filmes nanoporosos apresentam rugosidade inferior aos filmes microporosos, isto é, são mais planos permitindo que a gota de água se espalhe com mais facilidade.

2.5 Considerações Finais

A formação de filmes porosos de PS sobre o PET com o método breath figure foi possível somente com a secagem dinâmica. O aumento de velocidade do spin coating muda o diâmetro e a rugosidade dos nanoporos em rotações de até 5000 rpm. Acima desta rotação a velocidade de secagem do solvente volátil (THF) se mantém constante. No entanto, a espessura da camada depositada em 1000 e 3000 rpm é similar e o que influencia o diâmetro e rugosidade é a diferença na taxa de evaporação do THF. Nas rotações de 5000 e 9000 rpm a camada de PS depositada apresenta dimensões distintas (100 e 25 nm respectivamente). A maior hidrofobicidade dos materiais obtidos está na condição de secagem a 1000 rpm ($103 \pm 1^\circ$), pois essa é a única condição na qual é obtido filmes de PS microporosos.

*Capítulo 3***SÍNTESE DE NANOPOROS DE PS - EFEITO DO SUBSTRATO**

3.1. Considerações iniciais

O fenômeno de formação do breath figure possui vários parâmetros que modificam os filmes porosos e que são explorados de uma maneira simples. No entanto, o fenômeno não é compreendido completamente. Neste capítulo, a discussão foi direcionada no sentido da avaliação da importância do substrato utilizado para gerar o filme poroso, parâmetro este que tem sido pouco comentado na literatura ^[67], [85-87].

Foi investigado como a interação da solução de PS com os substratos poliméricos e inorgânico influenciam na formação do filme poroso. Com este objetivo utilizou-se os polímeros PEBD, PET e PDMS virgens (como no **Capítulo 2**) e tratados com plasma de oxigênio. Também foi utilizado como substrato o politetrafluoretileno (PTFE) virgem e triboeletrizado e como substrato inorgânico utilizou-se o vidro.

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1 Materiais

Polietileno de baixa densidade – PEBD (Sigma Aldrich), Poli (tereftalato de etileno) - PET (Comercial Mylar), Polidimetilsiloxano - PDMS (Sylgard 184), Politetrafluoretileno - PTFE (Poliolefinas), Vidro (EasyPath), Poliestireno – PS (Sigma Aldrich), massa molar média entre 4.000 a 200.000 Da, Tetrahidrofurano P.A - THF (Nuclear).

3.2.2. Filmes de PTFE virgens

As dimensões dos filmes de PTFE trabalhados foram de 3 cm x 3 cm com espessura de $2,1 \pm 0,01$ mm. O processo de limpeza da superfície dos filmes foi realizado em um extrator Soxhlet por 24 horas, utilizando acetona como solvente.

3.2.3. Filmes de PTFE triboeletrizados

Os filmes de PTFE triboeletrizados foram preparados pela metodologia descrita a seguir e foram cedidos pelo Prof. Fernando Galembeck do IQ-UNICAMP.

O PTFE foi submetido ao processo de triboeletrização da seguinte forma: folhas de PTFE vendidas para uso geral foram imersas em etanol durante 2 horas antes dos experimentos de triboeletrização, pois resultados preliminares mostram que a imersão em etanol elimina grande parte das cargas estáticas. Em seguida, folhas quadradas (6 x 6 cm) do PTFE foram apoiadas sobre um suporte de alumínio montada sobre uma balança de mesa e depois esfregada com um disco de polietileno fixada sobre uma máquina de perfuração, que foi rotacionada a 5000 rpm durante 3 segundos (s). A pressão exercida pelo disco sobre a amostra foi ajustado para $1,5 \pm 0,25$ kPa, através da medida da força aplicada ao equilíbrio ^[88]. As dimensões dos filmes de PTFE

trabalhados foram de 3 cm x 3 cm com espessura de $2,1 \pm 0,01$ mm. O processo de limpeza da superfície dos filmes foi realizado em um extrator Soxhlet por 24 horas, utilizando acetona como solvente.

3.2.4. Tratamento com plasma dos filmes de PET, PEBD e PDMS.

Os filmes poliméricos virgens foram expostos a plasma de oxigênio por 1 minuto em uma câmara (Harrick Plasma cleaner). Os filmes tratados são mais hidrofílicos quando comparados aos não tratados.

3.2.5. Vidro

Como substrato utilizou-se lâmina de vidro lisa para microscopia (EasyPath) com dimensões de 3 cm x 3 cm e espessura de 1 à 1,2 mm . O processo de limpeza da superfície dos filmes foi realizado em um extrator Soxhlet por 24 horas, utilizando acetona como solvente.

3.2.6. Síntese de nanoporos de PS – efeito do substrato

Os polímeros PET, PEBD e PDMS virgens e tratados com plasma e PTFE virgem e triboeletrizado foram utilizados como substratos para a deposição de 150 μ L de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF. Todos os substratos foram rotacionados no spin coating por 10 s a 3000 rpm. Os experimentos foram realizados a 25 °C com umidade relativa do ar igual a 81%. O mesmo procedimento foi realizado com o vidro como substrato.

3.3. Caracterizações dos filmes porosos

A morfologia dos filmes de PS foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando equipamento da marca Shimadzu, modelo SS 550 Superscan. Os parâmetros utilizados foram: voltagem de aceleração de 10 kV e intensidade de corrente de 41 μ A. A superfície das amostras foi previamente coberta com uma fina camada de ouro. Imagens de MFA e valores da rugosidade média das superfícies foram obtidas em equipamento Shimadzu SPM-9500J3.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Síntese de nanoporos de PS – efeito do substrato

A diferença de morfologia com a modificação do substrato foi verificada por MEV e MFA. Nas **Figuras 3.1 e 3.2** são apresentadas micrografias dos polímeros virgens (PEBD, PET, PDMS, PTFE) e do vidro utilizados como substrato para a produção de nanoporos em sua superfície. A partir das **Figuras 3.1 e 3.2** verifica-se que a morfologia da superfície dos substratos é lisa e homogênea.

As **Figuras 3.3 e 3.4** apresentam, respectivamente, micrografias de MEV e imagens de MFA do vidro e dos polímeros PEBD, PET e PDMS virgens e tratados com plasma de oxigênio e PTFE virgem e triboeletrizado, após a deposição de PS 10% (m/v) em THF a 3000 rpm.

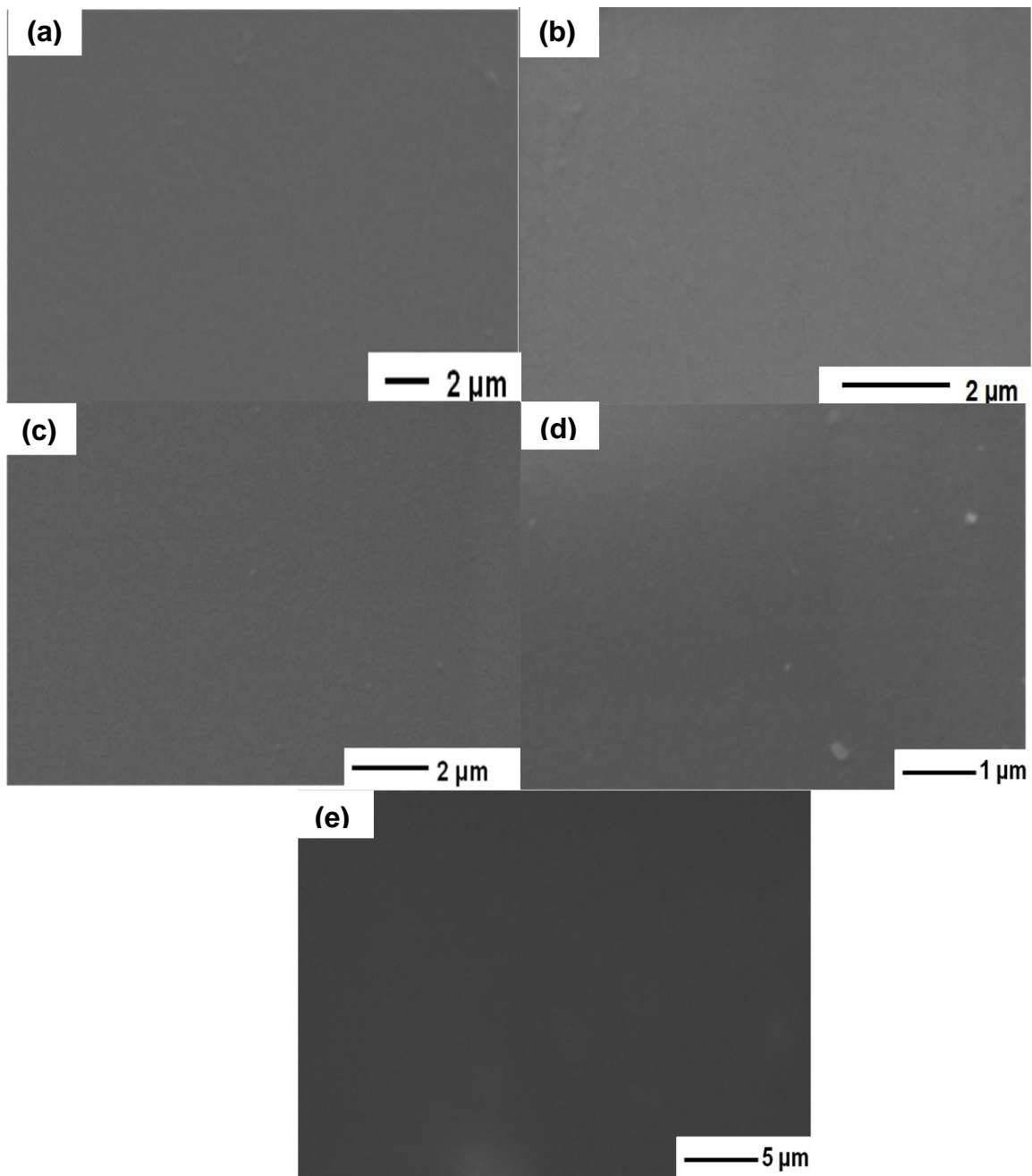


Figura 3.1 – Micrografias de MEV dos polímeros virgens (a) PEBD, (b) PET, (c) PDMS, (d) PTFE e (e) vidro.

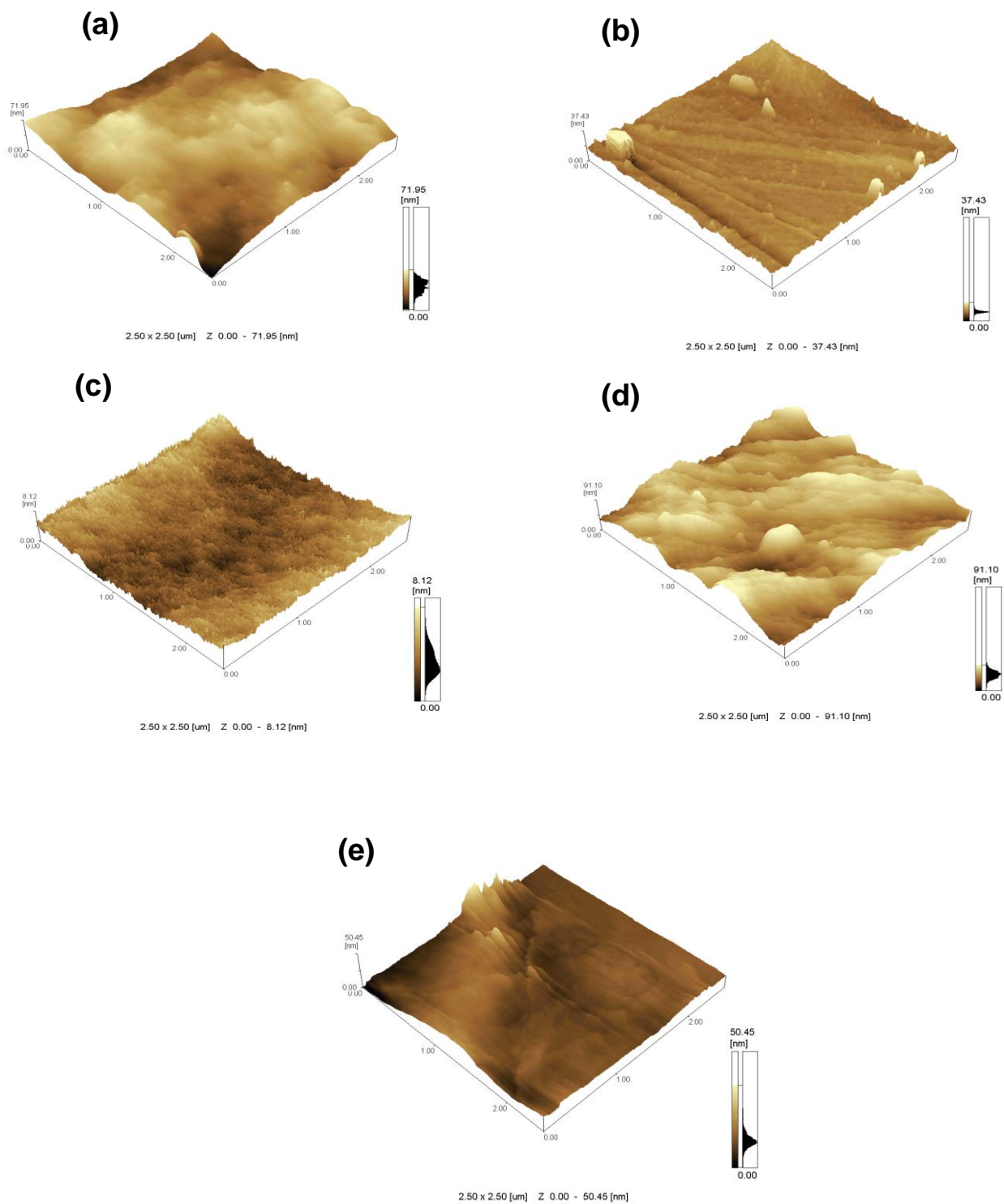


Figura 3.2 – Imagens de MFA dos polímeros virgens a) PEBD (b) PET (c) PDMS e (d) PTFE e (e) vidro.

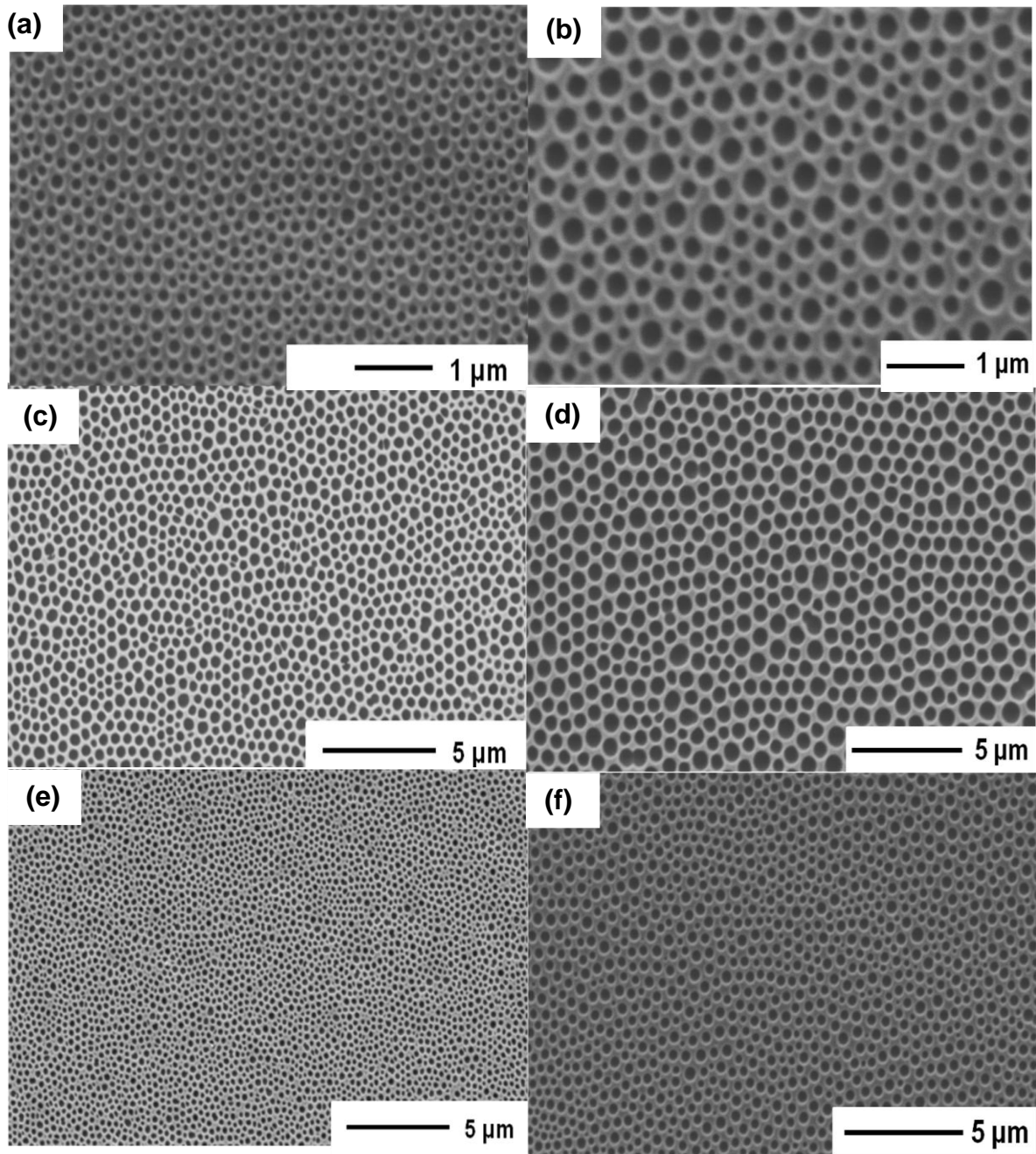


Figura 3.3 – Micrografias de MEV dos polímeros virgens (a) PEBD (c) PET e (e) PDMS e dos polímeros tratados com plasma de oxigênio (b) PEBD (d) PET (f) PDMS após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm .

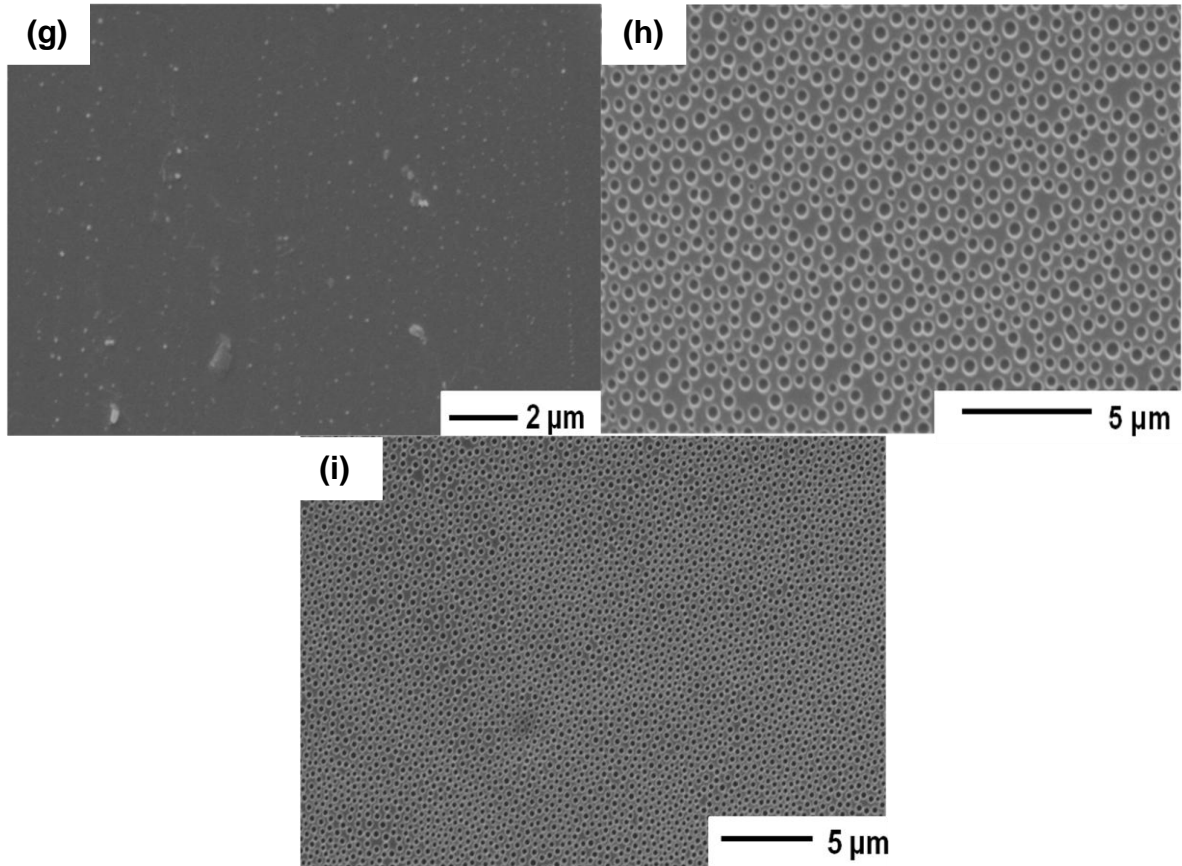


Figura 3.3 (continuação) – Micrografias de MEV do (g) PTFE e do triboeletrizado (h) PTFE e (i) vidro após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm .

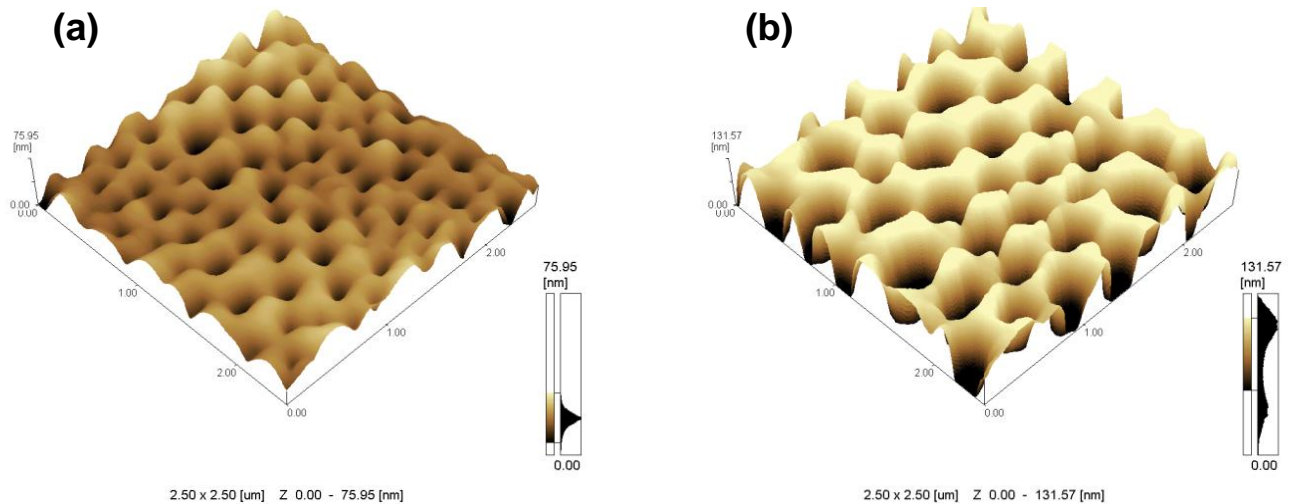


Figura 3.4 – Imagens de MFA em 3D do polímero virgem (a) PEBD e do polímero (b) PEBD tratado com plasma de oxigênio após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm .

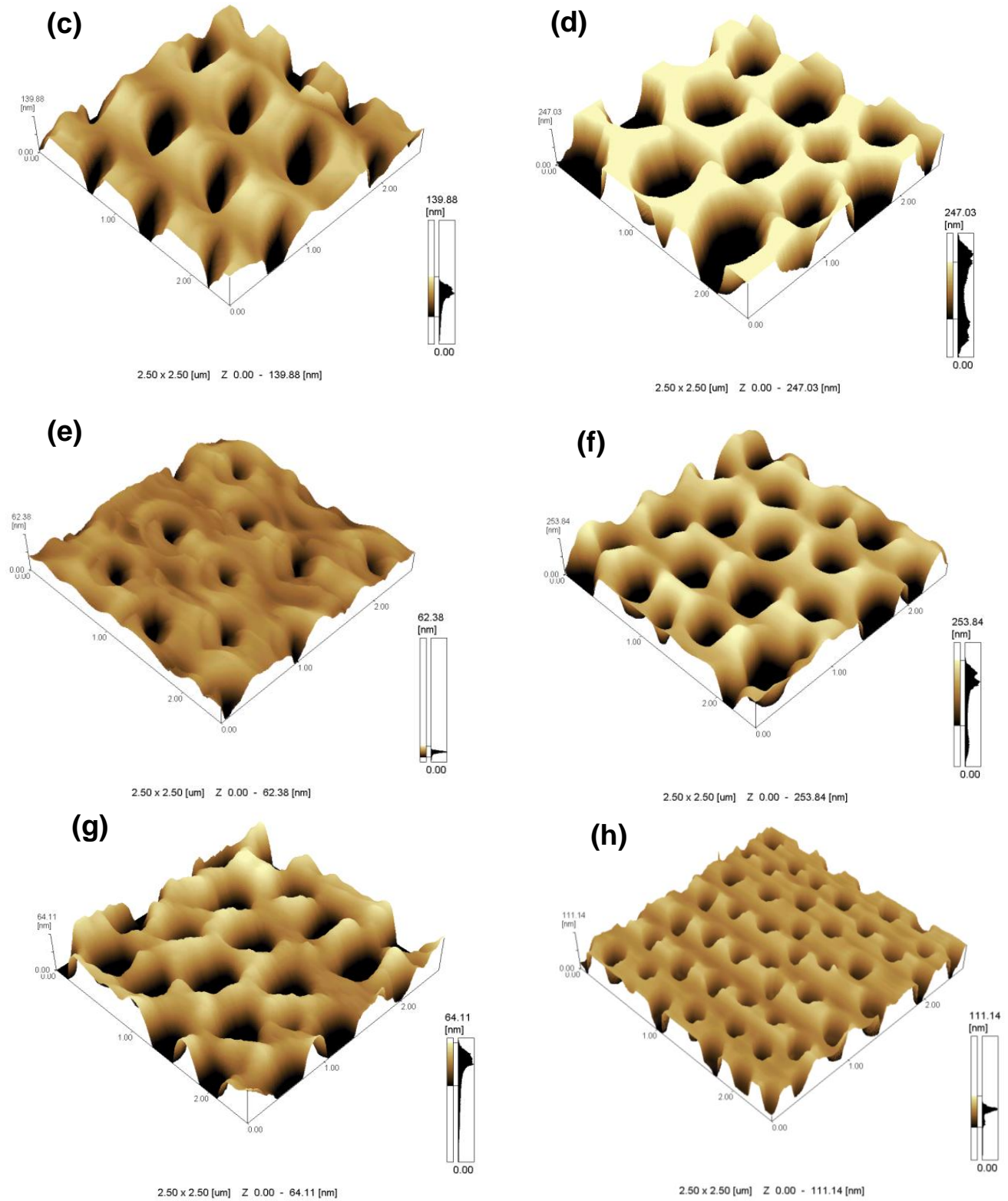


Figura 3.4 (continuação)– Imagens de MFA em 3D dos polímeros virgens (c) PET e (e) PDMS e dos polímeros tratados com plasma de oxigênio (d) PET, (f) PDMS, (g) PTFE triboeletrizado e (h) vidro após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm .

Analisando as **Figuras 3.3 e 3.4** pode-se observar que quando utilizamos PTFE virgem não obtemos a formação do filme nanoporoso de PS, fato que não ocorre quando o PTFE é triboeletrizado. Também é visualizado que em todos os substratos poliméricos tratados com plasma de oxigênio, o diâmetro dos nanoporos de PS é maior do que nos substratos virgens. Outro fato interessante é que a maioria dos trabalhos reportam que somente o dissulfeto de carbono e o clorofórmio eram capazes de gerar filmes com poros (cerca de 3 microns) suportados no substrato vidro. Como o substrato de vidro é o mais usado para preparo de filmes microporosos, esse fato explica porque o dissulfureto de carbono é o considerado o melhor solvente para o breath figure ^[65, 67].

A **Tabela 3.1** apresenta os valores da rugosidade (profundidade) média dos nanoporos (e **Figura V** do **Anexo I**), correspondentes a média de quatro imagens de MFA nas diferentes rotações bem como o diâmetro médio de 300 nanoporos, observados por MEV. Os histogramas de distribuição do diâmetro médio para os filmes nanoporosos obtidos com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm, nos diferentes substratos estudados encontram-se na **Figura VI** do **Anexo I**. Analisou-se também as imagens do MFA em 2D, com o auxílio das retas A-B e C-D de 10 imagens, com o objetivo de verificar se o substrato influencia no quanto a gota de água afunda na solução. Este tratamento foi similar ao já descrito no **Capítulo 2**.

Tabela 3.1 - Diâmetro e rugosidade média dos nanoporos e o quanto à gota de água penetra após a deposição de uma na solução polimérica de 10% (m/v) de PS em THF nos diferentes substratos.

Substrato	Diâmetro médio (nm)	Rugosidade média (Ra) (nm)	Quanto à gota de água penetra na solução
PET	346 ± 65	96 ± 2, 5	Mais da metade
PET_plasma	507 ± 102	132 ± 5	Mais da metade
PDMS	147 ± 27	9 ± 2	Menos da metade
PDMS_plasma	346 ± 60	96 ± 2,1	Mais da metade
PEBD	123 ± 23	6 ± 2,2	Menos da metade
PEBD_plasma	172 ± 38	76 ± 3	Mais da metade
PTFE_triboeletrizado	262 ± 60	35 ± 2,7	Menos da metade
Vidro	171 ± 40	20 ± 2,9	Menos da metade

Com o auxílio da **Tabela 3.1** e das **Figuras 3.3** e **3.4** é possível inferir que os diferentes substratos poliméricos influenciam no diâmetro, rugosidade e na organização dos filmes nanoporosos de PS.

A mudança no diâmetro e profundidade dos nanoporos de PS, nos substratos estudados pode ser explicada pela diferença de interação que existe entre a solução PS/THF e o polímero utilizado como substrato ^{[65], [67]}. A maior interação do PS sobre o substrato não permite que a gotícula de água penetre na solução com facilidade. Dessa forma, para que a gotícula consiga afundar na solução a mesma deve possuir um maior tamanho, o que conseqüentemente gera maior tamanho do poro ^[87-89]. Este

comportamento pode ser verificado analisando as imagens de MEV e MFA das **Figuras 3.3 e 3.4**. Os nanoporos formados no PET são maiores e mais profundos do que os formados nos demais substratos, fato este que pode ser explicado por meio da maior interação entre o substrato PET e o filme de PS, interação esta suportada pelos valores próximos de molhabilidade e hidrofiliçidade (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2 - Propriedades dos substratos poliméricos virgens e do PS.

Substrato	Energia superficial a 20 °C (mN/m)^[90]	Ângulo de contato em água (°)^[91]	Contribuição polar da energia superficial (mN/m)^[90]
PET	44,6	72,5	9
PEBD	35,7	96	0
PDMS	19,8	107,2	0,8
PTFE	20	109,2	1,6
Vidro	43,1	59,6	37,08
PS	40,7	87,4	6,1

[90] <http://www.surface-tension.de/solid-surface-energy.htm>

[91] http://www.accudynetest.com/polytable_03.html?sortby=contact_angle

Os nanoporos formados no PDMS apresentaram diâmetros e profundidades intermediárias aos formados com PET e PEBD, mesmo possuindo molhabilidade inferior ao do PEBD, esse fato pode ser explicado pela maior hidrofiliçidade que o PDMS possui em relação ao PEBD (**Tabela 3.2**).

O PTFE virgem não foi um bom substrato para formar filmes porosos de PS. Esse fato pode estar relacionado com a baixa molhabilidade que o mesmo possui, impossibilitando uma interação adequada com o PS. Após a triboeletrização, a

contribuição polar e a molhabilidade do PTFE aumentam, o que torna o PTFE triboeletrizado um substrato no qual é possível a formação de filmes nanoporosos de PS, porém sem alta organização.

O vidro é o substrato mais polar dentre os estudados (**Tabela 3.2**), mas não é o que possui maior interação com o PS, sendo que a sua interação só é maior que a do PEBD e PDMS virgens. Os substratos mais apolares (PEBD, PDMS e PTFE) e o mais polar (vidro) promovem as menores rugosidades e diâmetros de poros. Esse fato evidencia o fato de que as maiores interações dos substratos com o PS geram os filmes com os maiores tamanhos de poros.

Os valores de rugosidade são compatíveis com o quanto a gota de água penetra na solução. A gota que penetra pouco (menos da metade) na solução promove uma menor rugosidade ou profundidade na superfície nanoporosa do PS.

O tratamento dos substratos poliméricos com plasma de oxigênio promove maior contribuição polar da energia superficial e molhabilidade, o que permite que a interação com o PS seja maior. Esse tratamento influencia na formação dos nanoporos de PS. Mesmo não sabendo os valores de contribuição polar da energia superficial e molhabilidade dos substratos poliméricos tratados com plasma, sabe-se que os valores não ultrapassam o do vidro, pois o tamanho dos nanoporos formados é maior.

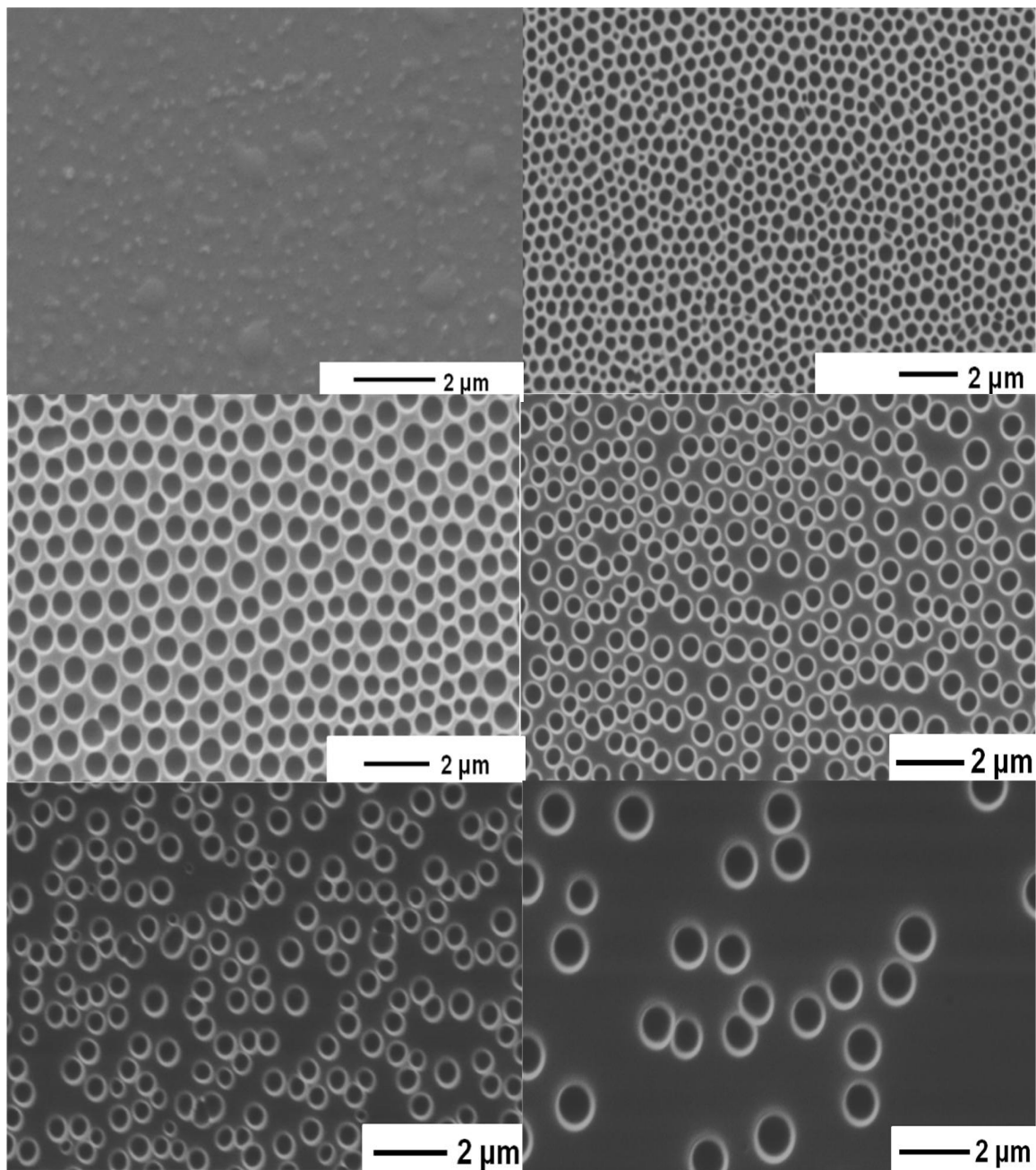
A diferença encontrada na organização dos nanoporos de PS nos diferentes substratos está relacionada com a forma que as gotículas de água se arranjam para minimizar a tensão interfacial do substrato com a solução de PS ^[50,54].

3.5. Considerações finais

A maioria dos trabalhos de breath figure utilizam substratos inorgânicos ou bastante polares. No entanto, este trabalho demonstrou que é possível obter os menores nanoporos com polímeros muito hidrofóbicos como PEBD e PDMS. Outro interessante fato está relacionado com o solvente THF que, de forma inédita, foi possível a obtenção de filmes nanoporos de PS sobre o vidro pelo método de secagem dinâmica. A influência do substrato é muito expressiva neste método, o que permite postular o uso dos materiais obtidos em várias aplicações. Os nanoporos sintetizados possuem diâmetros médios de 507 e 123 nm e com profundidade média de 132 e 6 nm respectivamente.

Capítulo 4

SÍNTESE DE NANOPOROS DE PS SOBRE PET - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO



4.1 Considerações iniciais

Os padrões do breath figure são gerados pela não coalescência das gotas de água, o que permite a formação de poros organizados. Esse fenômeno está baseado no fato da drenagem do solvente ser proporcional ao aumento de viscosidade. Nos estágios finais, as gotículas estão intimamente envolvidas pela solução polimérica e o tempo de escoamento da solução polimérica (que está cada vez mais viscosa) será várias ordens de grandeza maior do que o solvente puro ^[92,93].

Diante do exposto, neste capítulo será investigada a concentração (que está relacionada à viscosidade) ideal do PS para a formação de filmes porosos. Para isso utilizou-se diferentes concentrações da solução polimérica sob as mesmas condições de umidade, substrato, secagem dinâmica e solvente.

4.2. Procedimentos experimentais

4.2.1. Materiais

Poli (tereftalato de etileno) - PET (Comercial Mylar), Poliestireno – PS (Sigma Aldrich), massa molar média entre 4.000 a 200.000 Da, Tetrahidrofurano P.A - THF (Nuclear).

4.2.2. Síntese de nanoporos de PS sobre PET- efeito da concentração do PS

Filmes de PET foram utilizados como substrato para a síntese dos nanoporos com concentrações de PS 5%, 10%, 20%, 25%, 30% e 35% (m/v) em THF. Os filmes de PET foram rotacionados no spin coating por 10 s a 3000 rpm. Os experimentos foram realizados a 25 °C com umidade relativa do ar igual a 81%.

4.3. Caracterizações dos filmes porosos

A morfologia dos filmes de PS foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando equipamento da marca Shimadzu, modelo SS 550 Superscan. Os parâmetros utilizados foram: voltagem de aceleração de 10 kV e intensidade de corrente de 41 μA . A superfície das amostras foi previamente coberta com uma fina camada de ouro. Imagens de MFA e valores da rugosidade média das superfícies foram obtidas em equipamento Shimadzu SPM-9500J3.

A viscosidade absoluta das diferentes concentrações de PS trabalhadas foi determinada pelo RheoStress RS300 (Haake) com capacidade de medidas estáticas e dinâmicas, taxa de deformação e cisalhamento controladas. Para determinar a viscosidade foram preparadas soluções de PS em THF com 2%, 5%, 8%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 25%, 30%, 35% (m/v). As viscosidades destas soluções foram medidas estaticamente usando a geometria cone/plano (DC 60/1) com taxa de cisalhamento de 0 a 100 s^{-1} . Foram medidas as diferenças na viscosidade e tensão de cisalhamento com a mudança na taxa de cisalhamento. Todos os experimentos foram realizados à temperatura de 25 °C. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.4. Resultados e discussão

4.4.1. Síntese de nanoporos de PS sobre PET- efeito da concentração do PS

A concentração da solução de PS depositada no PET influencia na formação dos nanoporos. Nas **Figuras 4.1, VII do Anexo I e 4.2** são apresentadas micrografias de MEV e imagens de MFA, respectivamente, do PET após a deposição de soluções com concentrações de 5%, 10%, 20%, 25%, 30% e 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.

Analisando a **Figura 4.1 (a)** é possível observar que não ocorreu a formação de nanoporos com a concentração de 5% (m/v) de PS em THF. Para a concentração de 20% (**Figura 4.1 (c), 4.2 (b) e Figura VII (b) do Anexo I**) ocorreu a formação de nanoporos com regularidade e organização, assim como na concentração de 10% (**Figura 4.1 (b), 4.2 (a) e Figura VII (a) do Anexo I**). Nas concentrações de 25%, (**Figura 4.1 (d), 4.2 (c) e Figura VII (c) do Anexo I**) 30% (**Figura 4.1 (e), 4.2 (d) e Figura VII (d) do Anexo I**) e 35% (**Figura 4.1 (f), 4.2 (e) e Figura VII (e) do Anexo I**) a regularidade e quantidade dos poros formados é cada vez menor com o aumento da concentração.

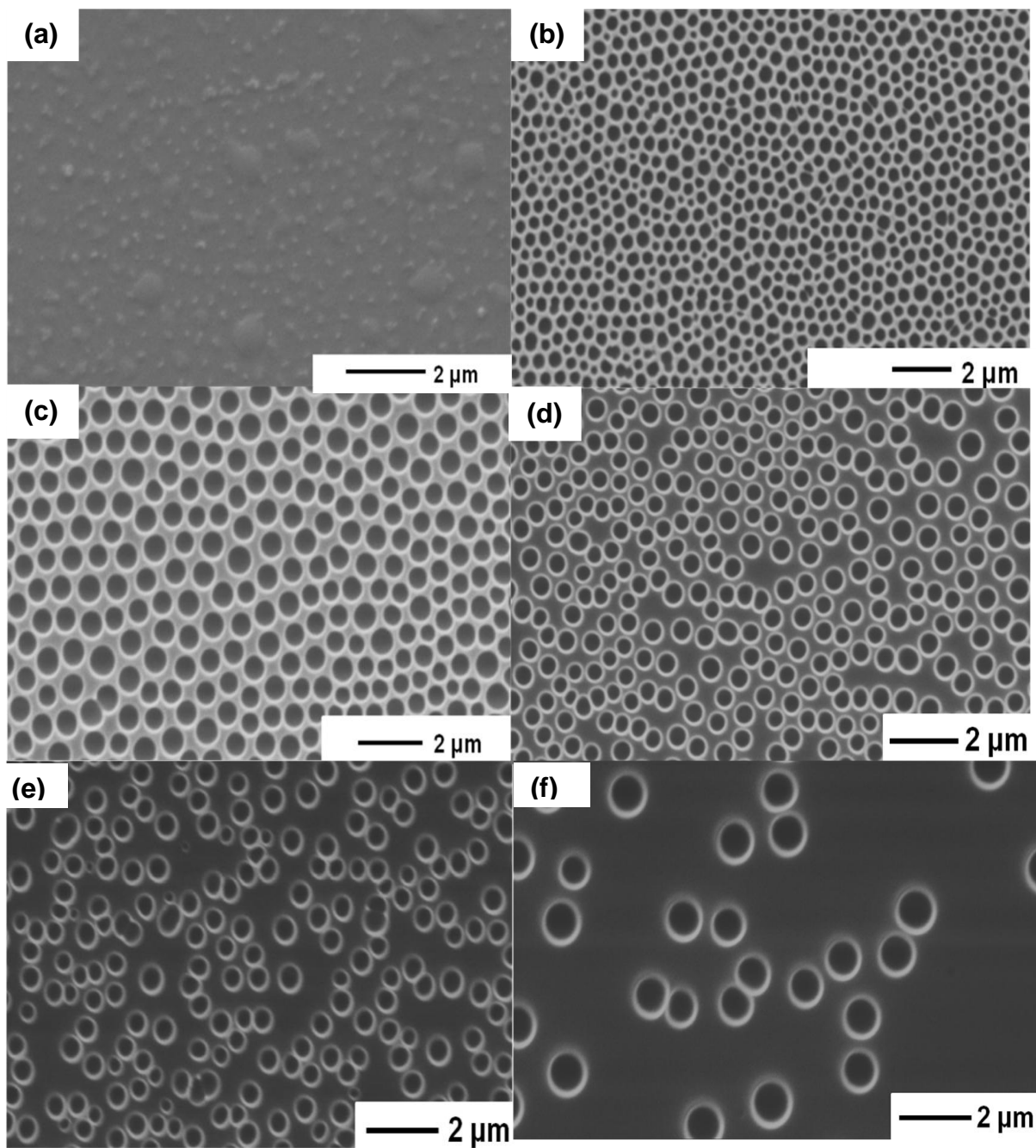


Figura 4.1 – Micrografias de MEV do PET após a deposição de soluções com (a) 5%, (b) 10% e (c) 20%, (d) 25%, (e) 30% e (f) 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.

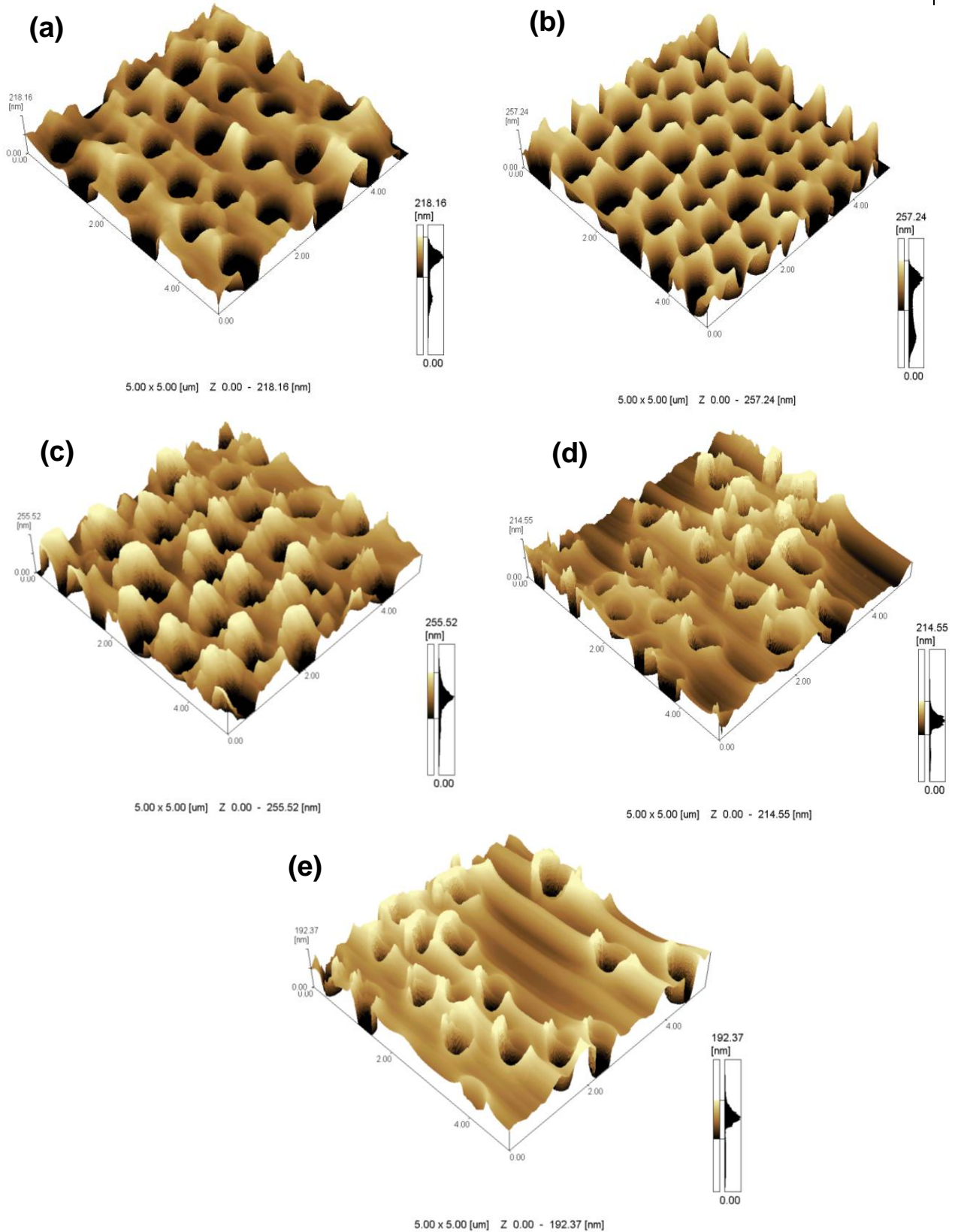


Figura 4.2 – Imagens do MFA do polímero PET após a deposição de soluções de (a) 10%, (b) 20%, (c) 25%, (d) 30% e (e) 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.

Na **Tabela 4.1** são apresentados os valores da rugosidade (profundidade) média dos nanoporos (e **Figura VIII** do **Anexo I**), correspondentes à média de quatro imagens de MFA nas diferentes rotações, bem como o diâmetro médio de 300 nanoporos, observados por MEV. Os histogramas de distribuição do diâmetro médio para os filmes nanoporosos obtidos nas diferentes concentrações de PS em THF a 3000 rpm, encontram-se na **Figura IX** do **Anexo I**. Analisou-se também as imagens do MFA em 2D, com o auxílio das retas A-B e C-D de 10 imagens, com o objetivo de verificar se a concentração influencia no quanto a gota de água penetra na solução. Este tratamento foi similar ao já descrito no **Capítulo 2**.

Tabela 4.1- Diâmetro e rugosidade média dos nanoporos e o quanto à gota de água penetra após a deposição de soluções poliméricas com diferentes concentrações de PS em THF a 3000 rpm no PET.

<i>% PS (m/v)</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>	<i>Rugosidade Média (nm)</i>	<i>Quanto à gota de água penetra na solução</i>
10	346 ± 63	96 ± 2,5	Mais da metade
20	413 ± 76	130 ± 3,2	Mais da metade
25	411 ± 53	69 ± 2	Mais da metade
30	625 ± 126	53 ± 2,8	Quase a esfera toda
35	669 ± 146	50 ± 3,5	Quase a esfera toda

De acordo com as **Figuras 4.1, 4.2** e a **Tabela 4.1** pode-se inferir que a concentração de PS em THF é essencial na formação de estruturas organizadas pelo

método da breath figure, pois a viscosidade da solução polimérica desempenha um papel importante neste método ^[94].

Na concentração de 5% (m/v) de PS/THF a viscosidade da solução polimérica é muito baixa. Este fato ocorre devido à pequena quantidade de polímero e conseqüentemente quando as gotículas de água adentram a solução polimérica as mesmas coalescem não permitindo a formação dos nanoporos.

No caso da concentração de 10% (m/v) de PS em THF a quantidade deste polímero permite uma maior interação PS-PS do que entre o PS e as gotículas de água. Dessa forma, a gotícula de água não se espalha na solução polimérica, resultando em uma superfície nanoporosa.

A deposição de uma solução com a concentração de 20% (m/v) de PS em THF promove a formação de nanoporos com diâmetro médio e profundidade média maiores quando comparados com a concentração de 10% (m/v) de PS. Este fato ocorre devido a maior quantidade de moléculas de PS existentes por área, permitindo a formação de estruturas mais coesas (interação PS-PS) bem como maior espaço para que as gotículas de água penetre na solução de PS e THF.

Na concentração de 25% a profundidade da gota diminui em relação a 20%. No entanto, o diâmetro se mantém constante. Esse fato pode ser explicado analisando a **Figura 4.3**. A viscosidade absoluta da solução aumenta muito com o aumento da concentração acima de 23% (m/v) de PS, demonstrando que acima desta concentração ocorre o entrelaçamento entre as cadeias do PS. Assim, a gotícula de água tem muita dificuldade em adentrar a solução polimérica (**Figura 4.4**).

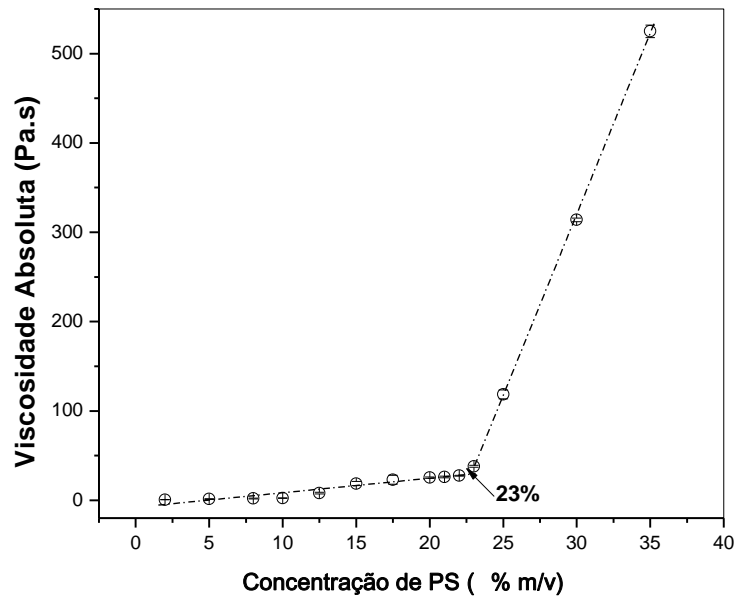


Figura 4.3 - Gráfico de viscosidade absoluta versus concentração de PS. A viscosidade absoluta foi obtida com uma taxa de cisalhamento de 30 a 40 s^{-1} .

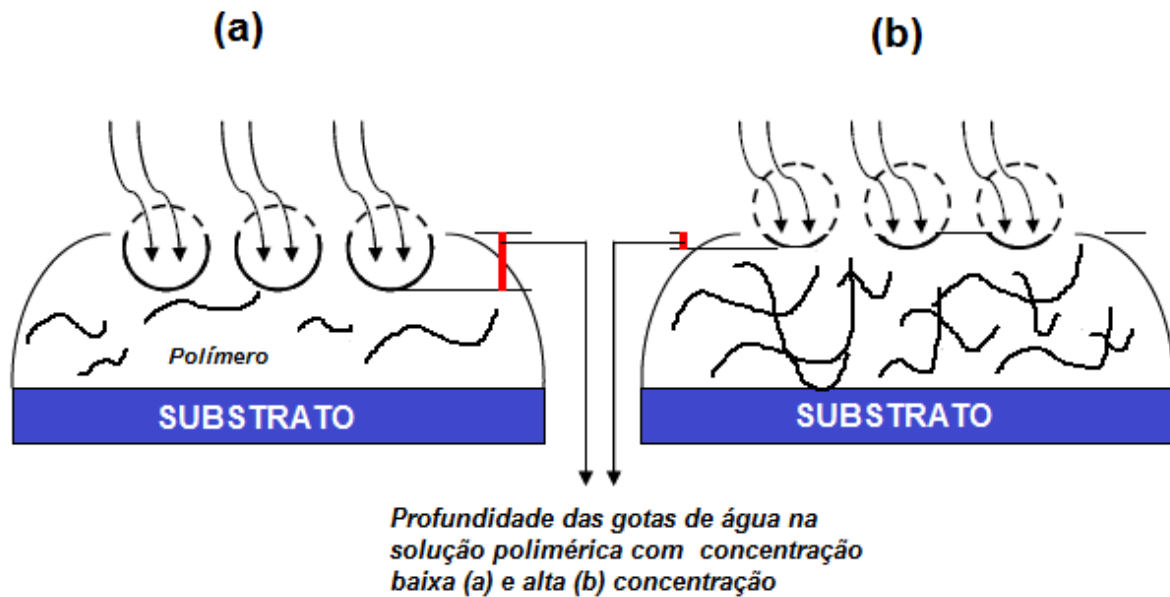


Figura 4.4- Esquema da diferença de profundidade das gotículas de água na solução polimérica com baixa concentração **(a)** e com alta concentração **(b)**.

Analisando os resultados obtidos para as concentrações de 30% e 35% de PS, observa-se que a quantidade de poros formados na superfície do PS é cada vez menor com o aumento da concentração. Isso se deve a maior dificuldade que as gotículas de água possuem em adentrar a solução. Para que as gotículas de água consigam adentrar a solução polimérica a maioria destas precisa crescer bastante (cerca de 600 nm de diâmetro) e entrar inteiramente na solução, fato que não ocorre com as concentrações de 10%, 20% e 25% as quais somente metade da gotícula de água entra na solução.

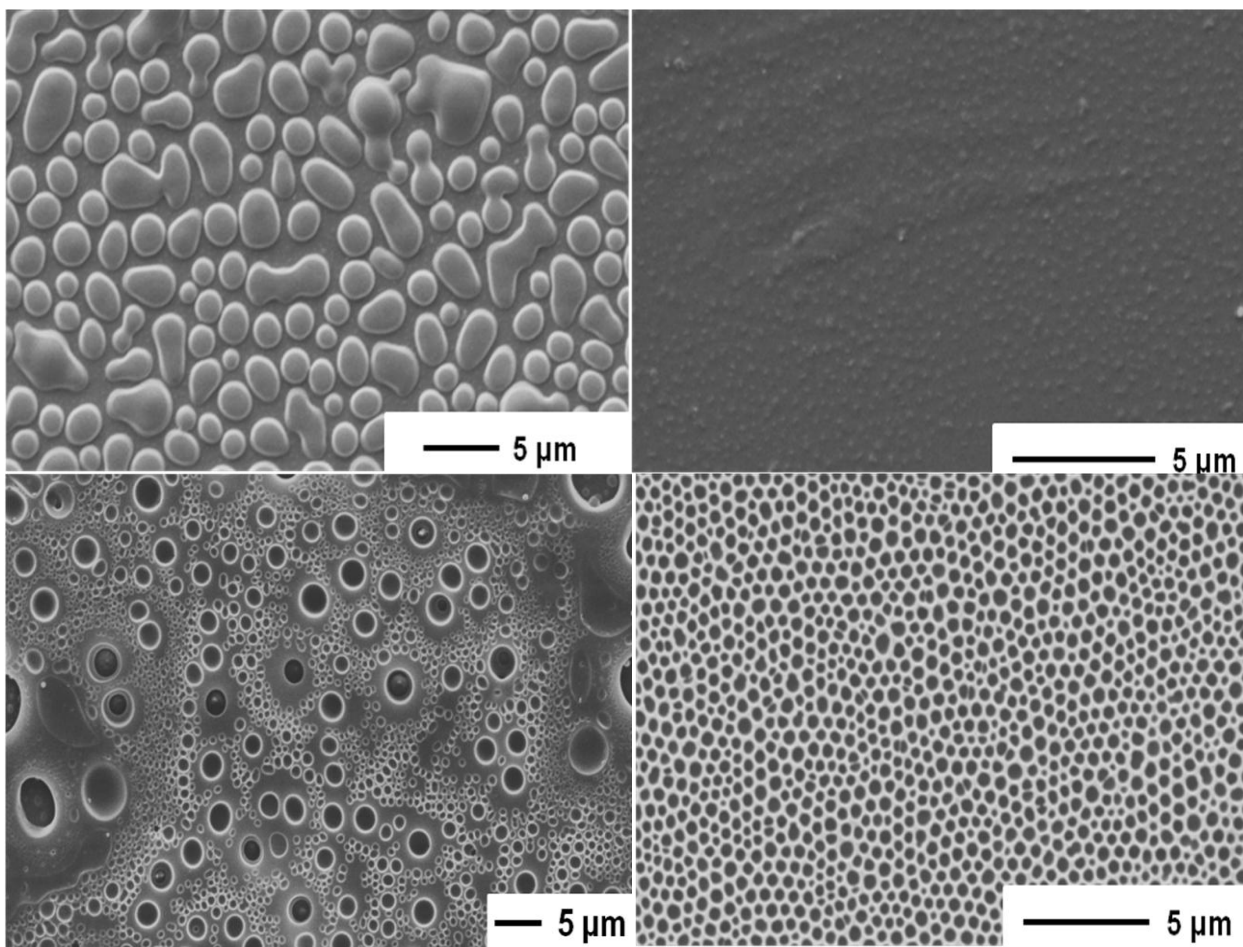
4.5. Considerações finais

No método breath figure, as gotas de água, que se condensam sobre a superfície da solução polimérica desempenham papel de molde de filmes porosos altamente regulares quando a viscosidade/concentração polimérica é ideal.

Concentrações poliméricas muito baixas (como a de 5% (m/v) de PS) não permitem a formação de moldes das gotículas de água, quando as mesmas adentram a solução polimérica. Isso ocorre porque a evaporação do solvente é muito rápida (devido à pequena quantidade de polímero), não permitindo a organização necessária do polímero para limitar a coalescência das gotículas de água na solução polimérica.

O aumento da concentração, acima de 20%, induz a convecção mais lenta da solução resultando em um acondicionamento insuficiente das gotículas de água na solução polimérica, além de ocorrer o entrelaçamento das cadeias poliméricas. Por isso, não foram obtidos filmes porosos regularmente estruturados com concentrações de PS/ THF de 25%, 30% e 35%.

Desta forma, dentre as concentrações poliméricas estudadas, somente as concentrações (intermediárias) de 10% e 20% (m/v) de PS são capazes de formar filmes nanoporos com organização e regularidade.

*Capítulo 5***SÍNTESE DE NANOPOROS DE PS SOBRE
PET - EFEITO DO SOLVENTE**

5.1. Considerações iniciais

Um dos fatores que influencia a formação de filmes nanoporosos pelo método breath figure é o solvente ^{[68],[95]}. No entanto, para ser um solvente que tenha possibilidades de formar micro ou nanoporos pelo método breath figure, o mesmo deve ter volatilidade elevada, o que é benéfico em reduzir rapidamente a temperatura da superfície, a fim de permitir a rápida nucleação e condensação de gotículas de água. Além disso, o solvente usado deve ser pouco solúvel ou imiscível na água.

Nesse capítulo, foi demonstrado a morfologia dos filmes de PS depositados sobre o PET obtidos com os solventes: acetona, clorofórmio e éter etílico. Os resultados são discutidos comparando os parâmetros físico - químicos dos solventes e a afinidade termodinâmica dos solventes com o PS.

5.2. Procedimentos experimentais

5.2.1. Materiais

Poli (tereftalato de etileno) - PET (Comercial Mylar), Poliestireno – PS (Sigma Aldrich), massa molar média entre 4.000 a 200.000 Da, Tetrahidrofurano P.A - THF (Nuclear), Acetona P.A – $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ (F-Maia), Clorofórmio P.A – CHCl_3 (F-Maia), Éter etílico P.A – $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ (F-Maia).

5.2.2. Síntese de nanoporos de PS sobre o PET- efeito do solvente

Diferentes solventes foram testados para verificar a influência dos mesmos, na formação de nanoporos na superfície do PET. Dessa forma, filmes de PET foram rotacionados a 3000 rpm por 10 s com soluções de 10% (m/v) de PS, utilizando os seguintes solventes: THF, CHCl_3 , $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ e $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$. Os experimentos foram realizados a 25 °C com umidade relativa do ar igual a 81%.

5.3. Caracterizações dos filmes porosos

A morfologia dos filmes de PS foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando equipamento da marca Shimadzu, modelo SS 550 Superscan. Os parâmetros utilizados foram: voltagem de aceleração de 10 kV e intensidade de corrente de 41 μ A. A superfície das amostras foi previamente coberta com uma fina camada de ouro.

5.4. Resultados e discussão

5.4.1. Síntese de nanoporos de PS sobre o PET- efeito do solvente

O solvente utilizado para solubilizar o PS influenciou diretamente na formação dos nanoporos. Evidentemente, à temperatura ambiente, baixos ponto de ebulição e entalpia de vaporização são pré-requisitos para induzir a refrigeração da superfície polimérica. Esse resfriamento é capaz de iniciar a nucleação e condensação das gotículas de água ^{[63], [67], [96]}. No entanto, como observado na **Figura 5.1 e X do Anexo I** estes não são fatores suficientes para explicar a formação dos nanoporos pelo método breath figure.

Na **Figura 5.1** são apresentadas imagens de MEV do PET após a deposição de soluções com 10% (m/v) de PS em: $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, CHCl_3 , THF e $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ - **Figura 5.1 (a), (b), (c) e (d)** respectivamente.

As imagens da **Figura 5.1** revelam que a morfologia da superfície de PET após a deposição de PS em diferentes solventes **((a), (b) e (d))** é diferente da morfologia utilizando THF. Apenas com THF se obteve nanoporos organizados e com a utilização de $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ houve a formação de microesferas de PS na superfície do PET. A formação de microesferas (inverso dos nanoporos) pelo método breath figure com o solvente $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ já foi reportado na literatura ^[97].

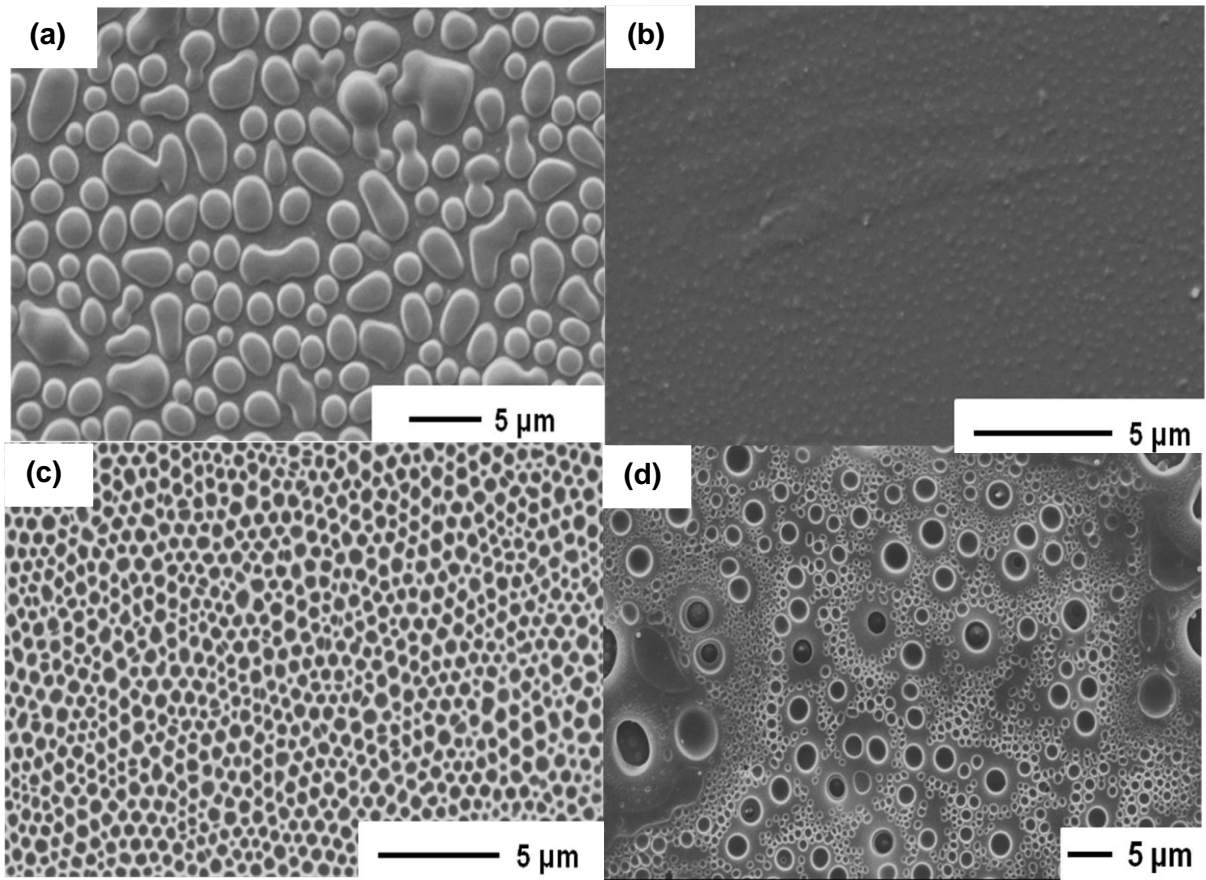


Figura 5.1 – Micrografias de MEV do polímero PET com 10% (m/v) de PS em **(a)** $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, **(b)** CHCl_3 , **(c)** THF e **(d)** $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ rotacionados a 3000 rpm.

Para identificar o fato que explica que somente o THF, dentre os solventes estudados, proporcionou a formação de nanoporos de PS mais organizados e regulares analisou-se vários parâmetros físico - químicos dos solventes (**Tabela 5.1**).

Tabela 5.1- Solventes utilizados e suas propriedades físico - químicas.

Solvente	Densidade a 20 °C (g/cm³)^[98]	Viscosidade a 25 °C (mPa.s)^[98]	Solubilidade em água a 20 °C (g/100 mL)^[98]	Tensão superficial a 25 °C (mN/m)^[98]	Tensão interfacial com a água a 20 °C (mN/m)^[98]	Ponto de ebulição (°C)^[98]	Pressão de vapor a 25 °C (kPa)^[98]	Entalpia de vaporização (kJ/mol)^[98]
CH₃(CO)CH₃	0,7899	0,306	<i>miscível</i>	23,46	-	56	30,8	30,99
CHCl₃	1,4832	0,537	0,8	26,5	28,3	61	26,2	31,28
THF	0,8892	0,456	<i>miscível</i>	26,4	-	65	21,6	31,99
C₄H₁₀O	0,71	0,235	6,9	72,8	10,2	35	71,5	27,14

[98]- LIDE, D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 80th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1999.

Muitos trabalhos reportam que a orientação das gotículas esféricas sobre a solução polimérica, no método breath figure requer imiscibilidade entre o solvente e a água e maior densidade do solvente em relação a água [63], [65].

Os solventes estudados se enquadram em dois grupos em relação à solubilidade em água. Os solventes CH₃(CO)CH₃ e THF são miscíveis em água, já o C₄H₁₀O e CHCl₃ possuem solubilidade de 0,069 e 0,008 g/ml a 20°C na água, respectivamente. Este fato demonstra que a solubilidade das gotículas de água, quando inseridas nas soluções de PS com os respectivos solventes, não influencia na formação dos nanoporos de PS, pois o THF e C₄H₁₀O (solventes que proporcionaram filmes porosos) se enquadram em grupos distintos. O mesmo fato ocorre em relação a

maior densidade do solvente em relação à água. O CHCl_3 dentre os solventes estudados é o único solvente que possui densidade maior que a da água.

Os diferentes solventes utilizados possuem ponto de ebulição (p.e.) próximos (exceto o $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), de acordo com a **Tabela 5.1**. Assim, as taxas de correntes de convecção que surgem a partir da evaporação dos solventes são muito parecidas, desta maneira a diferença de morfologia após a deposição da camada de PS na superfície do PET não está relacionada com as correntes de convecção.

A maior razão pela qual o éter etílico (estrutura química muito similar a do THF) não permitir a formação de um filme nanoporoso extenso está relacionada com a solidificação muito rápida do filme polímero. Este fato é favorecido pelo ponto de ebulição relativamente baixo e da alta pressão de vapor do éter etílico. O dissulfeto de carbono é um solvente que em substratos poliméricos apresenta o mesmo comportamento do éter etílico^[10].

Como os parâmetros físico-químicos dos solventes não forneceram subsídios para explicar a razão pela qual o THF possibilitou a formação de filmes de PS nanoporosos, foi analisada a forma pela qual a afinidade termodinâmica entre o PS e os solventes influencia na formação dos nanoporos pelo método breath figure. Para isso utilizou-se os parâmetros de solubilidade de Hansen (PSH)^[99]. A abordagem de Hansen baseia-se no parâmetro de solubilidade R_a ($\text{MPa}^{1/2}$) que é expresso pela

Equação 5.1,

$$R_a^2 = 4(\delta_{D2} - \delta_{D1})^2 + (\delta_{P2} - \delta_{P1})^2 + (\delta_{H2} - \delta_{H1})^2 \quad (5.1)$$

Onde δ_{Di} (energia das forças de dispersão entre as moléculas), δ_{Pi} (energia das forças intermoleculares entre moléculas dipolares) e δ_{Hi} (energia de ligações de hidrogênio entre as moléculas) são componentes do PSH do polímero e solvente, respectivamente. A solubilidade ou alta afinidade termodinâmica requer que o R_a seja menor do que o R_o (raio de interação da esfera do PSH). A razão R_a/R_o é chamada de diferença de energia relativa (DER). Desta forma, quando a DER dos solventes em relação ao PS é menor do que 1, indica uma grande afinidade termodinâmica. E os valores de DER maiores que 1 indicam progressiva diminuição de afinidade termodinâmica.

Os valores de δ_D , δ_P , δ_H , dos solventes, R_o (PS) e DER do PS com os solventes estudados encontram-se na **Tabela 5.2**. Analisando a **Tabela 5.2** pode-se verificar que somente o CHCl_3 possui grande afinidade com o PS e que o THF possui afinidade termodinâmica intermediária em relação aos solventes estudados. Desta forma, por meio da DER dos solventes com o PS também não é possível explicar a formação de filmes porosos organizados somente com o THF.

Tabela 5.2 – Parâmetros de Hansen do PS e seus solventes e suas diferenças de energia relativa.

	δ_D (MPa ^{1/2}) ^[99]	δ_P (MPa ^{1/2}) ^[99]	δ_H (MPa ^{1/2}) ^[99]	R_o (MPa ^{1/2}) ^[99]	<i>Diferença de energia relativa (DER) ao PS</i>
PS	18,50	4,50	2,90	5,30	
CH₃(CO)CH₃	15,50	10,40	7,00		1,77
CHCl₃	17,80	3,10	5,70		0,65
THF	16,80	5,70	8,00		1,18
C₄H₁₀O	14,5	2,9	5,1		1,59

Por meio da análise dos dados das **Tabelas 5.1 e 5.2** é possível inferir que não existe parâmetros físico-químicos e de afinidade termodinâmica, entre os estudados, baseado nos quais seja possível verificar que o THF é o solvente mais adequado para a formação dos filmes nanoporosos de PS quando comparado aos outros solventes estudados. Diversos trabalhos reportam que não é possível formar nanoporos de PS com o solvente THF ^{[68],[100,101]}. No entanto, os mesmos não utilizam o spin coating para depositar a solução de PS sobre os substratos. Dessa forma, podemos atribuir às interações que ocorrem simultaneamente entre o PS/THF/PET e gotículas de água como as responsáveis pela formação dos filmes nanoporosos de PS, quando fazemos uso do sistema de spin coating.

5.5. Considerações finais

Embora, os solventes acetona e clorofórmio possuam características físico-químicas desejáveis para a formação de filmes porosos pelo método breath figure, esses solventes não permitiram a formação dos nanoporos. A acetona, que dentre os solventes estudados é o que possui menor afinidade termodinâmica, demonstrou morfologia inversa a dos nanoporos (microesferas). E o clorofórmio que possui a maior afinidade termodinâmica demonstrou uma morfologia mais rugosa.

Os solventes THF e éter etílico que possuem estruturas químicas muito similares e afinidade termodinâmica intermediária em relação aos solventes estudados, possibilitaram a obtenção de filmes de PS contendo micro e nanoporos. No entanto, quando comparamos o THF e éter etílico em relação à regularidade na formação dos poros, verifica-se que com o THF os poros formados são mais regulares. Esse fato deve-se ao ponto de ebulição relativamente baixo do éter etílico que faz com que o filme de PS solidifique-se muito rápido não permitindo a nucleação e crescimento das gotículas de água com uniformidade.

Tomando como base os experimentos realizados até o momento, não foi possível obter uma conclusão, por meio da análise dos parâmetros físico-químicos e de afinidade termodinâmica dos solventes, do porque somente o THF foi o solvente capaz de proporcionar a formação de nanoporos de PS. Assim, um novo estudo será necessário para entender as interações que ocorrem simultaneamente com o PS/THF/PET e gotículas de água quando fazemos uso do sistema de spin coating.

Capítulo 6



ENSAIO DE ADERÊNCIA/VIABILIDADE DAS CÉLULAS VERO



6.1. Considerações iniciais

Os scaffolds são substratos tridimensionais nos quais as células são semeadas, migram, proliferam e se diferenciam ^[102, 103]. A interação entre a célula e a superfície do substrato é consideravelmente complexa. O mecanismo detalhado permanece desconhecido até hoje, embora se saiba que o comportamento das células é fortemente afetado pela composição química da superfície e topografia ^[104, 105].

Em relação à topografia, alguns estudos ^[104-107] têm sido destinados para melhorar a porosidade e governar o tamanho dos poros dos scaffolds. A porosidade envolve diretamente a totalidade da superfície de um substrato. A área de superfície aumentada é mais atraente, uma vez que pode proporcionar maior espaço para a fixação e crescimento das células. A porosidade das matrizes celulares 3D é muito importante, pois proporciona um espaço maior para a ligação de células em crescimento ^[106]. A conectividade do scaffold permite que as células ligadas se comuniquem umas com as outras, desta forma, o compartilhamento de informações celulares é maior, facilitando a adaptação a um novo ambiente através de comunicação (sinalização) entre células e/ou células-scaffold.

Os scaffolds porosos são os mais desejáveis, pois, promovem a distribuição uniforme das células de difusão, de nutrientes, e o crescimento de comunidades de células organizadas ^[107]. A superfície padronizada é outro fator que favorece a maior viabilidade celular, pois muitas células não podem ancorar em uma superfície lisa.

Os filmes porosos de PS (sobre o PET), padronizados e com diferentes tamanhos de poros e porosidade, obtidos nas rotações de 1000, 3000 e 5000 rpm,

descritos no **Capítulo 2**, serão avaliados como possíveis scaffolds para as células Vero.

6.2. Procedimentos Experimentais

6.2.1. Ensaio de aderência/viabilidade das células Vero

Esse ensaio foi realizado no Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá. Foi realizado o seguinte procedimento: uma suspensão de células Vero foi obtida após tripsinização da monocamada confluenta, contendo $2,0 \times 10^5$ células/mL em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 50 µg/ml de gentamicina. As células foram recolhidas e contadas em câmara hematocitométrica de Neubauer estando previamente diluídas, a fim de obter uma suspensão de $2,5 \times 10^5$ células/mL.

Paralelamente, os filmes nanoporosos de PS suportados no PET obtidos a partir de uma solução 10% (m/v) de PS /THF espalhada nas rotações de 1000, 3000 e 5000 rpm, o controle positivo (placa de PS) e os controles negativos (PET e vidro) foram submersos em álcool 70% por 15 min e em seguida lavados com uma solução salina estéril. Os possíveis scaffolds foram distribuídos em poços de uma placa de 24 poços e 1 mL da suspensão de células foi colocado em cada poço, seguindo-se uma incubação em estufa úmida a 37°C com tensão de 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.3. Caracterizações dos scaffolds e controle com células Vero.

Nos tempos de 2, 4, 6 e 24 horas a placa era visualizada em microscópio invertido e fotografada. Após 24 horas de incubação, foi determinada a viabilidade das células pelo método colorimétrico da sulforodamina B ^[108]. O procedimento utilizado para determinar a viabilidade celular foi: as culturas de células Vero foram fixadas com ácido tricloroacético e em seguida, coradas durante 30 minutos com 0,4% (m/v) sulforodamina B dissolvida em ácido acético 1%. O corante não ligado foi removido por quatro lavagens com 1% de ácido acético, e o corante ligado à proteína das células foi extraído com 10 mmol/L da base não tamponada [tris (hidroximetil) aminometano]. Na determinação da densidade óptica foi utilizado um leitor de ELISA (Bio-Tek FL-600 Microplate Fluorescence Reader), em 530 nm.

A preparação das amostras para MEV foi efetuada da seguinte maneira: no final de 24 horas de cultura, aspirou-se o meio de cultura, sem tocar no fundo do poço e nos scaffolds. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente, nas paredes das cavidades, 1 ml por poço de solução tampão fosfato pH 7, 4 (PBS). Após 10 minutos, removeu-se o PBS e adicionou-se de encontro às paredes das cavidades, 1 ml por poço de solução de glutaraldeído a 2,5% em PBS, para fixar as células. Na sequência, colocou-se as placas com glutaraldeído na geladeira por 1 hora. Após este tempo, removeu-se o fixador e adicionou-se, por poço, 1 mL de PBS de encontro às paredes dos poços. A lavagem com PBS foi cuidadosamente repetida.

A desidratação das amostras foi realizada utilizando uma série de concentração crescente de soluções de etanol de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% e 100%. Este procedimento foi repetido por duas vezes e em cada vez a amostra ficou em contato com a solução de etanol durante 15 minutos. Após a desidratação, as células foram deixadas em etanol 100% até serem colocadas em hexametildisilazano (HMDS).

Para a secagem em HDMS, as amostras ficaram imersas no mesmo, três vezes, durante 10 minutos de cada vez. Por fim, retirou-se o máximo de HDMS e a amostra foi seca na capela durante a noite. A morfologia das células nos scaffolds e controle foi analisada por MEV em equipamento da marca Shimadzu, modelo SS 550 Superscan. Os parâmetros utilizados foram: voltagem de aceleração de 10 kV e intensidade de corrente de 41 μ A. A superfície das amostras foi previamente coberta com uma fina camada de ouro.

6.4. Resultados e discussão

6.4.1. Ensaio de aderência/viabilidade das células Vero

Os filmes nanoporosos de PS depositados em PET foram avaliados como possíveis mimetizadores de MECs ou scaffolds e a adesão e o crescimento de células Vero foram analisadas em microscópio invertido. As Figuras **6.1**, **6.2**, **6.3** e **6.4** apresentam imagens de microscópio invertido após 2, 4, 6 e 24 horas respectivamente. Neste estudo, as células com formato arredondado não estão aderidas ao substrato e conseqüentemente possuem pequeno tempo de vida. Analisando as imagens das **Figuras 6.1, 6.2 e 6.3** observa-se que a aderência das células no controle é maior que a do PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com rotações a 1000, 3000 e 5000 rpm. No entanto, quando analisamos a **Figura 6.4** não é possível verificar diferença de aderência celular entre o controle e as amostras de filmes porosos de PS em PET preparadas nas rotações de 3000 e 5000 rpm. Nas primeiras horas de crescimento, as células Vero não se aderiram da mesma forma que o controle. Isso está relacionado ao tempo de adaptação que as células necessitaram para explorarem as três (3) dimensões do espaço.

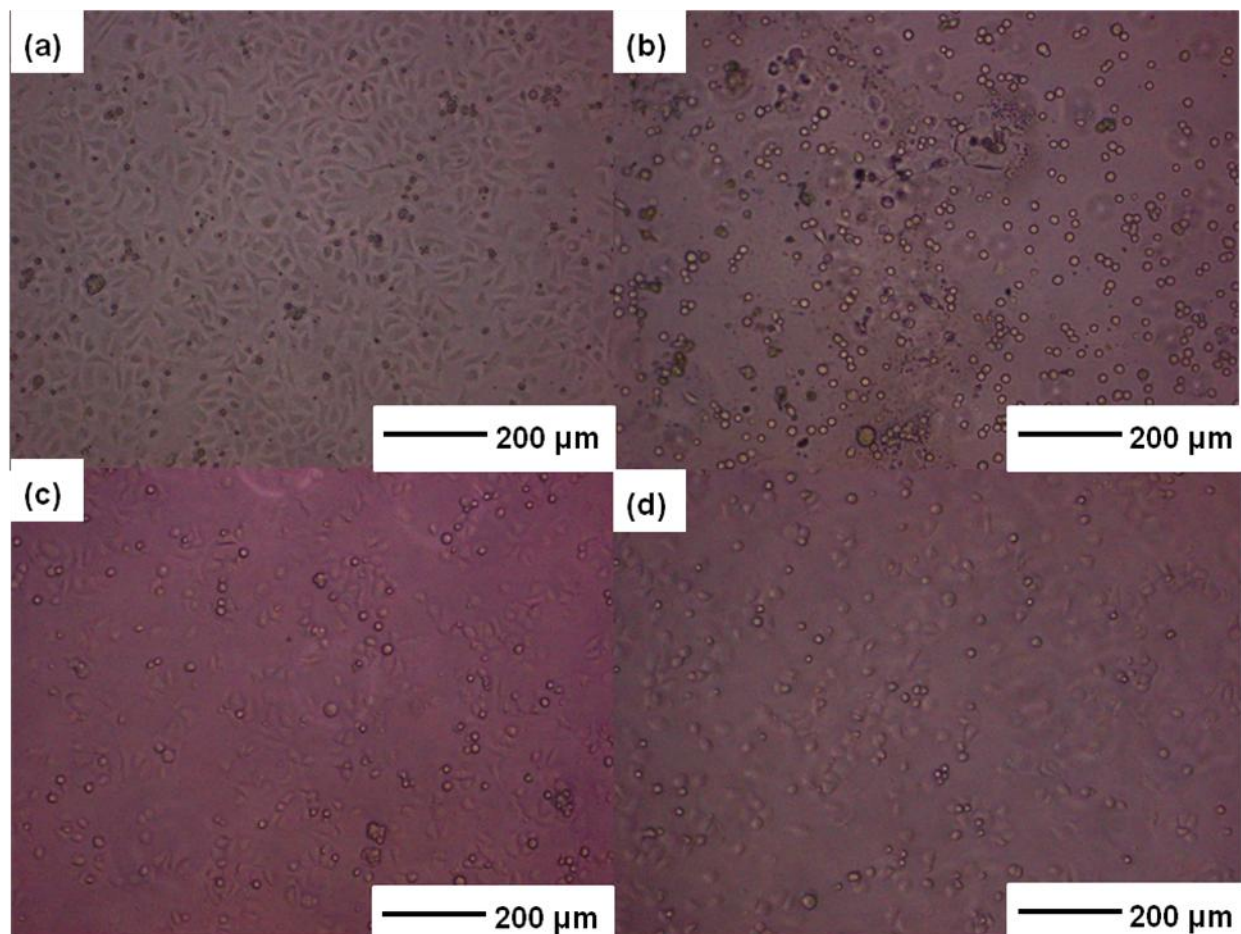


Figura 6.1 – Imagens do microscópio invertido das células Vero com 2 horas de crescimento em **(a)** controle (placa de poliestireno) e dos filmes porosos de PS em PET obtidos após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS / THF nas rotações de **(b)** 1000, **(c)** 3000 e **(d)** 5000 rpm.

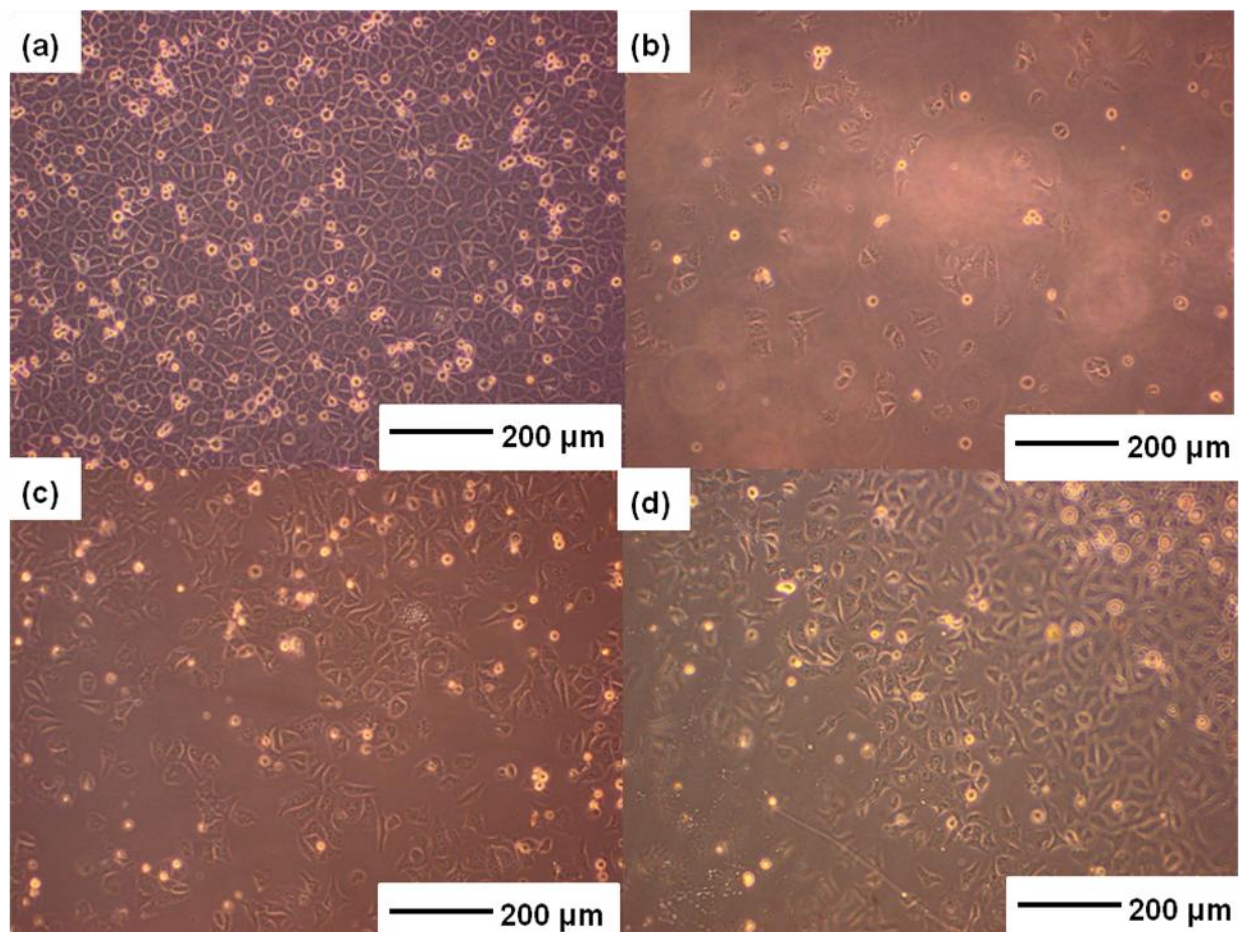


Figura 6.2 – Imagens do microscópio invertido das células Vero com 4 horas de crescimento em (a) controle (placa de poliestireno); e dos filmes porosos de PS em PET obtidos após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS / THF nas rotações de (b) 1000, (c) 3000 e (d) 5000 rpm.

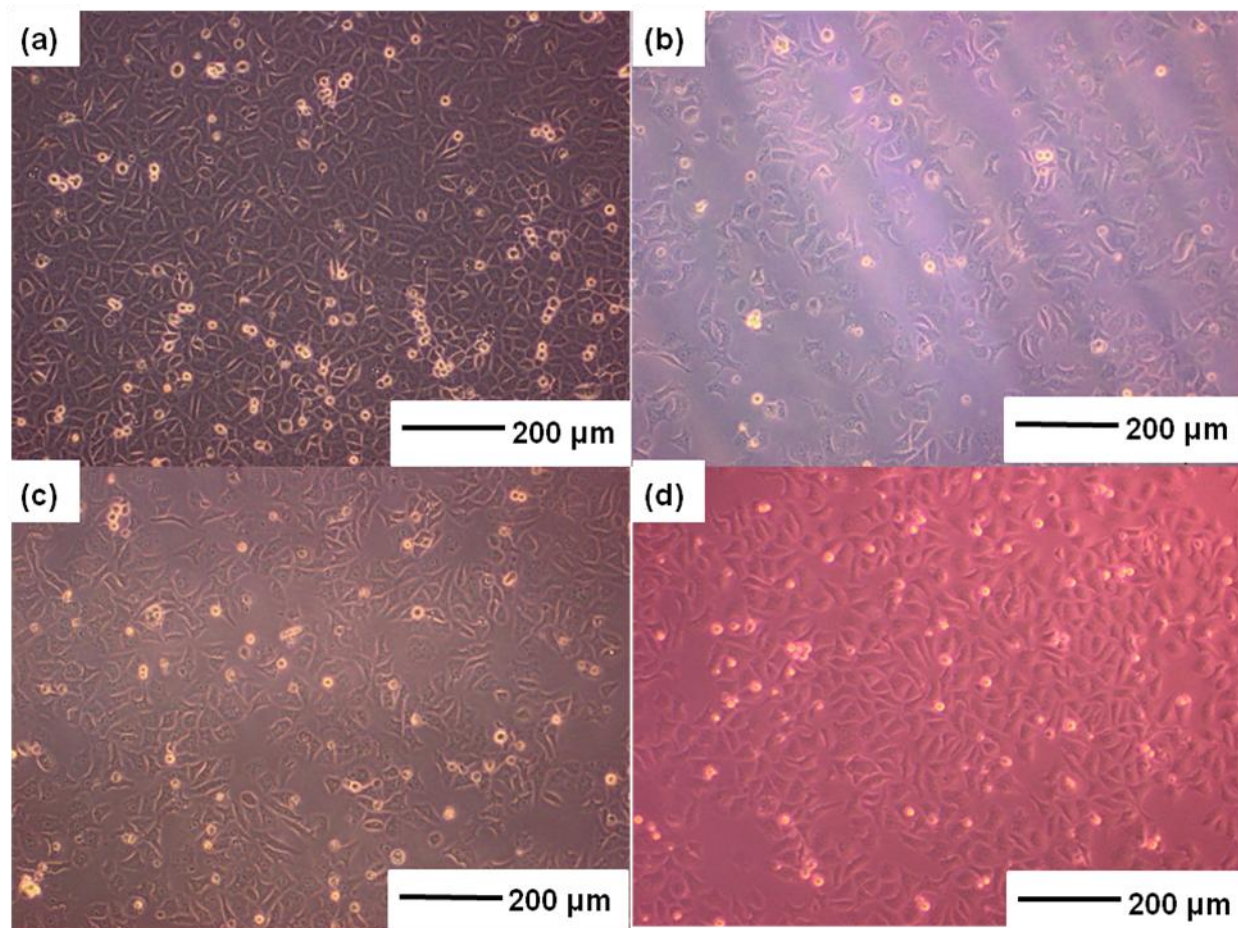


Figura 6.3 – Imagens do microscópio invertido das células Vero com 6 horas de crescimento em **(a)** controle (placa de poliestireno); e dos filmes porosos de PS em PET obtidos após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS / THF nas rotações de **(b)** 1000, **(c)** 3000 e **(d)** 5000 rpm.

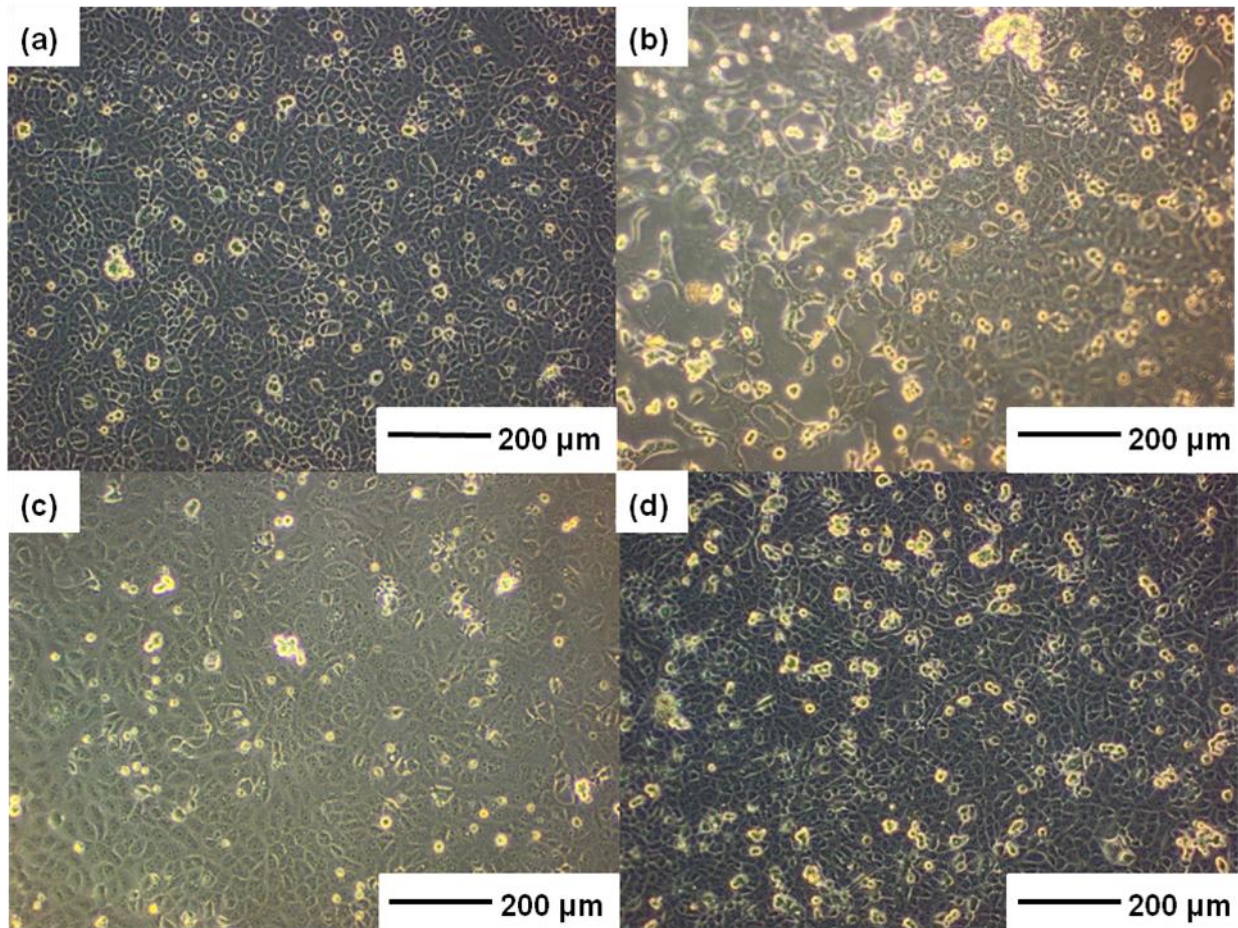


Figura 6.4 – Imagens do microscópio invertido das células Vero com 24 horas de crescimento em (a) controle (placa de poliestireno); e dos filmes porosos de PS em PET obtidos após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS / THF nas rotações de (b) 1000, (c) 3000 e (d) 5000 rpm.

Micrografias de MEV foram obtidas após o crescimento das células Vero por 24 horas nos controles negativos (vidro e PET) e nos filmes porosos de PS depositados em PET (**Figura 6.5**). É possível verificar que existem pequenas áreas em que as células não cresceram (devido ao pequeno tempo de crescimento das células analisado). Nas **Figuras 6.5 (d), (f) e (h)** é possível observar estas áreas (marcadas no círculo vermelho), nas quais o citoplasma das células está começando a interagir com os substratos tridimensionais sintetizados.

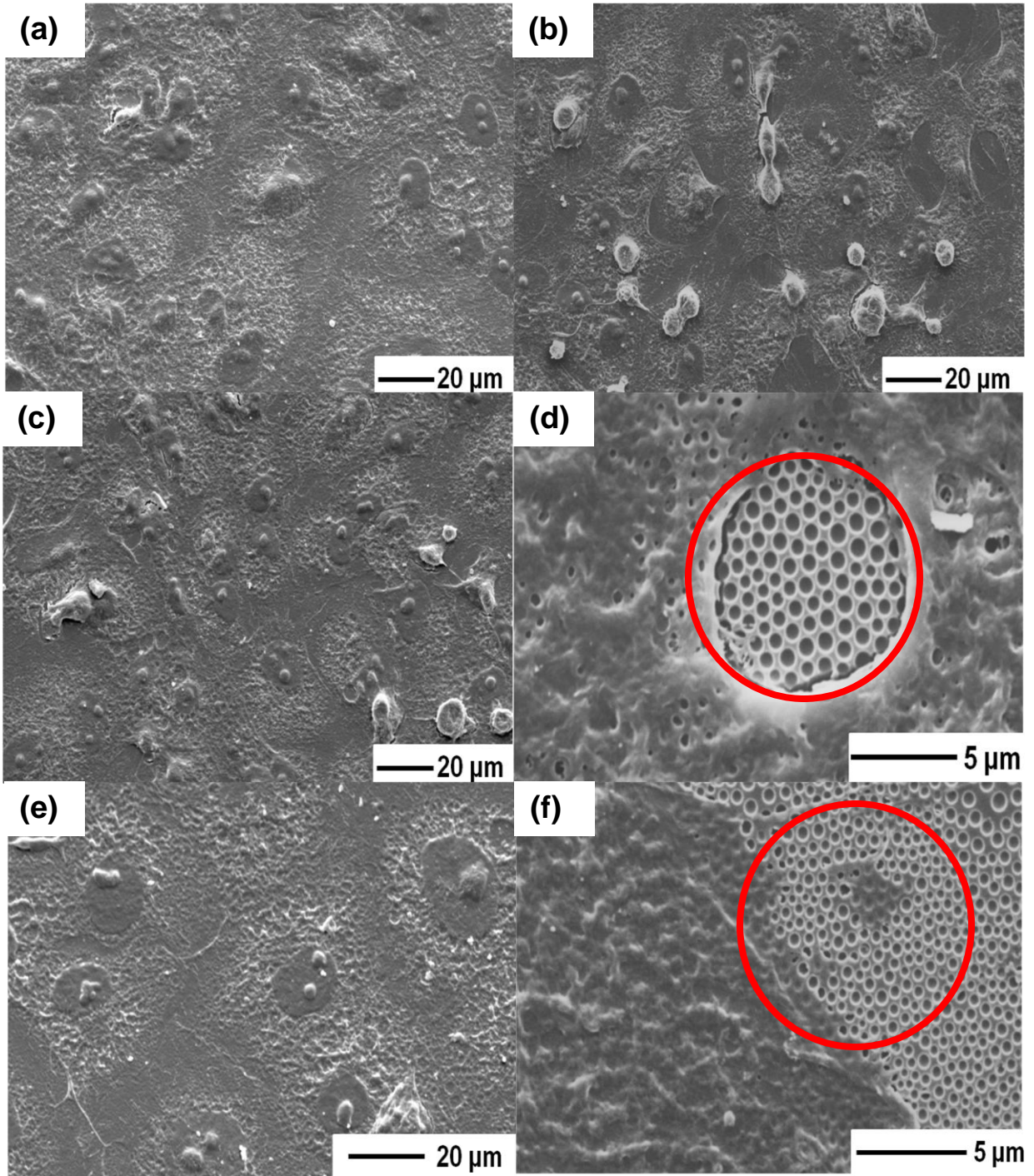


Figura 6.5 - Micrografias de MEV das células Vero com 24 horas de crescimento nos controles negativos (a) vidro, (b) PET e do PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com as seguintes rotações (c) e (d) 1000, (e) e (f) 3000 rpm.

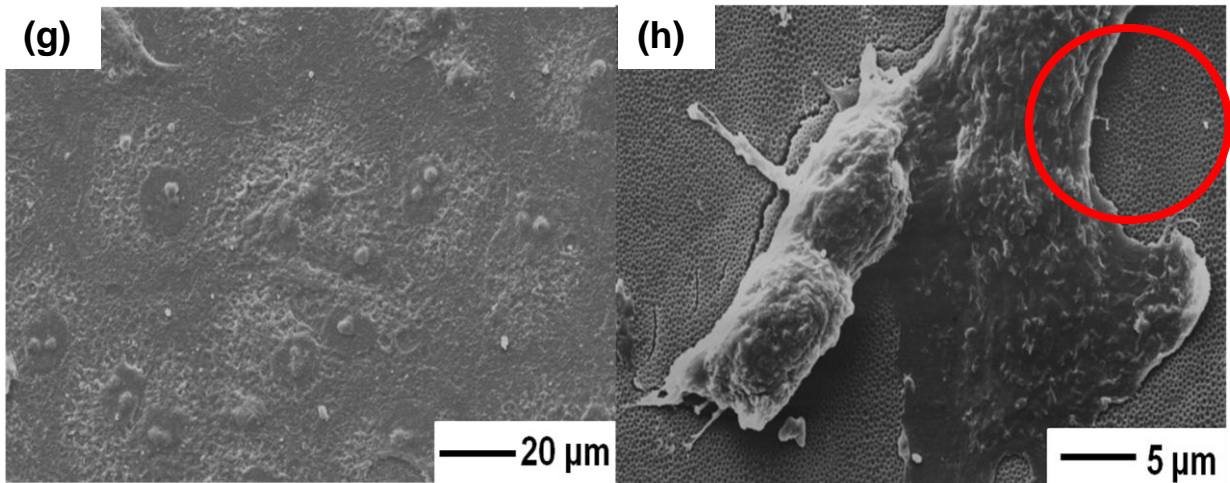


Figura 6.5 (continuação)- Micrografias de MEV das células Vero com 24 horas de crescimento no PET após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS em THF com as seguintes rotações (g) e (h) 5000 rpm.

Analisando as **Figuras 6.4** e **6.5** verifica-se que não é possível distinguir pela adesão celular entre os scaffolds preparados qual é o melhor para o crescimento e diferenciação das células Vero, no entanto é perfeitamente visível que as células cresceram e se proliferaram muito bem. Na **Figura 6.6** foi esquematizado, de forma pictórica, o crescimento e proliferação das células.

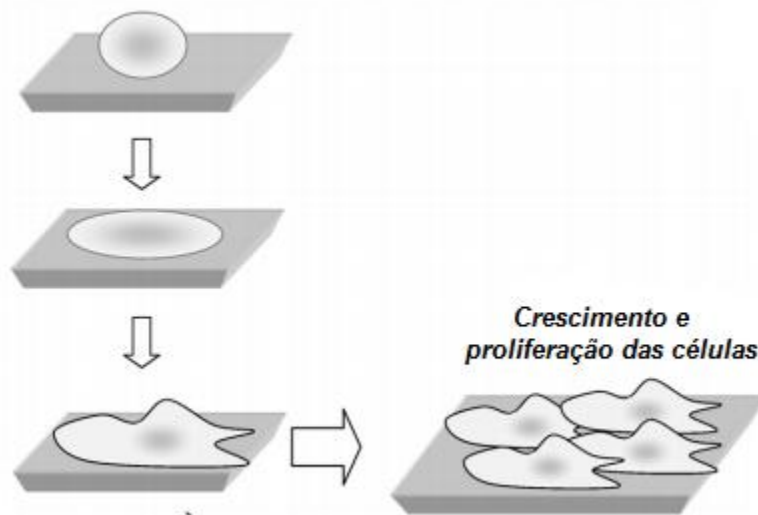


Figura 6.6- Esquema ilustrativo da morfologia das células quando as mesmas são semeadas e posteriormente crescem e se proliferam.

Foi realizado um teste de viabilidade celular que se baseia na capacidade do corante fluorescente sulforodamina B ligar-se na base dos aminoácidos das proteínas celulares, desta forma, a medida colorimétrica do corante acoplado fornece uma estimativa da massa total de proteína, que está relacionada com o número de células.

A **Figura 6.7** apresenta a viabilidade das células Vero determinada com o auxílio do corante sulforodamina B do controle positivo (placa de poliestireno), dos controles negativos (vidro e PET) e dos micro e nanoporos obtidos a 1000, 3000 e 5000 rpm. A partir da **Figura 6.7** é possível verificar que a viabilidade celular para as amostras de PET com solução 10% (m/v) de PS em THF rotacionada a 3000 rpm é 2 vezes maior que o controle positivo e a 5000 rpm é 1,5 vezes maior que o mesmo controle. A viabilidade celular dos controles negativos é maior que os filmes porosos de PS sintetizados, isso é devido à superfície destes substratos serem mais hidrofílicas, o que a torna mais favorável para as células do que as hidrofóbicas ^[109-111], como as placas de PS e os filmes micro e nanoporosos de PS.

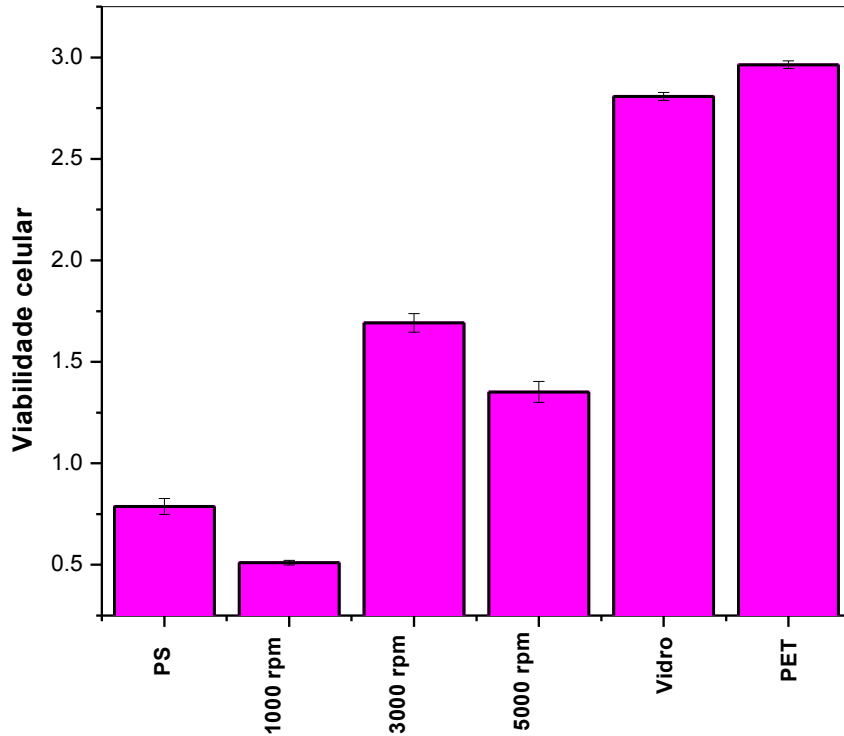


Figura 6.7 - Viabilidade das células Vero determinada pelo corante fluorescente sulforodamina B no controle positivo (placa de PS) e nos controles negativos (vidro e PET) e no PET após a deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF com rotações a: 1000, 3000 e 5000 rpm.

Em relação aos resultados de viabilidade celular dos materiais obtidos, deve-se ressaltar que o tamanho médio, distribuição de tamanho, volume, interconectividade e forma dos poros, são parâmetros importantes a serem analisados nos potenciais scaffolds. No entanto, o tamanho do poro é a questão mais importante, porque se os poros forem muito pequenos, os mesmos impedirão a penetração celular ^[112].

Os micro e nanoporos produzidos possuem diâmetro médio que variam de 1,22 μm a 256 nm. A maior viabilidade celular dos nanoscaffolds com diâmetro de poro de 346 nm (obtidos a 3000 rpm) e 256 nm (obtidos a 5000 rpm), frente ao controle positivo, demonstra que estes realmente mimetizam as interações que as células possuem com as nanoproteínas da MEC. No entanto, a viabilidade celular do scaffold obtido a 5000 rpm é menor que o a 3000 rpm, devido ao tamanho e principalmente a

profundidade dos nanoporos ser muito pequena (cerca de 22 nm contra 96 nm (condição de 3000 rpm)) para uma interação tão expressiva como na condição de 3000 rpm. A pequena profundidade faz com que o scaffold comece a comportar-se como uma superfície plana.

Para os microscaffolds, que possuem diâmetro de 1,22 μm , a mimetização do ambiente da MEC não foi eficaz. Isso ocorre porque quanto maior o diâmetro do poro, menor a influencia da nanotopografia da superfície e também essa condição é a que gerou filmes mais hidrofóbicos (molhabilidade de 103°), o que afeta diretamente a viabilidade celular, a adesão, a organização, a morfologia e a diferenciação das células

[113-116].

6.5. Considerações finais

Apesar dos filmes nanoporosos obtidos a 3000 e 5000 rpm não apresentarem viabilidade superior aos controles negativos os resultados obtidos frente ao controle positivo (placa de PS) são bastante relevantes. A maior área de superfície proporcionada pelos nanoporos fez com que fosse possível mimetizar com maior eficiência as interações que as células possuem com as nanoproteínas da MEC

Capítulo 7

CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

7.1 Considerações finais e conclusões

A formação de filmes porosos de PS sobre os substratos poliméricos estudados pelo método breath figure foi possível somente com o processo de spin coating (secagem dinâmica). O aumento da velocidade do spin coating induz a mudança no diâmetro e na rugosidade dos nanoporos em rotações até 5000 rpm, acima desta rotação a velocidade de secagem do solvente volátil (THF) se mantém constante. As rotações do spin coating estudadas induziram a formação de poros com diâmetro médio que variou de 1,2 μm a 202 nm com rugosidade média de 130 a 25 nm, respectivamente.

Na superfície dos polímeros PET, PEBD, PDMS, PTFE triboeletrizado e do vidro obteve-se nanoporos de PS com diâmetro médio de 507 a 123 nm e com rugosidade média de 132 a 6 nm, respectivamente. Um aspecto bastante positivo demonstrado neste trabalho foi a obtenção de nanoporos de PS em polímeros muito hidrofóbicos como PEBD e PDMS. Outro fato interessante está relacionado com o uso do solvente THF, com o qual foi possível, de forma inédita, obter filmes nanoporosos de PS sobre o vidro por spin coating.

Dentre as concentrações poliméricas estudadas, somente as concentrações de 10% e 20% (m/v) de PS foram adequadas para formar filmes nanoporosos com organização e regularidade. Em concentrações poliméricas de 5% (m/v) de PS/THF não foi possível a formação de moldes das gotículas de água, pois as mesmas coalescem quando adentram a solução polimérica. Filmes porosos regularmente estruturados não foram obtidos com concentrações altas de PS/THF como 25%, 30% e

35% (m/v), pois o aumento da concentração induz a convecção mais lenta da solução, resultando em um acondicionamento insuficiente das gotículas de água na solução polimérica.

O uso de solventes tais como, clorofórmio e acetona não foram eficazes na formação dos filmes nanoporosos de PS.

O uso de solvente com alta pressão de vapor, tal como éter etílico, induz a rápida solidificação do filme de PS não permitindo a nucleação e crescimento das gotículas de água com uniformidade, formando micro e nanoporos desordenados. Por meio dos parâmetros físico-químicos e da afinidade termodinâmica avaliados, não foi possível identificar o fenômeno que explica porque somente o THF, dentre os solventes estudados, foi o solvente capaz de formar os filmes nanoporosos pelo método breath figure.

O cultivo das células Vero sobre os nanoporos sintetizados nas rotações de 3000 e 5000 rpm apresentaram viabilidade superior, quando comparado com o controle positivo, evidenciando que os materiais sintetizados possuem maior poder de mimetização da MEC do que a placa de PS em 2D. Desta forma, os scaffolds sintetizados podem ser utilizados para o crescimento de células com maior eficácia que o substrato comumente utilizado.

7.2 Perspectivas futuras

- ✓ Diminuir a temperatura do substrato, utilizando nitrogênio líquido para aumentar o gradiente de temperatura possibilitando obter materiais com poros de maior profundidade
- ✓ Mudar a umidade do ar, para obter poros com diferentes tamanhos e profundidades;
Trabalhar com polímeros de alta massa molar e com baixa polidispersão;
- ✓ Trabalhar com copolímeros anfifílicos
- ✓ Trabalhar com polímeros com a adição de surfactantes;
- ✓ Realizar um estudo com mistura de solventes na formação de estruturas pelo método breath figure
- ✓ Estudar a aplicação destes filmes poliméricos como padrões de calibração do MFA;
- ✓ Testar a adesão celular dos diversos scaffolds obtidos com linhagens de células vegetais e animais, assim como, tumorais e sadias;
- ✓ Preparar pelo método breath figure filtros nanoporosos de PS em superfícies de polilisina para aumentar a aderência e a viabilidade das células Vero nos scaffolds;
- ✓ Preparar pelo método breath figure filtros nanoporosos de PS em superfícies de poli (*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAA) para melhorar o descolamento das células dos scaffolds.

Referências

Referências

1. TANEV, P. T.; CHIBWE, M.; PINNAVAIA, T. J. Titanium-containing mesoporous molecular sieves for catalytic oxidation of aromatic compounds. **Nature**, v. 368, p. 321-323, 1994.
2. WALHEIM, S.; SCHAFFER, E.; MLYNEK, J.; STEINER, U. Nanophase-separated polymer films as high-performance antireflection coatings **Science**, v. 283, p. 520-522, 1999.
3. HILLER, J. A.; MENDELSON, J. D.; RUBNER, M. F. Reversible erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. **Nat. Mater.**, v. 1, p. 59-63, 2002.
4. IBN-ELHAJ, M.; SCHADT, M. Optical polymer thin films with isotropic and anisotropic nano-corrugated surface topologies. **Nature**, v. 410, p. 796-799, 2001.
5. BOLOGNESI, A.; BOTTA, C.; YUNUS, S. Micro-patterning of organic light emitting diodes using self-organised honeycomb ordered polymer films. **Thin Solid Films**, v. 492, p. 307–312, 2005.
6. YABLONOVITCH, E.; GMITTER, T. J.; MEADE, R. D.; RAPPE, A. M.; BROMMER, K.D.; JOANNOPOULOS, J. D Donor and acceptor modes in photonic band structure. **Phys. Rev. Lett.**, v. 67, p. 3380–3383, 1991.
7. IMADA, M.; NODA, S.; CHUTINAN, A.; TOKUDA, T.; MURATA, M.; SASAKI, G. Coherent two-dimensional lasing action in surface-emitting laser with triangular-lattice photonic crystal structure. **Appl. Phys. Lett.**, v. 75, p. 316–318, 1999.
8. HOLTZ, J. H.; ASHER, S. A. Polymerized colloidal crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials. **Nature**, v. 389, p. 829-832, 1997.
9. CHARI, K.; LANDER, C. W.; SUDOL, R. J. Anamorphic microlens arrays based on breath-figure template with adaptive surface reconstruction. **Appl. Phys. Lett.**, v. 92, p. 111916, 2008.
10. WU, C. Y.; CHIANG, T.H.; HSU, C.C. Fabrication of microlens array diffuser films with controllable haze distribution by combination of breath figures and replica molding methods. **Opt. Express**, v. 16, p. 19978–19986, 2008.

11. YANG, G.; XIONG, X.; ZHANG, L. Microporous formation of blend membranes from cellulose/konjac glucomannan in NaOH/thiourea aqueous solution. **J. Membr. Sci.** , v. 201, p. 161–173, 2002.
12. NISHIKAWA, T.; NISHIDA, J.; OOKURA, R.; NISHIMURA, S. I.; WADA, S.; KARINO, T.; SHIMOMURA, M. Mesoscopic patterning of cell adhesive substrates as novel biofunctional interface. **M. Mater. Sci. Eng. C**, v. 10, p. 141-146, 1999.
13. NISHIKAWA, T.; NISHIDA, J.; OOKURA, R.; NISHIMURA, S. I.; WADA, S.; KARINO, T.; SHIMOMURA, M. Honeycomb-patterned thin films of amphiphilic polymers as cell culture substrates. **M. Mater. Sci. Eng. C** , v. 9, p. 495-500, 1999.
14. LI, R. R.; DAPKUS, P. D.; THOMPSON, M.E.; JEONG, W.G.; HARRISON, C.; CHAIKIN, P.M.; REGISTER, R.A.; ADAMSON, D. H. Dense Arrays of Ordered GaAs Nanostructures by Selective Area Growth on Substrates Patterned by Block Copolymer Lithography. **Appl. Phys.Lett.**, v. 76, p. 1689-1691, 2000.
15. GORZOLNIK, B.; MELA, P.; MOELLER, M. Nano-structured micropatterns by combination of block copolymer self-assembly and UV photolithography. **Nanotechnology** , v. 17, p. 5027, 2006.
16. SEGALMAN, R. A.; YOKOYAMA, H.; KRAMER, E. J. Graphoepitaxy of Spherical Domain Block Copolymer Films. **Adv. Mater.**, v. 13, p. 1152–1155, 2001.
17. SUNDRANI, D.; DARLING, S. B.; SIBENER, S. J. Hierarchical Assembly and Compliance of Aligned Nanoscale Polymer Cylinders in Confinement. **Langmuir** , v. 20, p. 5091-5099, 2004.
18. ITO, T.; OKAZAKI, S. Pushing the limits of lithography. **Nature**, v. 406, p. 1027-1031, 2000.
19. SEGALMAN, R. A. Directing Self-Assembly Toward Perfection. **Science**, v. 321, p. 919-920, 2008.
20. MULDER, M. *Basic Principles of Membrane Technology*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers:, p. Chapter 3, **1996**.
21. HOA, M. L. K.; LU, M. H.; ZHANG, Y. Preparation of Porous Materials with Ordered Hole Structure. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 121, p. 9-23, 2006.
22. BUNZ, U. H. F. Breath figures as a dynamic templating method for polymers and nanomaterials. **Adv.**

- Mater.**, v. 18, p. 973–989, 2006.
23. WIDAWSKI, G.; RAWISO, M.; FRANÇOIS, B. Self-organized honeycomb morphology of star-polymer polystyrene films.. **Nature**, v. 369, p. 387-389, 1994.
24. FRANÇOIS, B.; PITOIS, O.; FRANÇOIS. Polymer films with a self-organized honeycomb morphology. **J. Adv. Mater.** , v. 7, p. 1041-1044, 1995.
25. PITOIS, O.; FRANÇOIS, B. Crystallization of condensation droplets on a liquid surface. **Colloid Polym. Sci**, v. 277, p. 574-578, 1999.
26. PITOIS, O.; FRANÇOIS, B. Formation of ordered micro-porous membranes. **Eur. Phys. J. B** , v. 8, p. 225-231, 1999.
27. SRINIVASARAO, M.; COLLINGS, D.; PHILIPS, A.; PATEL S. Three-dimensionally ordered array of air bubbles in a polymer film. **Science** , v. 292, p. 79-83, 2001.
28. BEYSENS, D.; KNOBLER, C. M. Growth of breath figures. **Phys. Rev. Lett.** , v. 57, p. 1433-1436, 1986.
29. FAMILY, F.; MEAKIN, P. Scaling of the droplet-size distribution in vapor-deposited thin films. **Phys. Rev. Lett.** , v. 61, p. 428-431, 1988.
30. CHENG, J. Y.; ROSS, C.A.; THOMAS, E.L.; SMITH, H.I.; VANCOSO , G.J. Templated Self-Assembly of Block Copolymers: Effect of Substrate Topography. **Adv. Mater.**, v. 15, p. 1599–1602, 2003.
31. LIMAYE, A. V.; NARHE, R. D.; DHOTE, A.M.; OGALE, S.B. Evidence for convective effects in breath figure formation on volatile fluid surfaces. **Phys. Rev. Lett.** , v. 76, p. 3762-3765, 1996.
32. GAO, Y. F.; HUANG , Y.J.; XU , S.Y.; OUYANG , W. J.; JIANG, Y. B. Ordered Honeycomb Microporous Films from Self-Assembly of Alkylated Guanosine Derivatives. **Langmuir** , v. 27, p. 2958–2964, 2011.
33. HERNANDEZ-GUERRERO, M.; STENZEL, M. H. Honeycomb structured polymer films via breath figures. **Polym. Chem** , v. 3, p. 563–577, 2012.
34. LEÓN, A. S.; del CAMPO, A.; FERNADEZ, M. G.; RODRIGUEZ, J. H.; MUNOZ, A.B. Hierarchically

- structured multifunctional porous interfaces through water templated self-assembly of ternary systems. **Langmuir**, v. 28, p. 9778–9787, 2012.
35. WANG, C.; ZHANG, Y., Protein micropatterning via self-assembly of nanoparticles **Adv. Mater.**, v. 17, p.150-153, 2005.
36. BLAWAS, A. S.; REICHERT, W. M., Protein patterning. **Biomaterials**, v. 19, p. 595-609, 1998.
37. MRKSICH, M.; WHITESIDES, G. M. Patterning Self-Assembled Monolayers Using Microcontact Printing: A New Technology for Biosensors? **Trends in Biotechnology**, v.13, p. 228-235, 1995.
38. XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. "Soft Lithography". **Angew. Chem.**, v.37, p.550, 1998.
39. JENEKHE, S. A.; CHEN, X. L. Self-Assembly of Ordered Microporous Materials from Rod-Coil Block Copolymers. *Science*, v.283 p.372, 1999.
40. MITSUISHI, M.; LI, T. S.; MIYASHITA, T. Surface Plasmon Characterization of Positive-Tone Photoimaging in Polymer Langmuir–Blodgett Films. **Langmuir**, v.18. p. 10035–10038, 2002.
41. MOREAU, W. M., "*Semiconductor lithography: Principles and Materials*", Plenum, New York, **1988**.
42. KIM, E.; XIA, Y.; WHITESIDES, G.M. Polymer microstructures formed by moulding in capillaries, **Nature**, v.376, p. 581–584, 1995.
43. VELEV, O.D.; JEDE, T. A.; LOBO, R. F.; LENHOFF, A. M. Porous silica via colloidal crystallization. **Nature**, v. 389, p.447, 1997.
44. BOHREN, C.F. *Clouds in a Glass of Beer: Simple Experiments in Atmospheric Physics*. Dover Publications, **2001**.
45. MIDDLETON, W.E.K., *History of the Theories of Rain and Other Forms of Precipitation*. New York: Franklin Watts, **1966**.
46. RAYLEIGH, *Breath figures*. **Nature**, v. 86, p. 416-418, 1911.
47. AITKENS, J. *Breath Figures*. **Nature**, v.86, p. 516-517, 1911.
48. RAYLEIGH, *Breath figures*. **Nature**, v. 90, p. 436-438. 1912.

49. BRISCOE, B.J.; GALVIN, K.P. *The evolution of a 2D-constrained growth system of droplets - breath figures*. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 23, p. 422-428, 1990.
50. STEYER, A., GUENOUN, P.; BEYSENS, D.; FRITTER, D.; KNOBLER, C. M. Growth of droplets on a one dimensional surface – experiments and simulation. **Europhysics Letters**, v. 12, p. 211-215, 1990.
51. STEYER, A.; GUENOUN, P.; BEYSENS, D.; KNOBLER, C. M. *Two-dimensional ordering during droplet growth on a liquid surface*. **Physical Review B**, v. 42, p. 1086-1089, 1990.
52. BEYSENS, D., STEYER, A.; GUENOUN, P.; FRITTER, D.; KNOBLER, C.M. *How does dew form*. **Phase Transitions**, v.31, p. 219 - 246. 1991.
53. FRITTER, D.; KNOBLER, C.M.; BEYSENS, D. A. Experiments and simulation of the growth of droplets on a surface (breath figures). **Physical Review A**, v. 43, p. 2858-2869, 1991.
54. BEYSENS, D.; KNOBLER, C.M. Dew Formation. **Recherche**, v.23, p.808-817, 1992.
55. STEYER, A.; GUENOUN, P.; BEYSENS, D. Hexatic and fat fractal structures for water droplets condensing on oil. **Physical Review E**, v. 48, p. 428-431, 1993.
56. BEYSENS, D.; The formation of dew. **Atmospheric Research**, v.39, p. 215- 237. 1995.
57. BAKER, T.J.; Breath figures. **Philosophical Magazine**, v. 44, p.752-765. 1922.
58. SPURR, R.T.; BUTLIN, J.G. Breath figures. **Nature**, v.179, p.1187,1957
59. SONG, L.; SHARMA, V.; PARK; J. O.; SRINIVASARAO, M. Characterization of ordered array of micropores in a polymer film. **Soft Matter**, v.7, p. 1890–1896, 2011.
60. SOMMERFELD, A., *Optics: Lectures on Theoretical Physics*, Volume 4. New York: Academic Press, 1954.
61. MARUYAMA, N.; KOITO, T.; NISHIDA, J.; SAWADAISHI, T.; CIEREN, X.; KJIRO, K.; KARTHAUS, O.; SHIMOMURA, M. Mesoscopic patterns of molecular aggregates on solid substrates. **Thin Solid Films**, v.327,p. 854, 1998.
62. LIU, W.; LIU, R.; LI, Y.; WANG, W.; MA, L.; WU, M.; HUANG, Y. Self-organized ordered microporous thin films from grafting copolymers. **Polymer**, v.50,p. 2716–2726, 2009.

63. SHARMA, V.; SONG, L.L.; JONES, R.L.; BARROW, M.S.; WILLIAMS, R.; SRINIVASARAO M. Effect of solvent choice on breath-figure-templated assembly of “holey” polymer films. **Epi-Europhys Lett.**, v. 91, p.38001-38017, 2010.
64. ESCALÉ, P.; RUBATAT, L.; BILLON, L.; SAVE, M. Recent advances in honeycomb-structured porous polymer films prepared via breath figures. **European Polymer Journal**, v. 48, p. 1001–1025, 2012.
65. FERRARI, E.; FABBRI, P.; PILATI, F. Solvent and Substrate Contributions to the Formation of Breath Figure Patterns in Polystyrene Films. **Langmuir**, v. 27, p. 1874–1881, 2011.
66. PILATI, F.; MONTECCHI, M.; FABBRI, P.; SYNYTSKA, A.; MESSORI, M.; TOSELLI M.; GRUNDKE, K.; POSPIECH, D. Design of surface properties of PET films: effect of fluorinated block copolymers. **J. Colloid Interface Sci**, v. 315, p. 210-222, 2007.
67. GHANNAM, L.; MANGUIAN, M.; FRANÇOIS, J.; BILLON, L. A versatile route to functional biomimetic coatings: ionomers for honeycomb-like structures. **Soft Matter**, v. 3, p. 1492–1499, 2007.
68. MAUL, J.; FRUSHOUR, B. G.; KONTOFF, J. R.; EICHENAUER, H.; OTT, K.H.; SCHADE C. Polystyrene and Styrene Copolymers. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
69. MARK, J. E. *Polymer Data Handbook (2nd Edition)*. Oxford University Press, **2009**.
70. DOROUDIANI. S.; KORTSCHOT, M.T. Expanded Wood Fiber Polystyrene Composites: Processing-Structure-Mechanical Properties Relationships. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, v. 17, p. 13–30, 2004.
71. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; **Molecular Biology of the Cell**, New York: Garland Science; Fourth Edition [Hardcover] 2002.
72. MANUTENÇÃO de linhagens de células animais. In: Fundação Oswaldo Cruz, Manual da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, **2008**.
73. ZHANG, S.; GELAIN, F.; ZHAO, X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 413–420, 2005.

74. ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, p. 66—80, 2009.
75. FAHLMAN, B. D. *Materials Chemistry*. Dordrecht, Netherlands: Springer, **2007**.
76. LODISH, H.; BERK, A.; . ZIPURSKY, S. L.; . MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; JAMES, D. *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman and Company, **2002**.
77. FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 4. ed. [S.l.]: Nova, 1994.
78. STENZEL, M. H.; BARNER-KOWOLLIK C.; DAVIS, T. P. Formation of Honeycomb-Structured, Porous Films via Breath Figures with Different Polymer Architectures. **J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.**,v. 44, p. 2363-2375, 2006.
79. STENZEL-ROSENBAUM M. H.; DAVIS,T. P.; FANE, A. G.; CHEN, V. Porous Polymer Films and Honeycomb Structures Made by the Self-Organization of Well-Defined. Macromolecular Structures Created by Living Radical Polymerization Techniques **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.40, p. 3428-3432, 2001.
80. FREEMAN, W.J. Characterization of polymers. In: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. vol. 3. Jacqueline I. Kroschwitz (Ed.) John Wiley & Sons, Nova York, **1985**.
81. CONG, H.; WANG, J.; YU, B.; TANG, J. Preparation of a highly permeable ordered porous microfiltration membrane of brominated poly(phenylene oxide) on an ice substrate by the breath figure method. **Soft Matter**, v. 8, p. 8835-8839., 2012.
82. BEATTIE, D.; WONG, K. H.; WILLIAMS, C.; POOLE-WARREN, L.A.; DAVIS, T.P.; BARNER-KOWOLLIK, C.; STENZEL, M. H. Honeycomb structured porous films prepared from polypyrrole containing block copolymers prepared via RAFT polymerization as a scaffold for cell growth. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1072-1082, 2006.
83. LAWRENCE, C. The mechanics of spin coating of polymer films. **Physics of Fluids**, v. 31, p. 2786–2795, 1988.
84. DONG, W.; ZHOU. Y.; YAN, D.; MAI, Y.; HE, L.; JIN, C. Honeycomb-Structured Microporous Films

- Made from Hyperbranched Polymers by the Breath Figure Method. **Langmuir**, v. 25, p.173-178, 2009.
85. CHENG, C.; TIAN, Y.; SHI, Y.; TANG, R; XI, F. Porous Polymer Films and Honeycomb Structures Based on Amphiphilic Dendronized Block Copolymers. **Langmuir**, v.21, p. 6576 –6581, 2005.
86. WANG, C. Y.; MAO, Y. D.; WANG, D. Y.; QU, Q. S.; YANG, G. J.; HU, X. Y. Fabrication of highly ordered microporous thin films by PS-b-PAA self-assembly and investigation of their tunable surface properties **J. Mater. Chem.**, v.18, p. 683-690, 2008.
87. LI, X.; WANG, Y.; ZHANG, L.; TAN, S.; YU, X.; ZHAO, N.; CHEN, G.; XU, J. Fabrication of honeycomb-patterned polyalkylcyanoacrylate films from monomer solution by breath figures method. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 350, p. 253, 2010.
88. BURGO, T.A.L.; DUCATI, T.R.D.; FRANCISCO, K.R.; CLINCKPOOR, K.J.; GALEMBECK, F.; GALEMBECK, S.E. Triboelectricity: Macroscopic Charge Patterns Formed by Self-Arraying Ions on Polymer Surfaces **Langmuir**, v. 28, p. 7407–7416, 2012.
89. FUKUHIRA, Y.; KITAZONO, E.; HAYASHI, T.; KANEKO, H.; TANAKA, M.; SHIMOMURA, M.; SUMI, Y. Biodegradable honeycomb-patterned film composed of poly(lactic acid) and dioleoylphosphatidylethanolamine. **Biomaterials**, v. 27, p. 1797, 2006.
90. <http://www.surface-tension.de/solid-surface-energy.htm> **Acessado em 20/12/2012.**
91. http://www.accudynetest.com/polytable_03.html?sortby=contact_angle **Acessado em 20/12/2012**
92. DOI, M.; EDWARDS, S.F. *The Theory of Polymer Dynamics*. Oxford: Oxford University Press, 1986.
93. KIM, J.; Lew, B.; Kim, W.S. Facile fabrication of super-hydrophobic nanoneedle arrays via breath figures method **Nanoscale Research Letters**, v.6, p.616, 2011.
94. KARTHAUS, O.; MARUYAMA, N.; CIEREN, X.; SHIMOMURA, M.; HASEGAWA, H.; HASHIMOTO, T. Water-assisted formation of micrometer-size honeycomb patterns of polymers. **Langmuir**, v.16, p.6071, 2000.
95. SERVOLI, E.; RUFFO, G. A.; MIGLIARESI, C. Interplay of Kinetics and interfacial interactions in breath figure templating –A phenomenological interpretation. **Polymer**, v. 51, p. 2337, 2010.

96. TIAN, Y.; JIAO, Q.; DING, H.; SHI, Y.; LIU, B. The formation of honeycomb structure in polyphenylene oxide films. **Polymer**, v.47, p. 3866-3873, 2006.
97. XIONG, X.; ZOU, W.; YU, Z.; DUAN, J.; LIU, X.; FAN, S.; ZHOU, H. Microsphere Pattern Prepared by a "Reverse" Breath Figure Method. *Macromolecules*, v. 42, p. 9351-9356, 2009.
98. LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 80th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1999.
99. HANSEN, C. M. **Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook**; CRC Press: Boca Raton, FL, 1999.
100. PENG, J.; HAN, Y.; YANG, Y.; LI, B. The influencing factors on the macroporous formation in polymer films by water droplet templating. **Polymer.**, v. 45, p. 447–452, 2004.
101. ZHANG, J.; XU, Z.K. Pore Shape of Honeycomb-Patterned Films: Modulation and Interfacial Behavior. **J. Phys. Chem. B**, v.116, p. 40–47, 2012.
102. LUTOLF, M.P.; HUBBELL, J.A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, p. 47–55, 2005.
103. HUTMACHER, D.W.; SCHANTZ, J.T.; LAM, C.X.; TAN, K.C.; LIM, T.C. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v.1, p. 245–260, 2007.
104. SENARATNE, W.; ANDRUZZI, L.; OBER, C. K. Self-Assembled Monolayers and Polymer Brushes in Nanotechnology: Present Applications and Future Perspectives. **Biomacromolecules**, v.6, p. 2427, 2005.
105. KIESWETTER, K.; SCHWARTZ, Z.; DEAN, D.D.; BOYAN, B.D. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. **Crit Rev Oral Biol Med**; v.7, p.45, 1996.
106. MIN, E.H.; WONG, K. H.; STENZEL, M. H. Microwells with Patterned Proteins by a Self-assembly Process using Honeycomb-Structured Porous Films. **Adv. Mater.**, v.20, p.3550, 2008.
107. FREED, L. E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Culture of organized cell communities, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 33, pg. 15–30, 1998.

108. SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYLD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **JNCI J Natl Cancer Inst**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.
109. WACHEM, P. Bv.; BEUGELING, T.; FEIJEN, J.; BANTJES, A.; DETMERS, J. P.; AKEN, W. G. V. Interaction of Cultured Human Endothelial Cells with Polymeric Surfaces of Different Wettability. **Biomaterials**, v.6, p.403, 1985.
110. WACHEM, P. Bv.; HOGT, A. H.; BEUGELING, T.; FEIJEN, J.; BANTJES, A.; DETMERS, J. P.; AKEN, W. Gv. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. **Biomaterials**, v.8, p. 323-328, 1987.
111. TAMADA, Y.; IKADA, Y. Effect of preadsorbed proteins on cell adhesion to polymer surfaces. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 155, p. 334-339, 1993.
112. TAMADA, Y.; IKADA, Y. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, p. 783-789, 1994.
113. COOMBES, A. G. A.; RIZZI, S. C.; WILLIAMSON, M.; BARRALET, J. E.; DOWNES, S.; WALLACE, W. A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. **Biomaterials**, v. 25, p. 315–325, 2004.
114. CASTILLO, A.B.; JACOBS,C.R. Mesenchymal stem cell mechanobiology. **Curr Osteoporos Rep.**, v.8, p. 98-104, 2010.
115. REILLY, G.C.; Engler A.J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **J Biomech**, v.43, p. 55-62, 2010.
116. LEE, D.A.; KNIGHT, M.M.; CAMPBELL, J.J.; BADER, D.L. Stem cell mechanobiology. **J Cell Biochem**, v.112, p. 1-9, 2011.

Anexo I

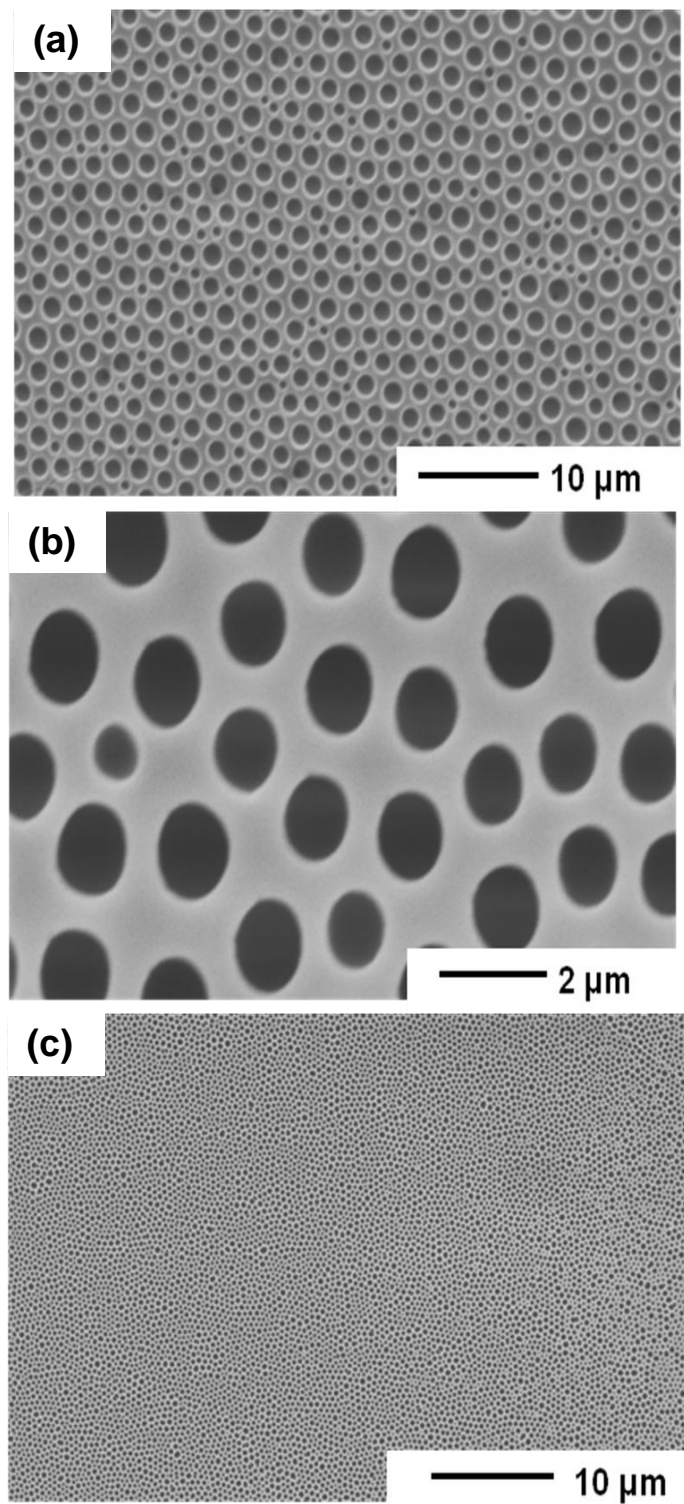


Figura I- Micrografias de MEV em diferentes ampliações de PET após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF rotacionadas a **(a)** e **(b)** 1000 e **(c)** 3000 rpm.

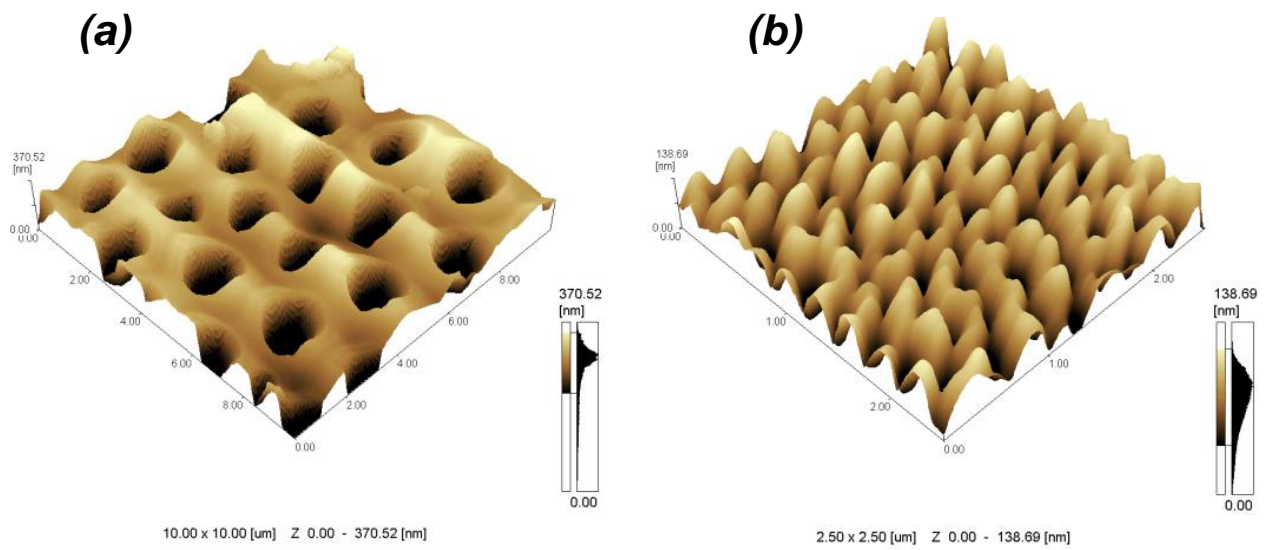


Figura II- Micrografias de MFA em diferentes ampliações de PET após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF rotacionadas a (a) 1000 e (b) 9000 rpm.

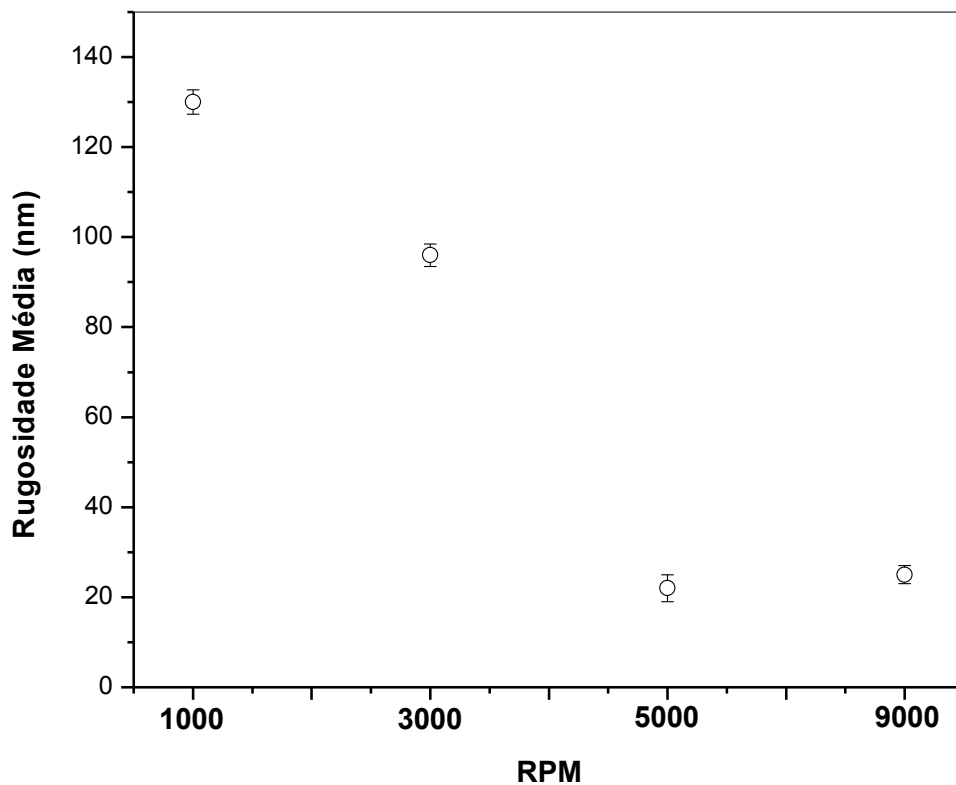


Figura III - Rugosidade ou profundidade média dos micro e nanoporos obtidos após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF com diferentes rotações .

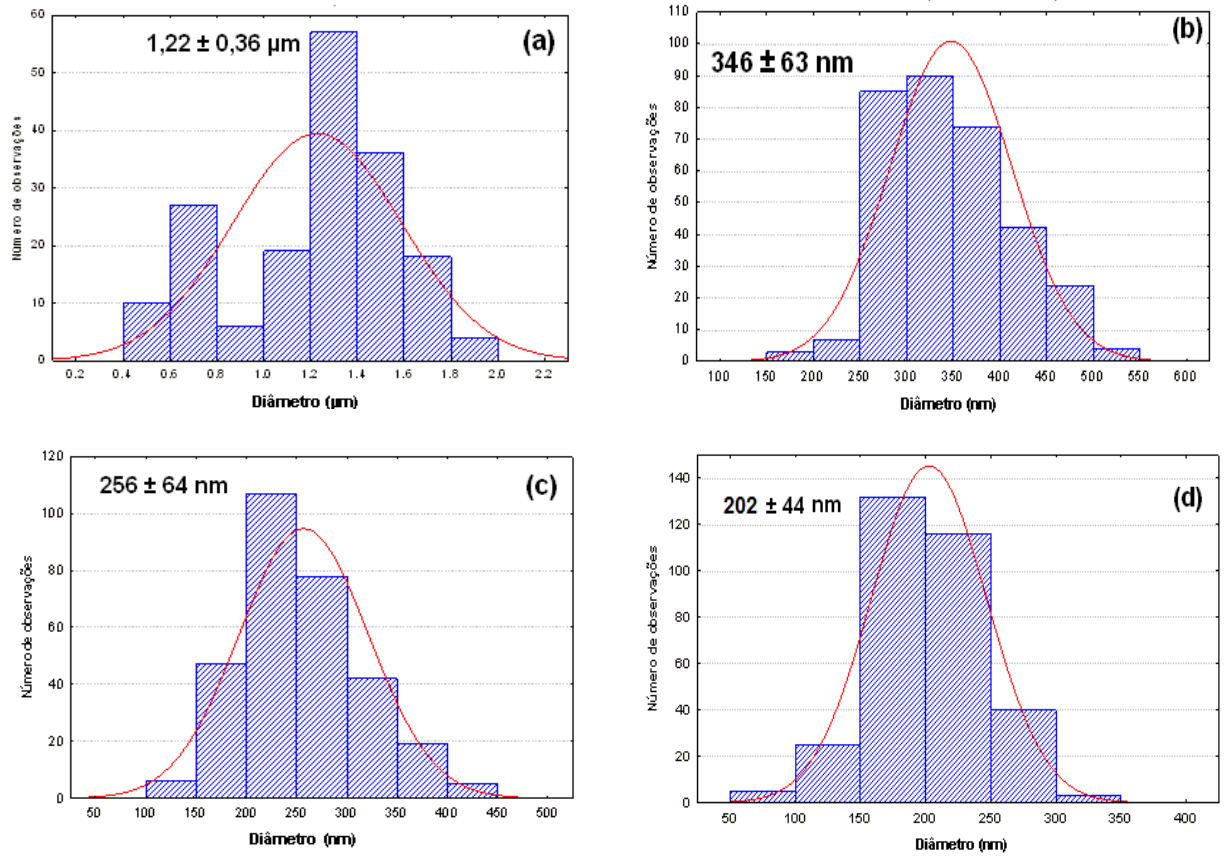


Figura IV- Histogramas de distribuição de diâmetro dos nanoporos de PS suportados no PET após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF distribuídas com rotações de: (a) 1000, (b) 3000, (c) 5000 e (d) 9000 rpm.

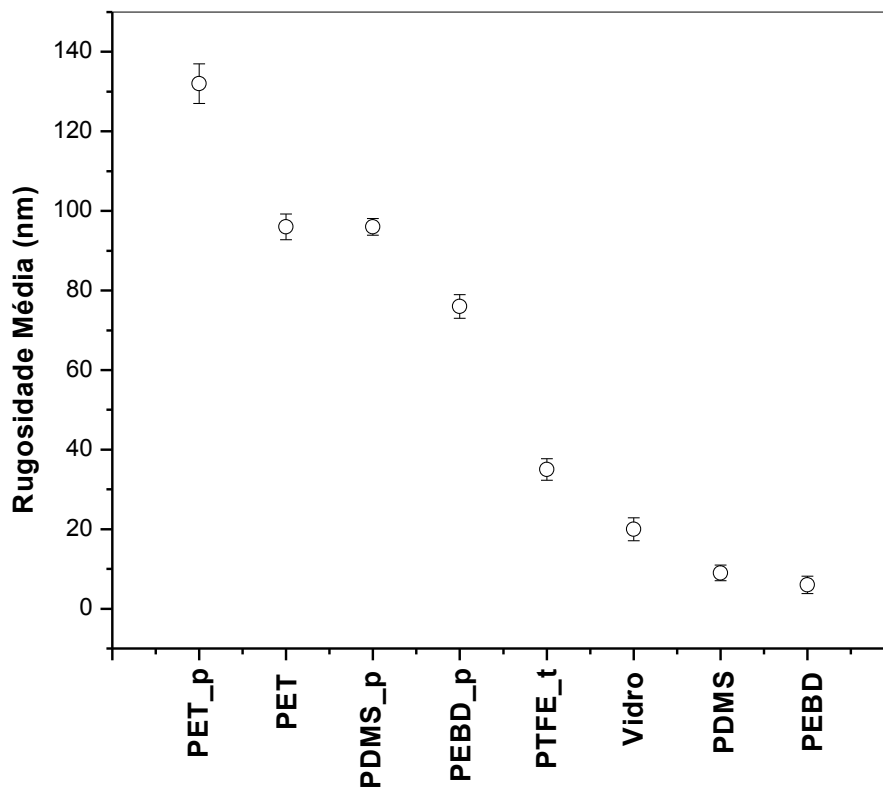


Figura V - Rugosidade ou profundidade média dos nanoporos obtidos após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em THF em diferentes substratos .

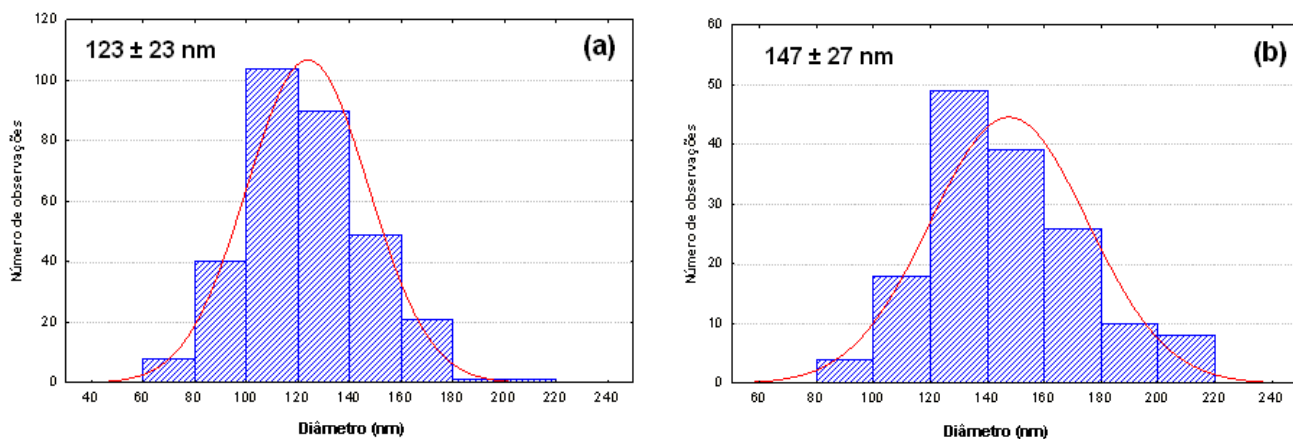


Figura VI - Histogramas de distribuição de diâmetro dos nanoporos de PS suportados nos polímeros virgens (a) PEBD, (b) PDMS após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.

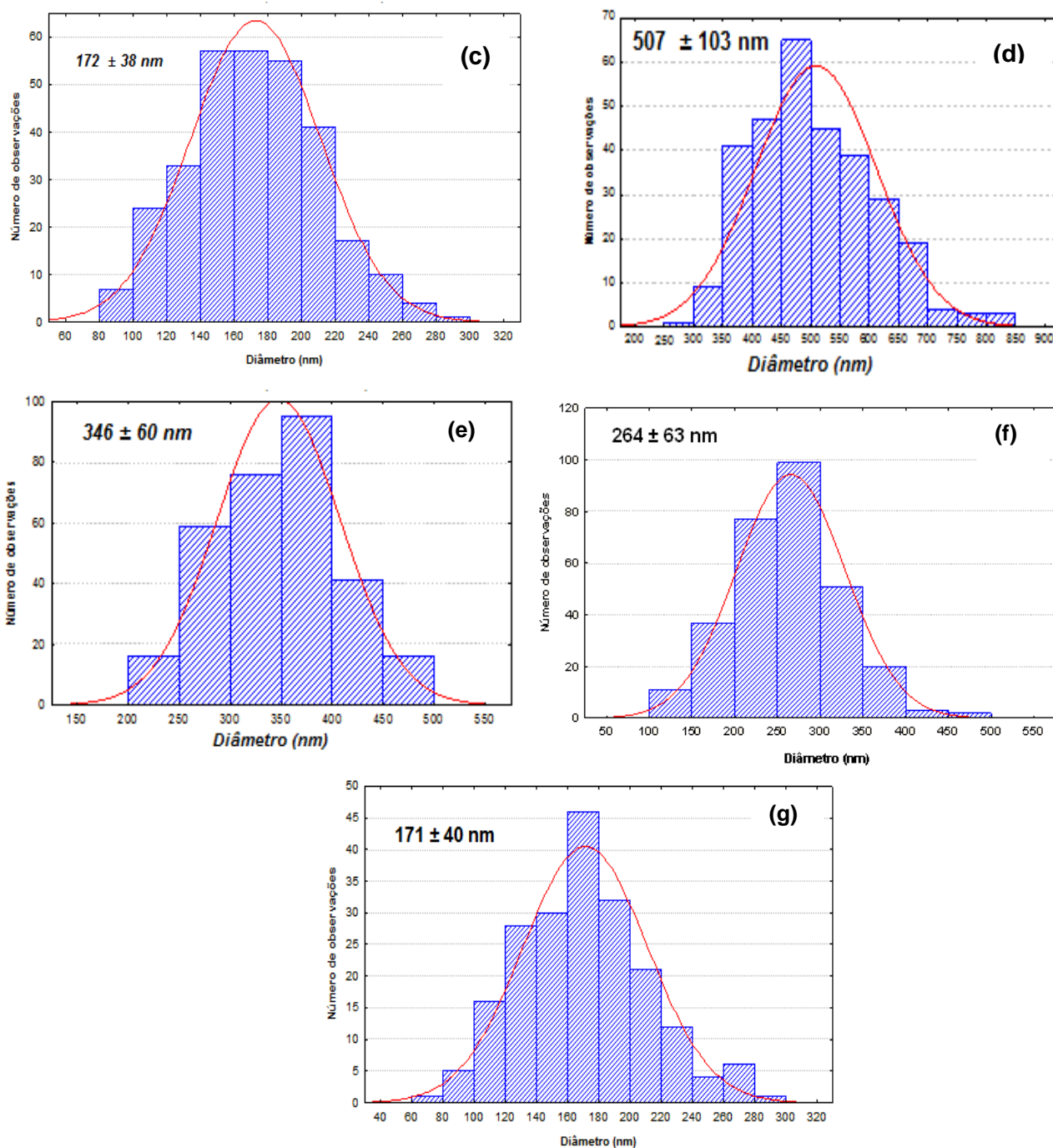


Figura VI (continuação) - Histogramas de distribuição de diâmetro dos nanoporos de PS suportados nos polímeros tratados com plasma de oxigênio **(c)** PEBD **(d)** PET **(e)** PDMS e do triboeletrizado **(f)** PTFE e **(g)** vidro após deposição de uma solução com 10% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.

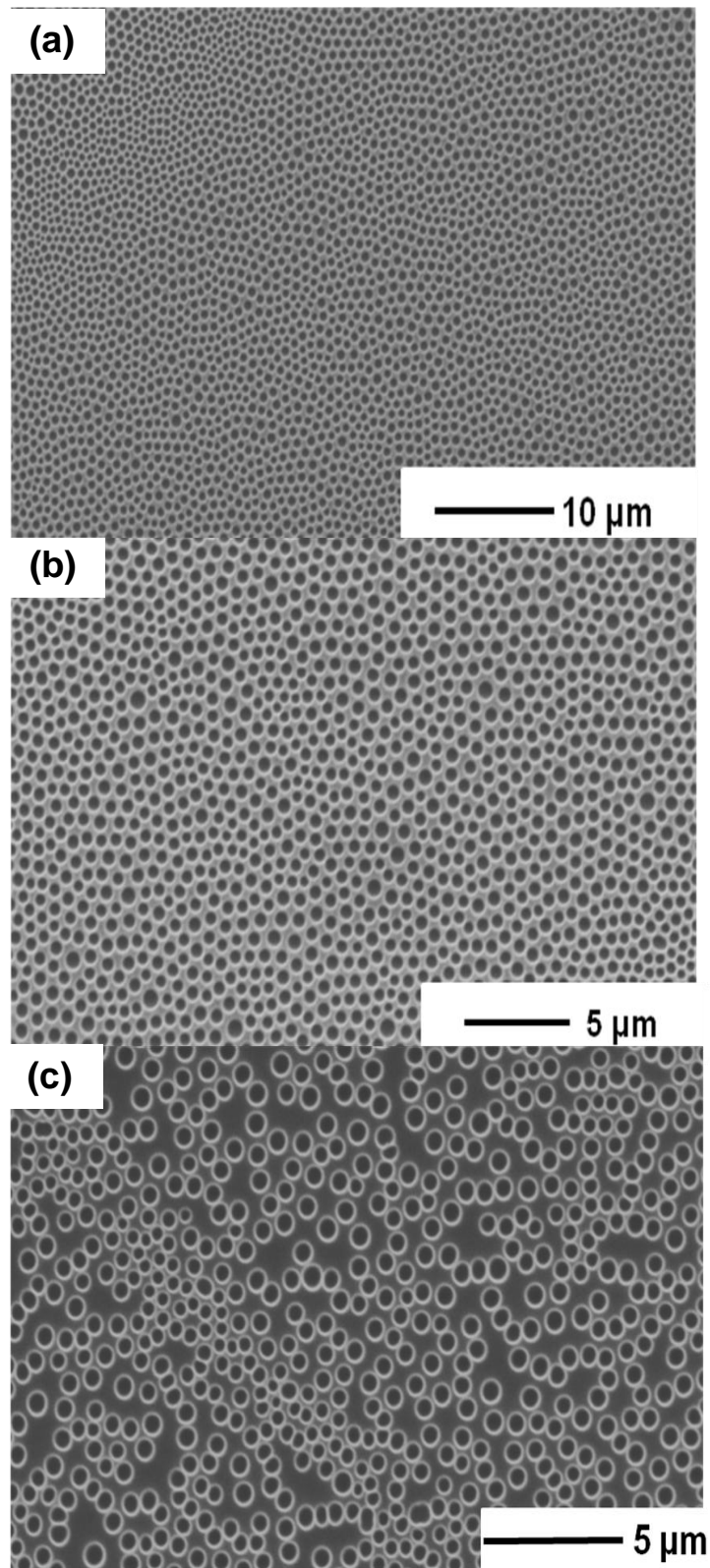


Figura VII - Micrografias de MEV em diferentes ampliações após a deposição de soluções com **(a)** 10%, **(b)** 20% e **(c)** 25% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.

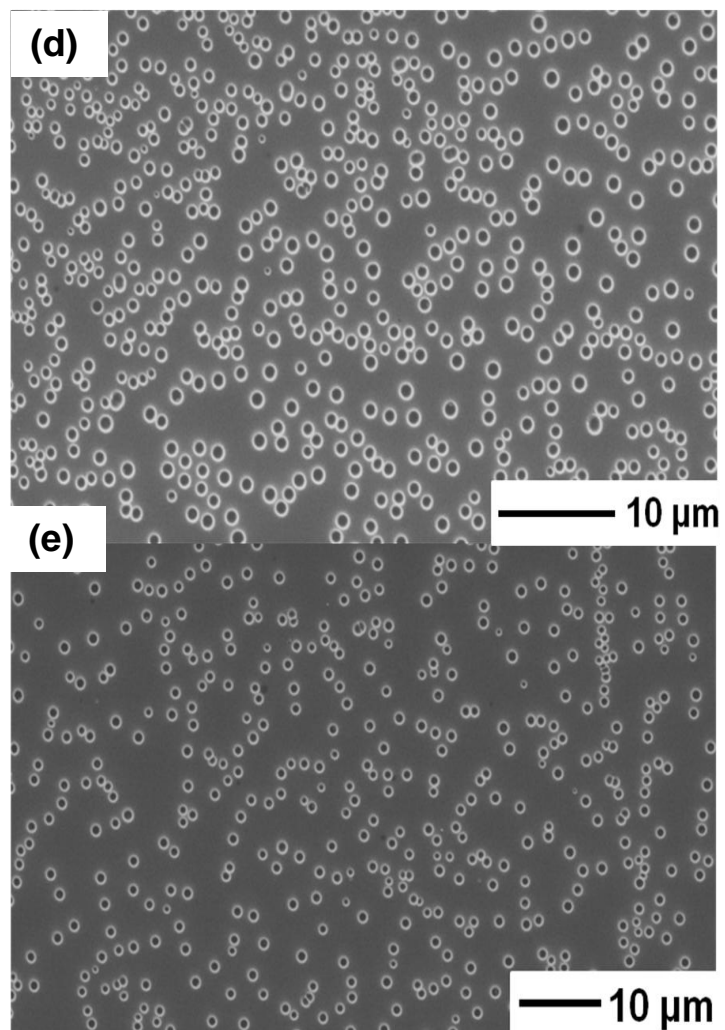


Figura VII (continuação) - Micrografias de MEV em diferentes ampliações após a deposição de soluções com (d) 30% e (e) 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.

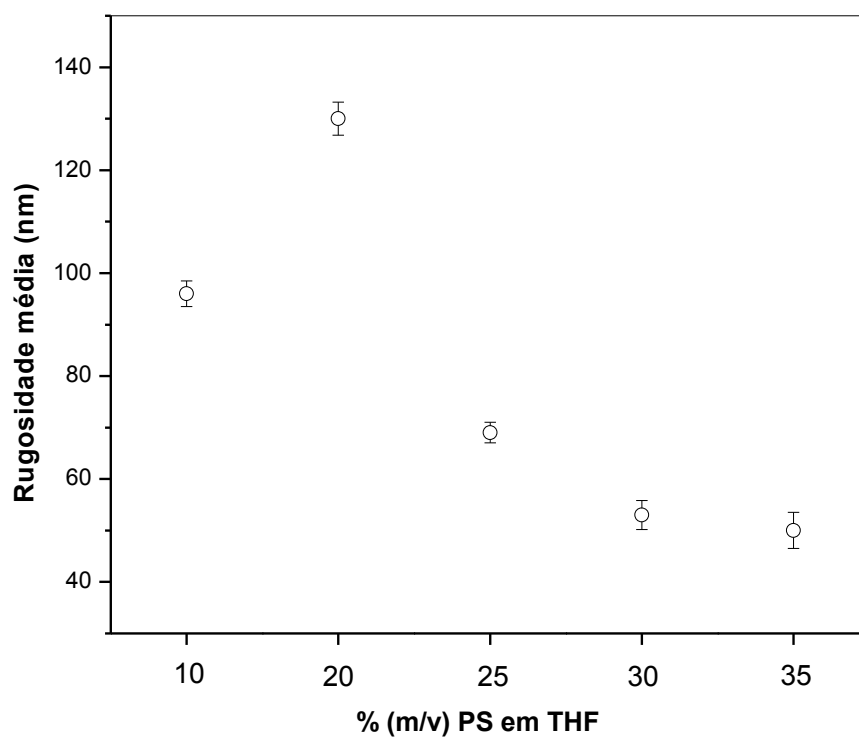


Figura VIII - Rugosidade ou profundidade média dos nanoporos obtidos após deposição de PS em THF em diferentes concentrações.

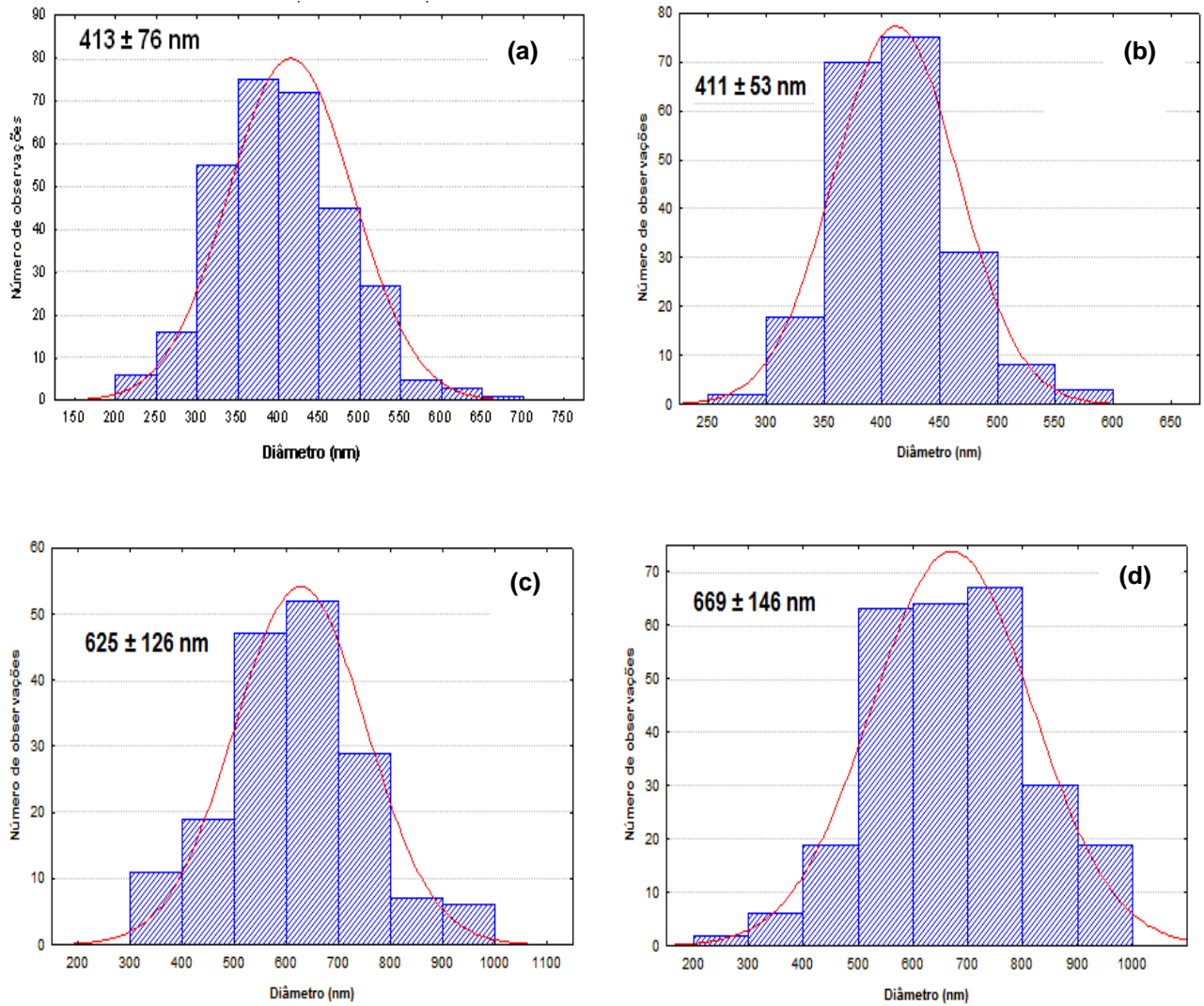


Figura IX - Histogramas de distribuição de diâmetro dos nanoporos de PS formados no PET com diferentes concentrações: **(a)** 20%, **(b)** 25%, **(c)** 30 % e **(d)** 35% (m/v) de PS em THF a 3000 rpm.

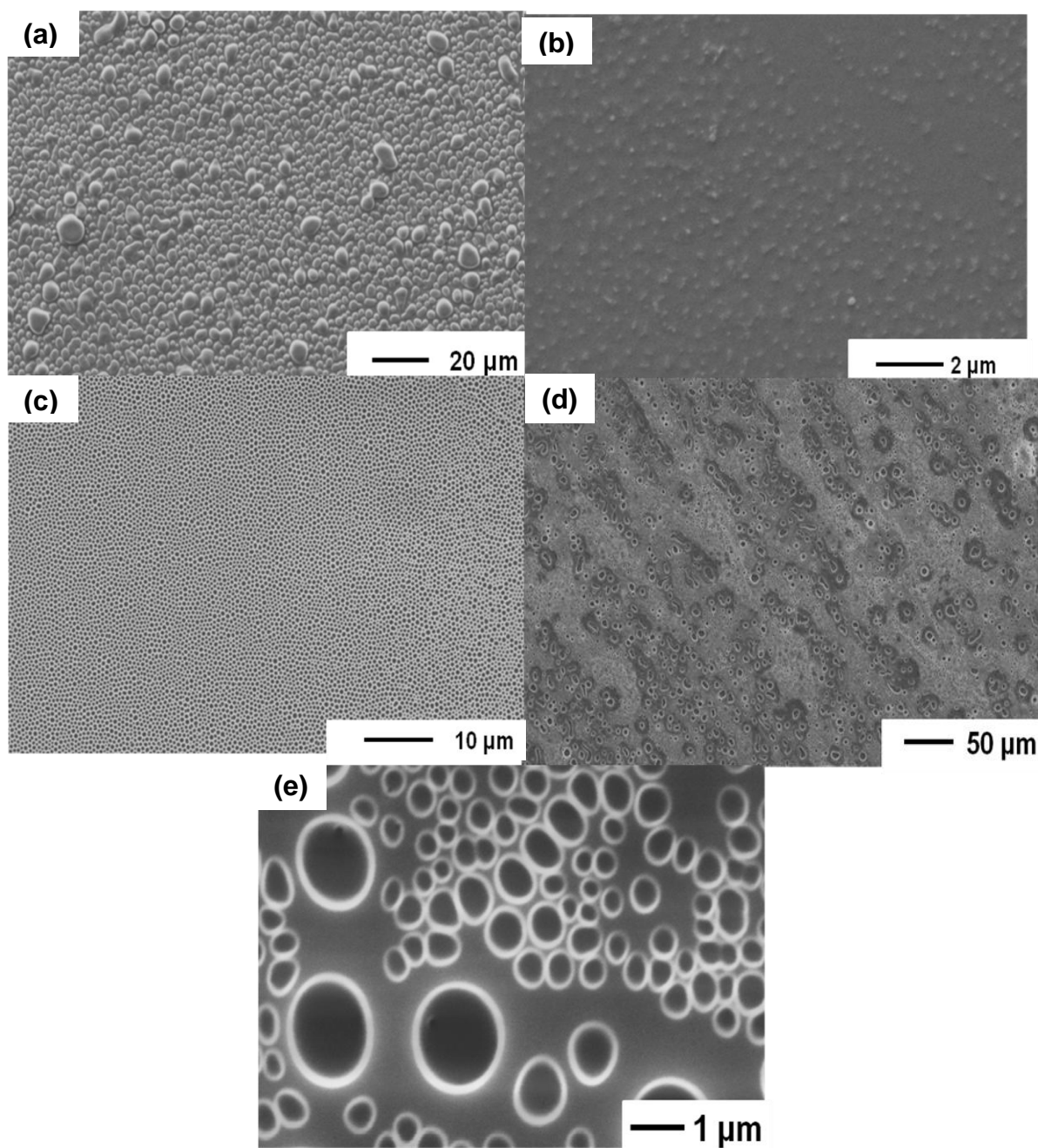


Figura X – Micrografias de MEV em diferentes ampliações do PET após deposição de uma solução 10% (m/v) de PS em (a) $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, (b) CHCl_3 , (c) THF, (d) e (e) $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ a 3000 rpm.

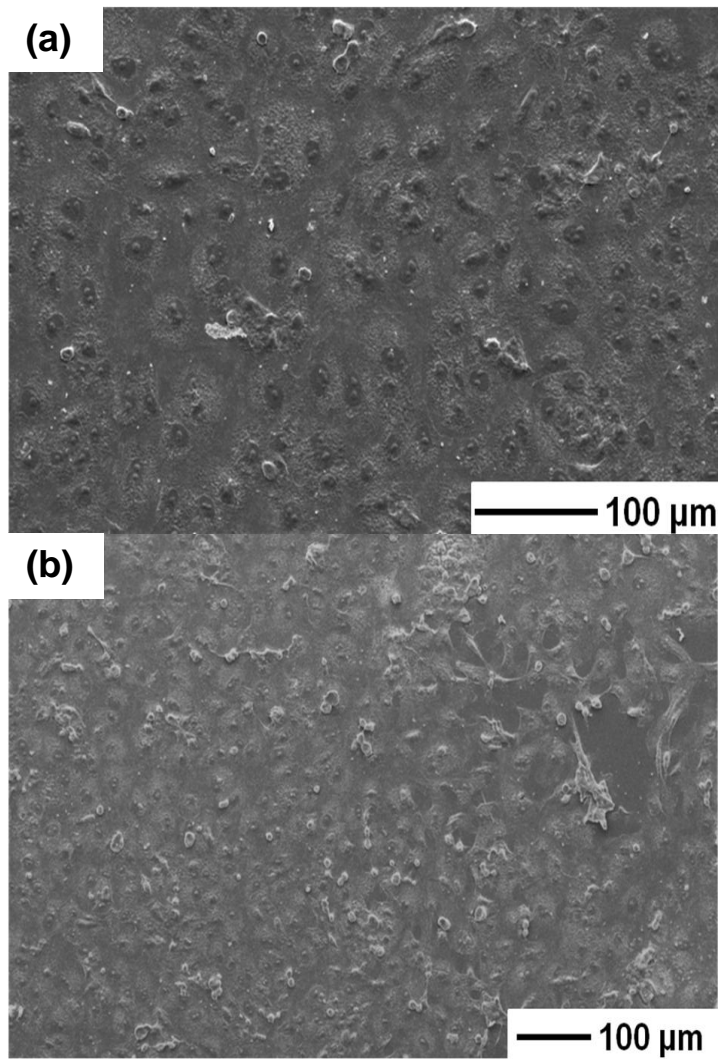


Figura XI- Micrografias de MEV com outras ampliações das células Vero com 24 horas de crescimento nos controles negativos **(a)** vidro, **(b)** PET

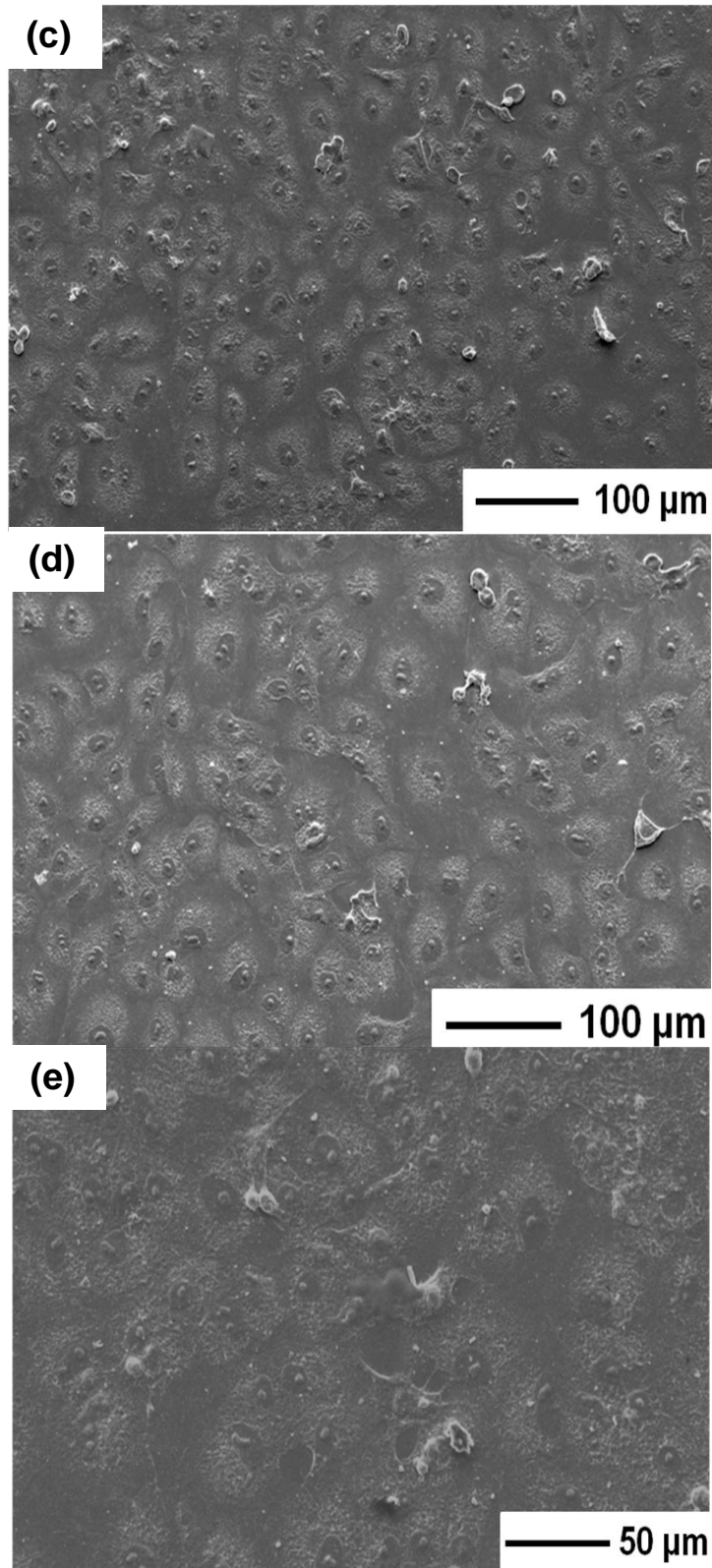


Figura XI (continuação)- Micrografias de MEV com outras ampliações das células Vero com 24 horas de crescimento nos filmes micro e nanoporos de PS obtidos após a deposição de uma solução de 10% (m/v) de PS/ THF com as seguintes rotações **(c)** 1000, **(d)** 3000 e **(e)** 5000 rpm sobre PET.