



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA, INOVAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
COORDENADORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO *SCRICTO SENSU*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS**

**MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO POR IMERSÃO
EM PLASMA PARA INIBIÇÃO DA ADESÃO DA *STAPHYLOCOCCUS*
*EPIDERMIDIS***

Suzimara Rovani

Caxias do Sul

2011

SUZIMARA ROVANI

**Modificação da Superfície de Poliestireno por Imersão em Plasma
para Inibição da adesão da *Staphylococcus epidermidis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Materiais da Universidade de
Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de
mestre em Engenharia e Ciência de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Márcio R. F. Soares

Caxias do Sul, julho de 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

R873m Rovani, Suzimara
Modificação da superfície de poliestireno por imersão em plasma para inibição da adesão da *Staphylococcus epidermis* / Suzimara Rovani. 2011.
78 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Materiais, 2011.
“Orientação: Prof. Dr. Márcio R. F. Soares”

1. Teste dos materiais. 2. Biomateriais. 3. Poliestireno. 4. *Staphylococcus epidermis* - Patogenicidade. I. Título

CDU : 620.1

Índice para catálogo sistemático:

- | | |
|---|----------------|
| 1. Teste dos materiais | 620.1 |
| 2. Biomateriais | 616-7 |
| 3. Poliestireno | 678.7 |
| 4. <i>Staphylococcus epidermis</i> - Patogenicidade | 579.61:616-092 |

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Kátia Stefani – CRB 10/1683

“Modificação da superfície de poliestireno por imersão em plasma para inibição da adesão da *staphylococcus epidermidis*”.

Suzimara Rovani

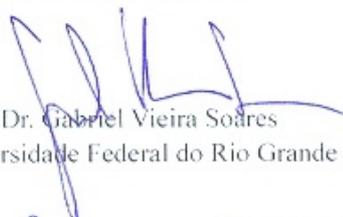
Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais. Área de Concentração: Processamento e Simulação de Materiais.

Caxias do Sul, 05 de julho de 2011.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Márcio Ronaldo Farias Soares (orientador)
Universidade de Caxias do Sul



Prof. Dr. Gabriel Vieira Soares
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo
Universidade de Caxias do Sul



Prof. Dr. Carlos Alejandro Figueroa
Universidade de Caxias do Sul



Profa. Dra. Maria Cristina Moré Farias
Universidade de Caxias do Sul

Aos meus pais, Evaristo e Melita

Ao meu namorado Jonnatan

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter mostrado o caminho certo e ter aberto esta oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço imensamente aos meus pais Evaristo e Melita e a minha irmã Sônia por terem me apoiado na jornada em busca do conhecimento. Por terem acreditado em mim, e por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço ao Jonnatan pelo amor, compreensão, apoio, carinho e por ter dividido comigo momentos importantes e que apesar da distância sempre está presente.

Agradeço ao prof. Dr. Márcio R. F. Soares pela paciência, apoio, orientação e por ter me dado a oportunidade de compartilhar de seu conhecimento científico ao realizar este trabalho.

Agradeço ao prof. Dr. Israel J. R. Baumvol pela bolsa de mestrado.

Agradeço a todos os colegas do LESTT pela amizade e carinho.

Enfim, agradecimentos são inúmeros, pois várias pessoas fizeram parte desta conquista. Agradeço a todos pelo carinho e por terem acreditado no meu potencial.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO II	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS	19
2.2 TRATAMENTO A PLASMA EM BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS	20
2.3 POLIESTIRENO	22
2.3.1 Características e Relevância Tecnológica	22
2.3.2 Modificação da Superfície de Poliestireno por Plasma	24
2.4 CRESCIMENTO DE BIOFILMES	26
2.4.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	29
CAPÍTULO III	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 MATERIAIS	32
3.2 IMERSÃO EM PLASMA DE DESCARGA LUMINESCENTE	32
3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	35
3.3.1 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS)	35
3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Reflexão Total Atenuada (ATR-IR)	38

3.3.3	Microscopia de Força Atômica (AFM)	39
3.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	42
3.3.5	Ângulo de Contato com Água (WCA)	44
3.4	ENSAIOS DE ANTIBIOFILME BACTERIANO	45
3.4.1	Análise Estatística	47
CAPÍTULO IV		48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO		48
4.1	COMPOSIÇÃO SUPERFICIAL	48
4.1.1	Análise de XPS	48
4.1.2	Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada (ATR-IR)	57
4.2	TEXTURA SUPERFICIAL	60
4.2.1	Microscopia de Força Atômica (AFM)	60
4.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	62
4.3	AVALIAÇÃO DA HIDROFILICIDADE DA SUPERFÍCIE-ÂNGULO DE CONTATO (WCA)	64
4.4	AVALIAÇÃO DE ADESÃO BACTERIANA	67
CAPÍTULO V		72
5. CONCLUSÕES		72
CAPÍTULO VI		74
6. REFERÊNCIAS		74

LÍSTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

θ - Ângulo de contato

ρ - Densidade

μL - Microlitro

γ_{LV} - Tensão superficial na interface líquido/vapor

γ_{SL} - Tensão superficial na interface sólido/líquido

γ_{SV} - Tensão superficial na interface sólido/vapor

AFM - Microscopia de força atômica

ATR - Reflectância total atenuada

ATR-IR - Espectroscopia no infravermelho por reflexão total atenuada

BE - Energia de ligação

CAE - Analisador de energia constante

DMSO - Dimetilsulfóxido

ESCA - Espectroscopia de elétrons para análise química

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

$h\nu$ - Energia de radiação incidente

IF-UFRGS - Instituto de física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

IR - Espectroscopia no infravermelho

KE - Energia cinética

LB - Luria Bertani

LESTT - Laboratório de engenharia de superfícies e de tratamentos térmicos

mL - Mililitro

nm - Nanômetro

OD - Densidade óptica

PEG - Poli(etilenoglicol)

PIII - Implantação iônica por imersão em plasma

PMMA - Poli(metil metacrilato)

PS - Poliestireno

PTFE - Politetrafluoroetileno

PU - Poliuretano

Ra - Rugosidade média

RF - Radiofrequência

rpm - Rotações por minuto

SEM - Microscopia eletrônica de varredura

SFM - Scanning force microscopy

UCS - Universidade de Caxias do Sul

UFC - Unidades formadoras de colônias

UHV - Ambiente de ultra alto vácuo

WCA - Ângulo de contato com água

XPS - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

Φ_A - Função trabalho

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de uma fonte de plasma de descarga corona, adaptado da referência [2]. 22
- Figura 2.** Estrutura Básica de Poliestireno (monômero) [22]. _____ 23
- Figura 3.** Imagem ilustrativa das características da superfície do envoltório celular das bactérias, adaptado da referência [17]. _____ 28
- Figura 4.** Modelo da formação de biofilme *S. epidermidis* e fatores envolvidos, adaptado da referência [14]. _____ 30
- Figura 5.** (a) Esquema da câmara utilizada para o processo de imersão em plasma e (b) em detalhe eletrodo e amostra em processo de imersão a plasma. _____ 33
- Figura 6.** Esquema da preparação das amostras. _____ 34
- Figura 7.** Ilustração do efeito fotoelétrico adaptado da referência [36]. _____ 35
- Figura 8.** (a) Esquema do aparato utilizado na geração e coleção dos fotoelétrons. (b) Imagem da câmara de análise XPS [36]. _____ 36
- Figura 9.** Diagrama de funcionamento do microscópio de força atômica [40]. _____ 40
- Figura 10.** Mapa de forças entre a amostra e a ponteira em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica [40]. 41
- Figura 11.** Representação esquemática dos componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura [42]. _____ 43
- Figura 12.** Esquema ilustrativo das forças que atuam na interface tríplice (sólido/líquido/vapor) para uma gota de líquido sobre uma superfície sólida [41]. ____ 45
- Figura 13.** Espectros de fotoelétrons excitados por raios X da superfície de poliestireno. __ 49
- Figura 14.** Espectros da região de fotoelétrons C 1s da superfície de poliestireno. Sem tratamento ou 0 min (triângulos abertos); tratadas em 5 min (quadrados sólidos); 15 min

(círculos abertos), 30 min (triângulos sólidos), 60 min (quadrados abertos) e 120 min (círculos sólidos).	50
Figura 15 (A). Espectros da região de fotoelétrons N 1s da superfície de poliestireno. Sem tratamento ou 0 min (triângulos abertos), tratadas em 5 min (quadrados sólidos), 15 min (círculos abertos), 30 min (triângulos sólidos), 60 min (quadrados abertos) e 120 min (círculos sólidos).	51
Figura 15 (B). Espectros da região de fotoelétrons N 1s da superfície de poliestireno tratada em plasma por (a) 120 min, (b) 60 min, (c) 30 min, (d) 15 min e (e) 5 min.	52
Figura 16. Porcentagem atômica de nitrogênio em função do tempo de tratamento a plasma de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min.	53
Figura 17. (a) Espectros da região de fotoelétrons O 1s da superfície de PS. Sem tratamento ou 0 min (triângulos abertos), tratadas em 5 min (quadrados sólidos), 15 min (círculos abertos), 30 min (triângulos sólidos), 60 min (quadrados abertos) e 120 min (círculos sólidos); (b) Porcentagem atômica de oxigênio em função do tempo de tratamento de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min.	54
Figura 18. Porcentagem atômica de C1s e O1s em função do tempo de tratamento.	56
Figura 19. Razão oxigênio/carbono em função do tempo de tratamento de imersão em plasma de 0 a 120 min.	57
Figura 20. Espectros de ATR-IR de poliestireno sem tratamento (ST), e tratado em plasma na mistura de N ₂ /H ₂ por 120 min.	58
Figura 21. Espectros de ATR-IR de poliestireno sem tratamento, e de poliestireno tratado a plasma com uma mistura de N ₂ /H ₂ por 5, 15, 30, 60 e 120 min: (a) espectros ampliados para a região de 3600-3100 cm ⁻¹ , (b) para a região de 980-820 cm ⁻¹ e (c) espectros ampliados para a região de 1780-1700 cm ⁻¹ da amostra sem tratamento (ST) e da amostra tratada por 120 min.	59

- Figura 22.** Topografia das amostras de PS por AFM (a) antes do tratamento a plasma e após o tratamento com N₂/H₂ por (b) 5 min (c) 15 min (d) 30 min (e) 60 min e (f) 120 min. _ 61
- Figura 23.** Rugosidade média das amostras de PS tratadas com N₂/H₂ em função do tempo de tratamento. _____ 62
- Figura 24.** Imagem de SEM, (magnificação 4000x, escala 5µm), de amostras de PS tratadas com um mistura de N₂/H₂ por imersão em plasma em (a) e (b) 0 min, (c) 15 min, (d) 30 min, (e) 60 min e (f) 120 min. _____ 63
- Figura 25.** Medida de ângulo de contato com água em (°), em função do tempo de tratamento em (min). _____ 65
- Figura 26.** Amostras de poliestireno (a) sem tratamento e tratadas a plasma com N₂/H₂ em (b) 5 min, (c) 15 min, (d) 30 min, (e) 60 min e (f) 120 min. _____ 66
- Figura 27.** Adesão de biofilme, produzido pela *S. epidermidis*, na superfície da amostra Barras pretas representam amostras controle e barras cinza representam amostras tratadas com N₂/H₂ em função do tempo de tratamento em plasma. (*) representa diferença significativa em relação às amostras controle em cada tempo (t-test, p < 0,005). _____ 68
- Figura 28.** Amostras submetidas somente ao fluxo de N₂/H₂ (controle) de 5 a 120 min e amostras submetidas ao fluxo de N₂/H₂ e tratadas em plasma de 5 a 120 min. _____ 69
- Figura 29.** Inibição da adesão de biofilme em PS tratado em plasma com N₂/H₂ por 120 min em função do tempo após o tratamento (0, 8,15 e 50 dias). _____ 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas propriedades básicas de Poliestireno [21] _____ 23

Tabela 2: Frequências típicas de NH e NH₂ de grupos amida e amina [22] _____ 59

RESUMO

Materiais poliméricos, como o poliestireno, são largamente usados como biomateriais, tanto na área biomédica como na indústria farmacêutica. Com a especialização do uso destes biomateriais, relata-se um aumento significativo de doenças relacionadas à presença de biofilmes bacterianos na superfície destes materiais. Neste trabalho, placas de microtitulação de poliestireno foram tratadas por imersão em plasma-RF, na mistura padrão N₂/H₂, a fim de avaliar as modificações superficiais geradas, e a eficiência deste processo na adesão e crescimento de biofilme, produzido pela *Staphylococcus epidermidis*. A identificação de espécies atômicas e grupos funcionais incorporados à superfície do polímero pelo processo de imersão em plasma, foi realizada pelas técnicas de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada (ATR-IR). Modificações na morfologia e rugosidade da superfície de PS foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia de força atômica (AFM). A hidrofílicidade da superfície foi analisada por medida de ângulo de contato com água (WCA). Para avaliar a eficiência do tratamento em plasma no crescimento/aderência de biofilme formado pela *S. epidermidis* foram realizados ensaios de antibiofilme bacteriano.

Modificações físico-químicas foram observadas na superfície das amostras por XPS, onde foi constatado o aumento da porcentagem atômica relativa de N e a presença de novas ligações químicas com o aumento do tempo de tratamento. Pela técnica de ATR-IR foi possível identificar a presença de grupos amina e amida. As medidas de microscopia revelaram uma mudança na morfologia e uma redução da rugosidade superficial com o aumento do tempo, e também verificado um aumento do caráter hidrofílico na superfície por WCA. Além disso, a partir de 60 min de tratamento foi alcançada uma alta supressão de adesão de biofilme à superfície do polímero.

ABSTRACT

Polymeric materials, such as polystyrene, are widely used as biomaterials, both in the pharmaceutical industry and biomedical areas. With the use of more specialized biomaterials, it is reported a significant increase of diseases related to the presence of bacterial biofilms formation on the surface of these materials. In this work, polystyrene microtiter plates were treated by RF plasma immersion, in a N₂/H₂ standard gas mixture, in order to evaluate the surface modifications and its effects on the adherence and growth of bacterial biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. The identification of atomic species and functional groups incorporated into the polymer surface by plasma immersion process was carried out by the techniques of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and attenuated total reflectance infrared spectroscopy (ATR-IR). The changes in morphology and surface roughness of PS were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). The hydrophilicity of the surface was analyzed by measuring the water contact angle (WCA). Bacterial antibiofilm assays were carried out in order to evaluate the efficiency of plasma treatment on the growth/adherence of the biofilm formed by *S. epidermidis*.

Physical-chemical modifications in the samples surface were found by XPS technique, where an increase in amount of relative atomic percentage of N and the presence of new chemical bonds was observed as a function of the treatment time. Through the ATR-IR spectroscopy was possible to identify the presence of amine and amide groups. The SEM and AFM measurements revealed changes in morphology and a reduction of the surface roughness with increasing time. It is also observed a reduction in the WCA after plasma treatment, indicating that PS surface becomes more hydrophilic. Antibacterial assays, shows that after 60 min of treatment time was achieved a high suppression of biofilm adhesion in the polymer surface.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Durante a última década, uma das grandes tendências mundiais na pesquisa de biomateriais tem sido o uso de processos de engenharia de superfície a fim de modificar de forma controlada a superfície destes materiais, objetivando controlar a resposta biológica do corpo humano e melhorar a sua biocompatibilidade [1].

Para esse propósito, processos de tratamentos a plasma, como implantação iônica por imersão em plasma e imersão em plasma de descarga luminescente [2], tem sido amplamente reconhecidos como técnicas capazes de modificar a camada superficial de dispositivos biomédicos sem alterar sua propriedade de volume. Tais processos são aplicados a dispositivos ou implantes para diagnóstico e terapia, como lentes de contato, veias artificiais, enxertos vasculares, cateteres, membranas de diálise, e material para reparação óssea conjunta e de substituição [3, 4].

Materiais poliméricos como poli(metil metacrilato) (PMMA) [5], poli(etilenoglicol) (PEG) [6], politetrafluoretileno (PTFE) [7] e poliuretano (PU) [8], são comumente usados nestas aplicações, devido a sua biocompatibilidade, boa resistência mecânica, excelente elasticidade, estabilidade química e mecânica. Recentemente, o poliestireno (PS), tem atraído a atenção devido a sua facilidade de processamento, e as propriedades diferenciadas como transparência e baixa absorção de umidade além de ser um polímero de baixo custo [9, 10, 11]. Normalmente o PS é aplicado em biosensores, em placas de cultura de tecidos, entre outros [12].

Evitar o crescimento de biofilmes de bactérias na superfície de biomateriais poliméricos implantados em pacientes é um desafio para os pesquisadores. Este problema

pode ser minimizado por tratamentos a plasma, que oferecem algumas vantagens, tais como a não utilização de solventes, a isenção de resíduos químicos, o baixo impacto ambiental e pode ser aplicado a materiais de diferentes formatos [13].

A maioria das infecções hospitalares é causada pela *Staphylococcus epidermidis*. Em 1998 o sistema nacional de vigilância hospitalar americano (Programa de Infecções Hospitalares, Centro Nacional de Doenças Infecciosas, Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do Serviço de Saúde Pública, EUA. Atlanta, GA, 1998) relatou a *S. epidermidis* como um patógeno bacteriano isolado em hospitais, como o mais importante envolvido em infecções sanguíneas hospitalares, bem como infecções cardiovasculares, em olhos, sistemas auditivos e respiratórios. A *S. epidermidis*, muitas vezes torna-se um agente infectante em pacientes (terapêutica imunossupressora, pacientes com AIDS e nascidos prematuramente), onde a porta de entrada para o corpo humano em todas essas infecções é geralmente por cateter intravascular [14, 15].

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho é investigar o efeito do processo de tratamento por imersão em plasma em placas de microtitulação de PS como função do tempo de tratamento, avaliar as possíveis alterações superficiais e, além disso, a eficiência deste tratamento na inibição de crescimento/adesão de biofilme produzido pela bactéria *Staphylococcus epidermidis*.

Para a caracterização das amostras foram utilizadas as técnicas de: espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada (ATR-IR) para identificar os possíveis grupos funcionais presentes à superfície do polímero devido ao processo de imersão em plasma; microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) para avaliar a rugosidade e a morfologia na superfície do material; ângulo de contato (WCA) para avaliar a hidrofobicidade da superfície. Também foram realizados ensaios de antibiofilme bacteriano, para avaliar a eficiência do

tratamento na inibição de crescimento/aderência do biofilme produzido pela bactéria *S. epidermidis* e análise estatística para comparar os resultados do ensaio de antibiofilme bacteriano.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais Poliméricos

Polímeros são amplamente usados como biomateriais em implantes e dispositivos médicos. Um biomaterial é aquele utilizado em dispositivos biomédicos ou que está em contato com sistemas biológicos. É a parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo [16], além de aplicações ambientais [17]. Materiais à base de polímeros sintéticos tem sido amplamente utilizados em dispositivos médicos como cateteres, materiais para próteses, materiais dentários, implantes, sistemas encapsulantes para liberação de medicamentos, produtos de engenharia de tecido, ou seja, produtos para regeneração de órgãos e tecidos vivos. A principal vantagem dos biomateriais poliméricos comparada à de materiais metálicos ou cerâmicos é que esses são facilmente fabricados e produzidos em diversos formatos (filmes, fibras, materiais tubulares, etc). Além disso, apresentam fácil processabilidade secundária, baixo custo e disponibilidade com desejadas propriedades mecânicas e físicas específicas [17].

Apesar do seu uso extensivo na medicina, os materiais poliméricos possuem uma baixa adesão interfacial quando comparada a outros materiais. A compreensão de efeitos de superfície neste caso é sem dúvida uma das soluções para melhorar tal propriedade através da modificação controlada da superfície, desde que não afete as principais funções do material, passa a ser uma excelente opção. Assim, a biocompatibilidade destes materiais pode ser melhorada através de mudanças em molhabilidade (hidrofilicidade), da incorporação de grupos funcionais na superfície que ajudem a evitar, por exemplo, a trombogenicidade (tendência de um material em contato com o sangue para produzir um trombo ou coágulo). Da

mesma forma, a incorporação de espécies moleculares na superfície pode promover ou prevenir a adesão de moléculas biológicas e células [4].

2.2 Tratamento a Plasma em Biomateriais Poliméricos

Há cinquenta anos os primeiros pesquisadores começaram a expor materiais poliméricos à radiação ionizante e relatar a ocorrência de ligações cruzadas, entre outros efeitos [18]. A modificação da superfície de polímeros hidrofóbicos em hidrofílicos ou vice versa pode ser obtida por tratamento úmido (meio ácido ou básico), seco (plasma) ou tratamento por radiação (ultravioleta ou laser) sem afetar suas propriedades estruturais [19].

Nos estudos de modificação superficial de polímeros tem-se identificado mudanças químicas na superfície destes materiais induzidos por radiação, incluindo reações envolvendo gases reativos ou água, também é mostrado que a irradiação com íons de certos elementos resulta na incorporação de grupos funcionais de determinado elemento em concentrações significativas na estrutura superficial do material [18].

Na área biomédica, o tratamento a plasma tem sido usado na modificação de biomateriais em várias aplicações incluindo dispositivos ou implantes para diagnóstico e terapia, tais como: lentes de contato, veias artificiais, enxertos vasculares, cateteres, membranas de diálise, e material para reparação óssea conjunta e de substituição. O processo a plasma é um importante processo industrial para a modificação da superfície de polímeros. As vantagens do processo a plasma incluem [20]:

- ✓ Modificação controlada da camada superficial;
- ✓ A modificação química superficial dependente do gás utilizado;
- ✓ O uso do processo a plasma pode evitar problemas encontrados em técnicas de química úmida, tais como a presença de solvente residual na superfície;

- ✓ Modificação superficial uniforme sobre toda a superfície exposta ao plasma.

Basicamente, entende-se por plasma um fluido parcialmente ionizado (mistura de elétrons, átomos e moléculas neutras e ionizadas). O plasma é produzido quando um gás é excitado em seus estados energéticos, seja por radiofrequência (RF), microondas, por uma descarga de elétrons de um filamento aquecido, entre outros. Neste processo ocorre a separação de elétrons ligados aos átomos ou moléculas do gás formando uma mistura eletricamente carregada.

A capacidade de geração de íons está relacionada ao que chamamos de energia de ionização. Esta energia varia de acordo com cada elemento químico, seu valor se refere à energia necessária para arrancar elétrons das camadas eletrônicas mais externas dos átomos, ou seja, é a energia suficiente dada aos elétrons para escaparem do campo de força gerado pelos átomos. Assim, um fluido parcialmente ionizado pode ser afetado por campos elétricos ou magnéticos externos a ele podendo produzir correntes elétricas. Deste modo, os portadores de carga (elétrons e íons) podem ser acelerados adquirindo energia suficiente para causar novas ionizações (colisões), produzindo um importante efeito de grupo. Este efeito constitui a principal característica do plasma ajudando a manutenção da descarga [2].

Dentre os diferentes processos de tratamento a plasma usados em biomateriais destacam-se o tratamento com descarga corona, a implantação iônica por imersão em plasma (PIII) e a imersão em plasma de descarga luminescente. A descarga corona pode ser considerada como uma descarga Townsend¹ ou uma descarga luminescente negativa dependendo do campo de distribuição de potencial, a Figura 1 ilustra o esquema de um sistema de descarga corona.

¹ Descarga Townsend é um processo de ionização do gás que, quando uma quantidade inicialmente muito pequena de elétrons livres é acelerada por um campo elétrico suficientemente forte, da origem à condução elétrica através de um gás por multiplicação: quando o número de descargas livres cai ou o campo elétrico diminui, o fenômeno cessa.

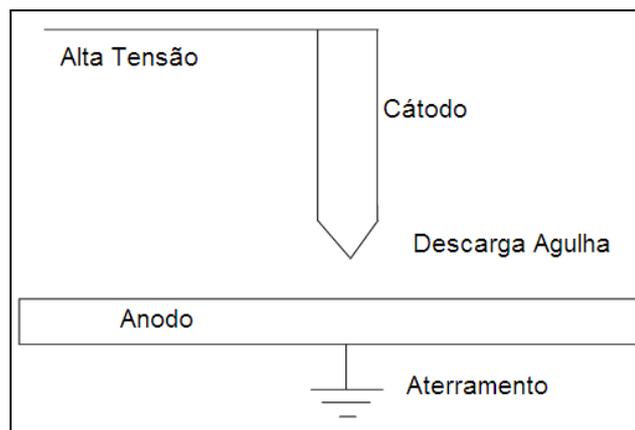


Figura 1. Esquema de uma fonte de plasma de descarga corona, adaptado da referência [2].

O processo de implantação iônica por imersão em plasma (PIII) não exige sistemas complexos de varredura, como ocorre em sistemas convencionais com feixe de íons, garantindo uma implantação uniforme com o tempo de tratamento independente do tamanho das amostras. Além disso, o processo é relativamente simples, sendo possível no mesmo processo a implantação de diversas amostras de diferentes materiais [2].

A imersão em plasma de descarga luminescente é o processo pelo qual um átomo ou uma molécula ganha energia suficiente, a partir de uma fonte de excitação externa ou através da interação (colisão) com outra molécula, para gerar uma descarga luminescente [2].

2.3 Poliestireno

2.3.1 Características e Relevância Tecnológica

O poliestireno é um termoplástico rígido, duro, incolor e transparente, semelhante ao vidro. A sua transparência é devido à baixa cristalinidade e ela permite a transmissão de 90 % da luz visível. Este material tem um som tipicamente metálico quando deixado cair sobre uma superfície dura. Possui uma excelente resistência ao ataque químico por ácidos fortes e álcalis. É insolúvel em hidrocarbonetos alifáticos e nos alcoóis inferiores. É, no entanto, solúvel em

ésteres, hidrocarbonetos aromáticos, alcoóis superiores e hidrocarbonetos clorados. São fáceis de trabalhar e altamente resistentes ao calor (os tipos mais resistentes ao calor são os de alta massa molar média), na tabela 1 cita-se algumas de suas propriedades [21].

Tabela 1: Algumas propriedades básicas de Poliestireno [21]

Propriedades	
Massa Molar (g/mol)	150.000 – 400.000
Densidade (g/cm ³)	1,05 - 1,07
Índice de Fluidez (g/10min)	1 - 30
Índice de Refração	1,59
Temperatura de Transição Vítrea - T _g (°C)	100
Temperatura de Fusão - T _m (°C)	235
Temperatura de Amolecimento (°C)	85 - 95
Tensão na Ruptura (MPa)	28 - 53
Constante Dielétrica	2,45 - 2,70

Este termoplástico é formado pela polimerização do monômero de estireno. Sua composição química típica do monômero é de C₈H₈, e densidade média de $\rho = 1,06 \text{ g/cm}^3$, possuindo a estrutura básica conforme mostrada na Figura 2.

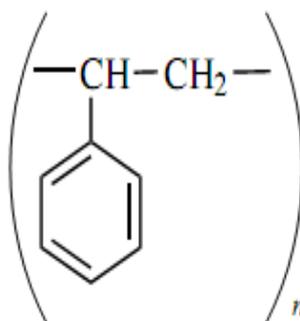


Figura 2. Estrutura Básica de Poliestireno (monômero) [22].

O poliestireno pode ser classificado em três tipos: PS cristal, que é um homopolímero amorfo, duro, com brilho e elevado índice de refração podendo receber aditivos lubrificantes para facilitar seu processamento; PS de alto impacto, no qual contém de 5 a 10% de elastômero, que é incorporado através de mistura mecânica ou diretamente no processo de polimerização, através de enxerto na cadeia polimérica; e PS expandido, que é espuma semi-rígida, polimerizado na presença do agente químico expensor ou então o mesmo pode ser adicionado posteriormente, o material é então aquecido e o agente químico expensor se volatiliza gerando as células no material [21]. O poliestireno é um polímero de crescimento de cadeia, fabricado por reação em cadeia, adição de monômeros no final de uma cadeia em crescimento [23].

Como biomaterial o PS normalmente é usado em biosensores e em placas de cultura de tecidos. Também é a principal matéria-prima para a fabricação de diversos utilitários, como na indústria elétrica e eletrônica, devido sua elevada constante dielétrica, na indústria farmacêutica, na confecção de itens recicláveis, e em sua forma expandida é um excelente isolante térmico. Uma de suas grandes aplicações é na indústria de embalagens de alimentos, devido à baixa ocorrência de migração de monômeros residuais, influenciadores de gosto e odor [21].

2.3.2 Modificação da Superfície de Poliestireno por Plasma

Trabalhos recentes envolvendo o tratamento superficial de poliestireno, utilizando como processo a imersão em plasma em descarga luminescente, identificaram diferentes alterações químicas superficiais como função dos gases de tratamento. Resultando, na incorporação de diferentes grupos funcionais na superfície do poliestireno com importantes alterações na hidrofiliabilidade do material.

Petrat et al. (1994) estudaram a modificação da superfície do poliestireno por tratamento a plasma de microondas com nitrogênio e avaliaram a modificação na superfície *in situ* por ToF-SIMS/XPS, onde verificaram a formação de grupos amina, imina e nitrilo [24].

Já Paynter (1998) estudou a modificação da superfície do poliestireno exposta ao plasma de radiofrequência contendo uma mistura de oxigênio e nitrogênio, onde avaliou a incorporação de grupos funcionais por análise de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e analisou a hidrofiliabilidade da superfície por medidas de ângulo de contato com água. Verificou-se que o oxigênio e o nitrogênio, neste tratamento, tem a tendência de associar-se aos átomos de carbono, formando grupos funcionais amida e que a hidrofiliabilidade da superfície está correlacionada com a fração de átomos eletronegativos incorporados na superfície do poliestireno [25].

Guruvenket et al. (2004) em seu trabalho, modificou a superfície do poliestireno por tratamento a plasma de microondas usando argônio e oxigênio, e avaliou as modificações superficiais por medida de ângulo de contato e por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Relataram que o ângulo de contato diminuiu tanto com as amostras tratadas com argônio, como com as tratadas com oxigênio, indicando um aumento no caráter hidrofílico do material. Quanto à análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, as amostras tratadas com plasma de argônio apresentaram absorção de umidade, pois as mesmas ficaram expostas à atmosfera após o tratamento e absorveram umidade do ambiente. Já as amostras tratadas com plasma de oxigênio, apresentaram uma modificação superficial com diferentes grupos (carbonil, carboxil, éter, peróxido, etc.) [19].

Mais recentemente, Vesel (2010) modificou a superfície do poliestireno com plasma de oxigênio altamente reativo e investigou as mudanças na superfície do polímero por análise de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), microscopia de força atômica (AFM) e medida de ângulo de contato com água (WCA). Constatou que com o aumento do

tempo de tratamento em plasma de oxigênio reativo houve uma diminuição do ângulo de contato, devido a incorporação de grupos polares na superfície do polímero, aumento da rugosidade, entre outros fatores; quanto a medida de XPS em 288, 5 eV surgiu uma ligação O C-OR de uma carboxila e/ou éster. Observou que ao contrário de muitos outros polímeros, uma concentração relativamente elevada de carbonato, grupo funcional O-CO-O-, foi observado na superfície do polímero. A formação desses grupos funcionais pode ser atribuída às reações nos anéis aromáticos, esses grupos funcionais são relativamente estáveis na superfície do poliestireno [26].

2.4 Crescimento de Biofilmes

Biofilmes podem ser definidos como comunidades de microrganismos agregados em uma superfície [27]. Há várias teorias propostas para a formação de biofilmes, entre estas, duas são consideradas as mais fundamentais. A primeira teoria foi descrita por Marshall, et al. (1971) [28], onde se destaca que a adesão de microrganismos a uma superfície é um processo que ocorre em duas fases. Na primeira, basicamente o processo é ainda reversível em função do processo de adesão do microrganismo ocorrer por força de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda fase, ocorre uma interação física da célula com a superfície por meio de um material extracelular de natureza polissacarídea ou protéica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix, que suporta a formação de biofilmes. O glicocálix [29] é definido como um material situado no exterior da célula contendo polissacarídeos². Ele é produzido [17] após o processo inicial de adesão superficial, e fornece condições de adesão

² Polissacarídeo é qualquer macromolécula que consiste de açúcares simples (glicose) resíduos unidos por ligações glicosídicas.

ao peptidoglicano³ da parte externa das bactérias gram-positivas e da parte interna das gram-negativas.

As bactérias são comumente classificadas como Gram (+) tais como *S. epidermidis* que apresenta uma parede celular externa com várias camadas de peptidoglicano até 25, e polissacarídeos ácidos, denominados ácidos teicóicos⁴, sobre a membrana celular interna, que pode conter canais iônicos receptores de proteínas, e Gram (-) como a *E. coli* que apresenta uma única camada de peptidoglicano entre duas camadas de periplasma⁵ e um lipopolissacarídeo⁶ e proteínas na camada externa [17].

As características da superfície do envelope celular das bactérias geralmente contribuem para o processo de adesão (Figura 3). As bactérias podem ser classificadas dependendo da forma da célula (por exemplo, cocos esféricos, como a *S. epidermidis* e bacilos cilíndricos, como a *E. coli*) e possuem aproximadamente 1 µm de comprimento ou diâmetro. Estas formas estão correlacionados com o tipo de proteínas do citoesqueleto expressa em cada espécie bem como variações genótípicas que definem as chamadas cepas dentro de cada espécie [17].

³ Peptidoglicano é um heteropolímero que é encontrado na parede celular da maioria das bactérias, e também está presente no córtex dos endósporos bacterianos, peptidoglicano é o principal componente responsável pela resistência mecânica da parede celular e para manter a forma da célula.

⁴ Ácidos teicóicos são polímeros que geralmente consistem de fosfato de glicerol ou fosfato de ribitol (ou raramente fosfato de manitol) substituído amplamente com aminoácidos e/ou açúcares, está presente no envoltório celular da maioria das bactérias gram-positivas.

⁵ Periplasma região semelhante a um gel situada entre a superfície externa da membrana citoplasmática e a superfície interna da camada lipopolissacarídica de bactérias gram-negativas.

⁶ Lipopolissacarídeo é qualquer polissacarídeo contendo lipídios, no entanto, "lipopolissacarídeo" o termo é comumente usado para se referir ao componente endotóxico da membrana externa das bactérias gram-negativas.

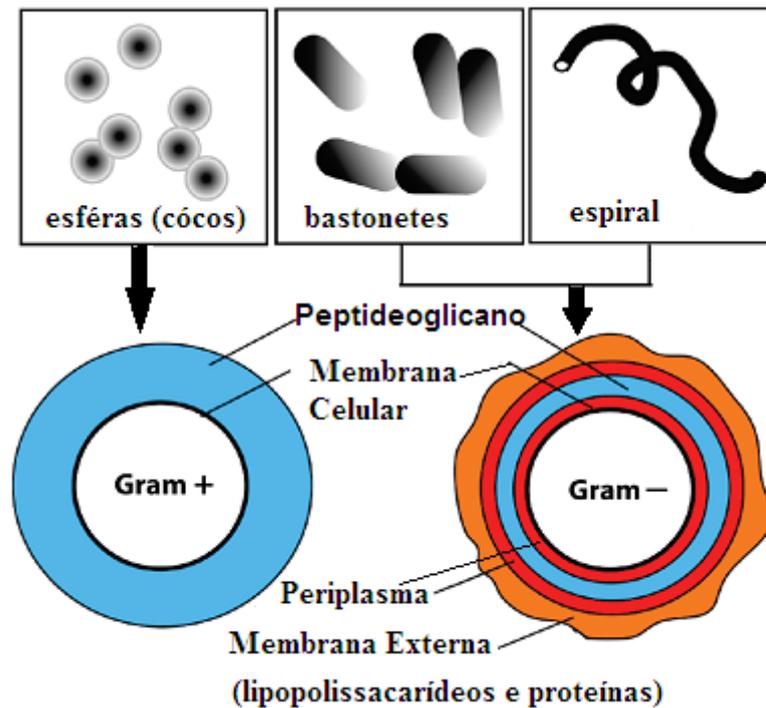


Figura 3. Imagem ilustrativa das características da superfície do envoltório celular das bactérias, adaptado da referência [17].

A segunda teoria sugere a formação de biofilmes em cinco etapas: i) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; ii) transportes de células e nutrientes para o sítio de aderência; iii) inicia-se o processo de adesão bacteriana, ainda reversível, por atração eletrostática; iv) crescimento celular, colonização e adesão irreversível; e v) apresentação do biofilme em alta atividade metabólica [20, 30].

Os mecanismos moleculares que regulam a formação de biofilme variam muito entre as diferentes espécies e até mesmo variam entre diferentes cepas da mesma espécie. No entanto, algumas características são reconhecidas como características gerais da formação de biofilme. Por exemplo, todos os biofilmes contêm uma matriz extracelular que mantém as células unidas. Essa matriz é geralmente composta de um biopolímero de polissacarídeo juntamente com outros componentes, como proteínas ou DNA [31].

2.4.1 *Staphylococcus epidermidis*

A *S. epidermidis* é uma bactéria esférica, gram-positiva com cerca de 1 µm de diâmetro. As cepas bacterianas são muito comuns na pele, onde podem representar 90% da flora normal, geralmente são patogênicas somente quando a barreira cutânea é rompida ou invadida por procedimentos médicos, como a inserção e remoção de cateteres. *S. epidermidis* são organismos aeróbios e altamente hidrofóbicos [32, 33].

Mack (1999) [34] estudou o mecanismo molecular da formação de biofilme da bactéria *S. epidermidis*. Nesse processo, identificou diferentes estágios de desenvolvimento de biofilmes na superfície de polímeros: no primeiro ocorreu à ligação primária por interação hidrofóbica; no segundo houve à adesão polissacarídea celular; no terceiro o acúmulo de bactérias; quarto estágio adesão intercelular polissacarídea; e quinto estágio acúmulo de proteínas associadas (acumulação de biofilme em multicamadas).

Vuong et al. (2002) [14] investigaram a formação do biofilme produzido pela *S. epidermidis* sobre um substrato polimérico de poliestireno, o seu modelo de formação e os fatores envolvidos estão representados na Figura 4.

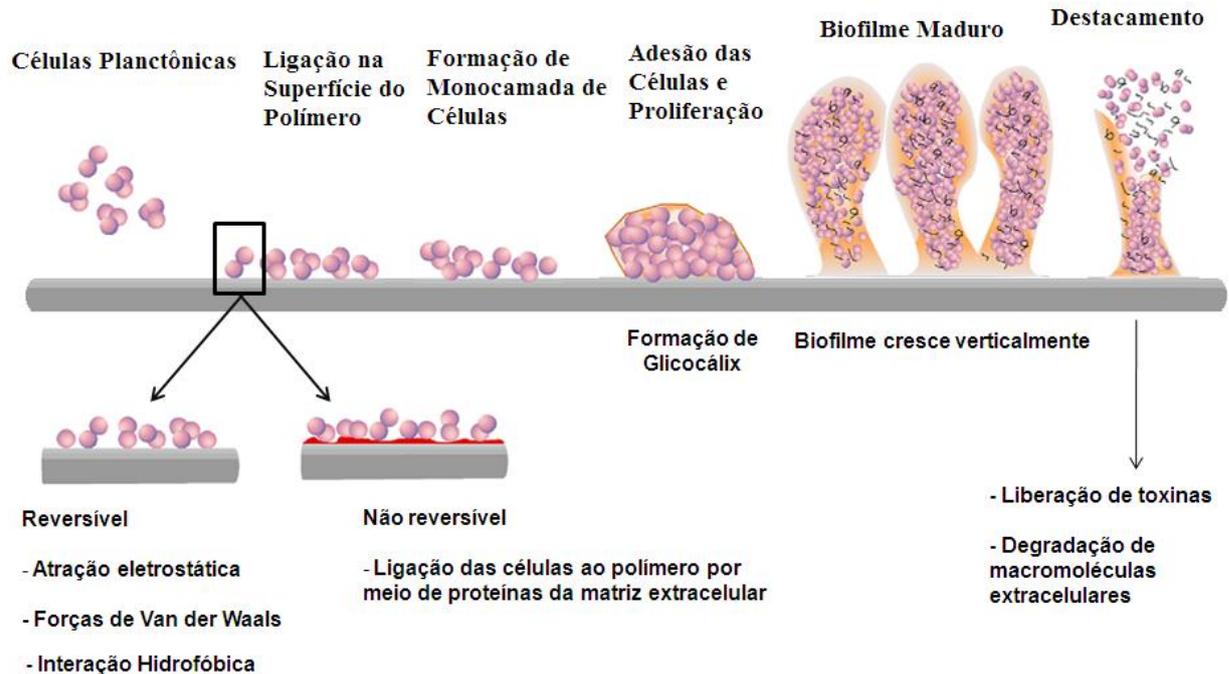


Figura 4. Modelo da formação de biofilme *S. epidermidis* e fatores envolvidos, adaptado da referência [14].

Otto (2009) [35] fez um estudo de revisão dos mecanismos de formação de biofilme da bactéria *S. epidermidis* onde a adesão do biofilme bacteriano ao polímero depende da hidrofobicidade da superfície. Após a aderência à superfície, exopolissacarídeo⁷, proteínas e ácidos teicóicos ajudam na agregação intercelular. Os mecanismos de maturação do biofilme, estruturação e desprendimento são mal compreendidos, mas possivelmente envolvem detecção controlada de peptídeos⁸ e atividade proteolítica⁹ em camadas expostas do biofilme. A expressão gênica¹⁰ é diferente em comparação com o biofilme no modo de crescimento planctônico¹¹ e inclui regulação baixa dos processos celulares básicos.

⁷ Exopolissacarídeos são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias. Dependendo do sistema microbiano, alguns exopolissacarídeos formam cápsulas ao redor da célula, enquanto outros formam limos fora da parede celular.

⁸ Peptídeos são compostos resultantes da união entre dois ou mais aminoácidos. Esta união se dá entre o grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amina do outro aminoácido, ocorrendo liberação de uma molécula de água.

⁹ Atividade proteolítica encarrega-se de dividir as proteínas.

¹⁰ Expressão gênica é o processo pelo qual a informação hereditária contida em um gene, tal como a sequência de DNA, é processada em um produto gênico funcional, tal como proteínas ou RNA.

¹¹ Crescimento planctônico - Planctônico corresponde ao estado em que as células estão sozinhas, ou seja, não estão em grupo.

Anteriormente considerado como um microrganismo inócuo sobre a pele humana, *Staphylococcus epidermidis* é agora visto como um importante patógeno oportunista. A *S. epidermidis* juntamente com a *S. aureus* ocupam o primeiro lugar entre os agentes causadores de infecções hospitalares. Em particular, *S. epidermidis* representa a fonte mais comum de infecções em implantes médicos. Isso provavelmente decorre do fato de que *S. epidermidis* é um colonizador permanente na pele humana, e o resultado da alta probabilidade de contaminação durante a inserção de um dispositivo, colonizando membranas e mucosas do corpo humano [14]. Embora infecções causadas por *S. epidermidis* raramente evoluiu para doenças potencialmente fatais, a sua frequência e o fato de que eles são extremamente difíceis de tratar, representa um sério problema para o sistema público de saúde. O tratamento é complicado pela presença de determinados genes de resistência a antibióticos e a formação de biofilmes, que são aglomerações multicelulares que tem resistência a antibióticos, e os mecanismos de defesa do hospedeiro [30].

Neste trabalho, avaliou-se a influência do tratamento a plasma da superfície de amostras de poliestireno na formação de biofilmes produzidos pela bactéria *S. epidermidis*.

CAPÍTULO III

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Neste trabalho foram utilizadas como amostras placas de microtitulação comerciais de poliestireno (PS) com 96 poços de fundo plano (Costar 3599) obtidas da Corning, Inc. (NY, E.U.A.). Segundo o fabricante, estas placas são de superfície modificada usando descarga corona – enxerto de íons de oxigênio altamente energéticos na superfície do PS. A bactéria *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 foi usada como modelo de biofilme bacteriano patógeno gram-positivo.

3.2 Imersão em Plasma de Descarga Luminescente

A modificação da superfície das amostras foi realizada em uma câmara de nitretação a plasma, disponível no Laboratório de Engenharia de Superfícies e de Tratamentos Térmicos (LESTT) da Universidade de Caxias do Sul. A Figura 5 (a) mostra um esquema da câmara de reação utilizada no processo de preparação das amostras, e em detalhe, na Figura 5 (b) uma amostra em processamento.

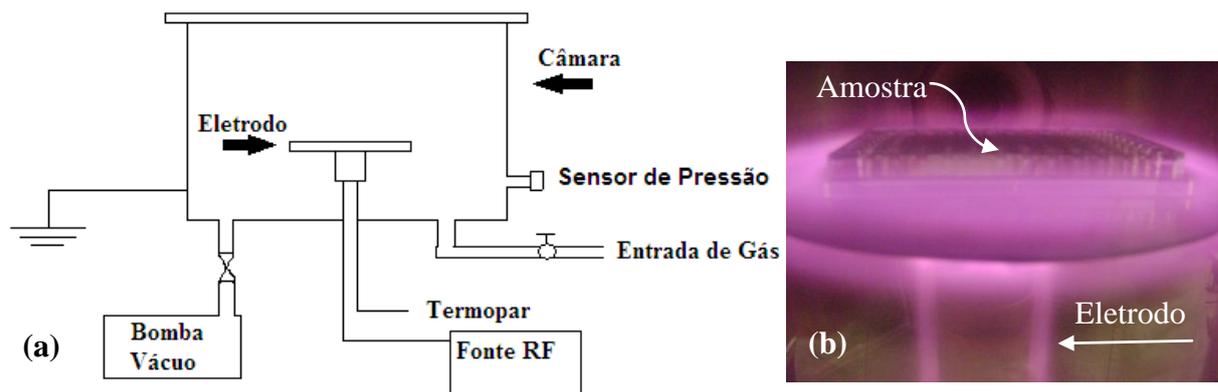


Figura 5. (a) Esquema da câmara utilizada para o processo de imersão em plasma e (b) em detalhe eletrodo e amostra em processo de imersão a plasma.

As placas de PS com 96 poços foram inseridas na câmara de reação sobre o eletrodo de aço inoxidável e posteriormente evacuada até uma pressão de 4×10^{-2} mbar. Em seguida, a câmara foi pressurizada a 1,3 mbar com o gás de tratamento escolhido, uma mistura de N_2/H_2 na proporção 24 % : 76 % de alta pureza (99,999 %). Para gerar o plasma, uma fonte de radiofrequência (RF) de 13,56 MHz foi usada aplicando uma densidade de potência de $0,44 \text{ Wcm}^{-2}$ sobre a amostra, onde a densidade de potência refletida foi inferior a $0,007 \text{ Wcm}^{-2}$ em todos os tratamentos. Após o tratamento, as amostras foram retiradas da câmara de reação e imediatamente seladas em uma embalagem estéril, não sendo abertas até a caracterização da superfície e/ou ensaio de antibiofilme. O efeito da modificação da superfície por plasma RF foi investigado como uma função do tempo de tratamento (5, 15, 30, 60 e 120 min), mantendo todos os demais parâmetros do processo constantes. A temperatura de tratamento foi mantida sempre abaixo da temperatura de amolecimento de PS. Além do conjunto de amostras tratadas em plasma outro conjunto de amostras foi preparado somente com fluxo da mistura de gás N_2/H_2 sem a descarga luminescente. Tais amostras foram utilizadas como amostras controle em ensaios de biofilme bacteriano. A Figura 6 apresenta um esquema da preparação das amostras.

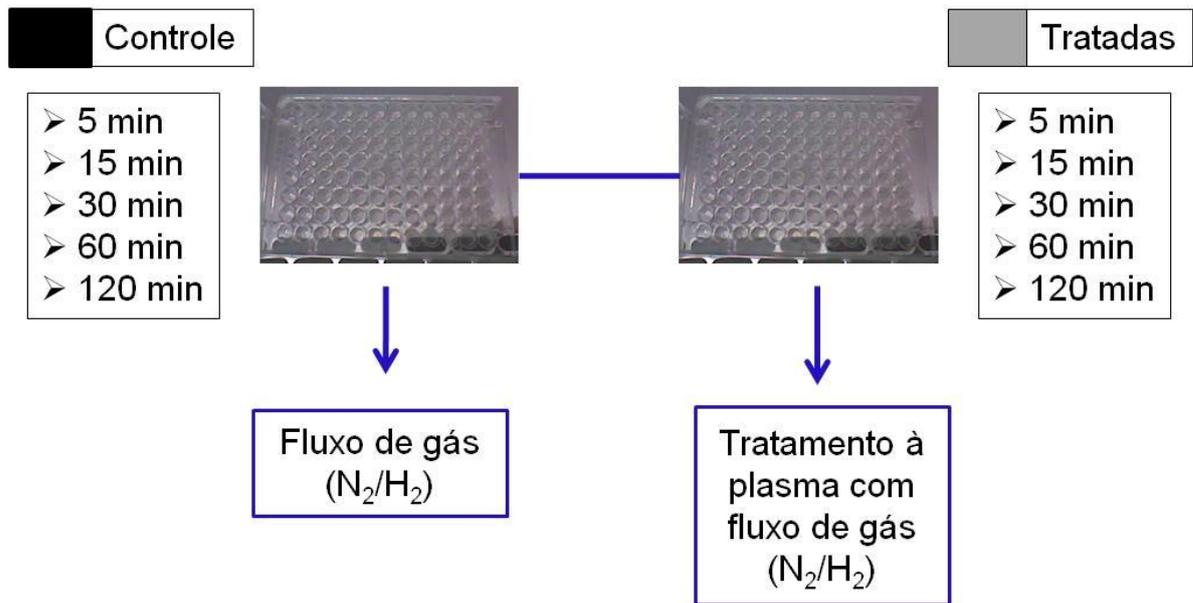


Figura 6. Esquema da preparação das amostras.

3.3 Técnicas de Caracterização

3.3.1 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS)

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), também conhecida por espectroscopia de elétrons para análise química (ESCA) é uma técnica bastante usada para determinar a composição química de superfícies. Nessa técnica, a amostra é inserida em um ambiente de ultra alto vácuo (UHV, entre 10^{-8} e 10^{-12} mbar), e então irradiada com fótons na faixa dos raios X [36]. Esses raios X incidentes arrancam elétrons de níveis mais internos dos átomos superficiais da amostra através do efeito fotoelétrico, conforme representado na Figura 7.

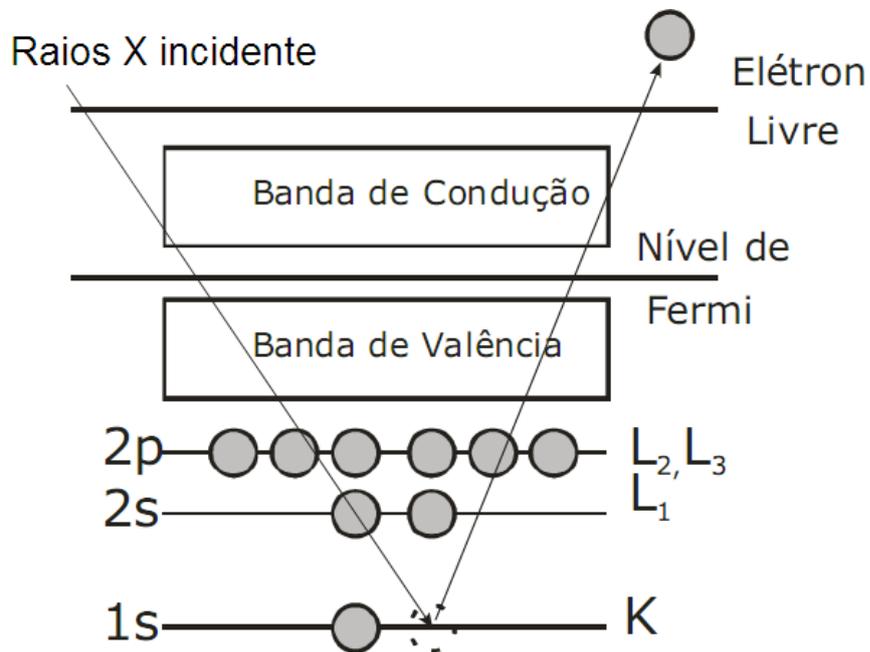


Figura 7. Ilustração do efeito fotoelétrico adaptado da referência [36].

Os elétrons (fotoelétrons) emitidos da superfície da amostra são analisados por um analisador hemisférico, que os separa em energia para serem contados posteriormente em um detector tipo Channeltron[®]. Uma representação do esquema experimental é mostrada na

Figura 8 (a) é uma imagem do equipamento usado, na Figura 8 (b) [36]. A energia dos fotoelétrons está relacionada com o átomo emissor e com o ambiente químico desse átomo na amostra, já a quantidade de fotoelétrons é relacionada à concentração do átomo emissor na amostra. Se os elementos presentes na amostra estiverem em concentrações atômicas iguais ou superiores a 1% é possível utilizar essa técnica para identificá-los, com exceção de H e He para os quais a seção de choque de ionização com raios X é muito pequena.

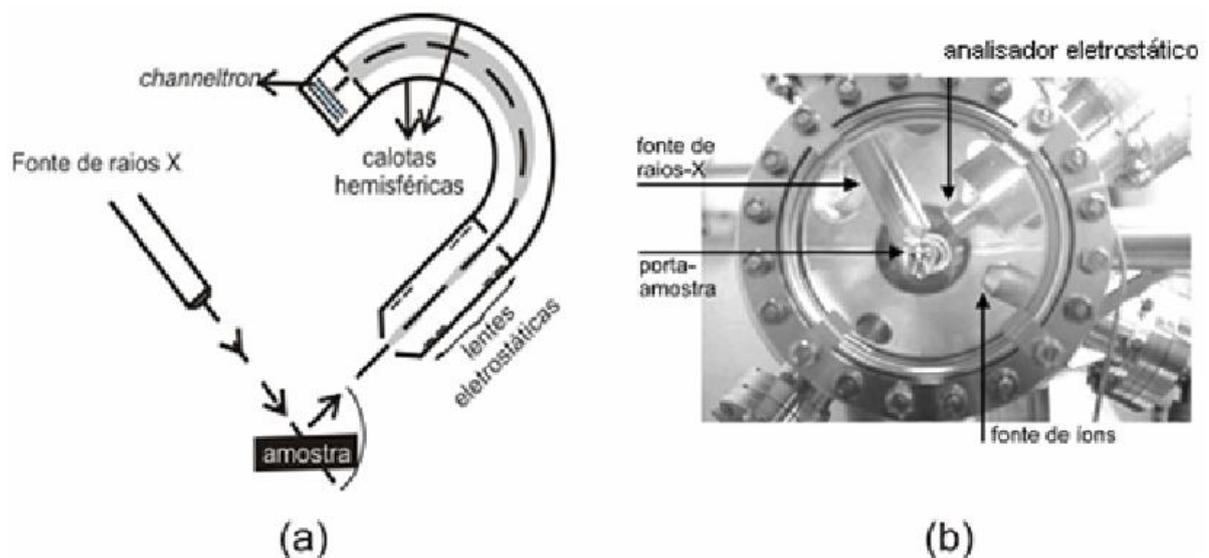


Figura 8. (a) Esquema do aparato utilizado na geração e coleção dos fotoelétrons. (b) Imagem da câmara de análise XPS [36].

Quanto ao processo de fotoemissão, os elétrons ligados a um determinado átomo só serão ejetados caso a radiação que incida sobre eles tenha uma frequência (energia) maior ou igual a um valor característico. Ou seja, à medida que é aumentada a energia destes elétrons pela radiação incidente, a partir de um determinado valor limite, o processo de fotoemissão é iniciado. A energia cinética com que estes elétrons são emitidos crescerá linearmente de acordo com a energia da radiação incidente, e a quantidade destes fotoelétrons emitidos será proporcional à intensidade da radiação incidente. Basicamente este processo físico é descrito pela equação de Einstein:

$$BE = hv - KE - \Phi_A \quad (1)$$

onde BE é a energia de ligação dos elétrons no átomo em relação ao nível de Fermi, hv é a energia da radiação incidente (conhecida do experimento), KE é a energia cinética dos fotoelétrons detectados (determinada pelo experimento) e Φ_A a função trabalho do analisador de energia dos fotoelétrons (conhecida do experimento). Vale lembrar que os níveis de energia são quantizados e os fotoelétrons possuem uma distribuição de energia cinética associada às camadas eletrônicas dos átomos presentes na superfície da amostra.

Os espectros de XPS são usualmente mostrados como função da energia de ligação dos fotoelétrons (BE). Em um espectro de XPS podemos observar muitas vezes pequenos deslocamentos na energia dos picos de um determinado elemento, conhecidos como deslocamentos químicos. Estes deslocamentos químicos trazem informações sobre o ambiente químico em que o átomo emissor do fotoelétron se encontra. Essa diferença na energia de ligação dos diferentes estados químicos de um determinado átomo deve-se principalmente a redistribuição eletrônica dos elétrons de valência, que afetam também a energia de ligação de átomos em seus níveis eletrônicos mais internos. A energia dos picos de XPS e de seus deslocamentos químicos é geralmente comparada com valores padrões existentes na literatura, tornando possível a identificação dos elementos presentes no material e de seus respectivos estados químicos.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Superfícies e Interfaces Sólidas (LASIS) do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IF-UFRGS). Os espectros de XPS foram obtidos por meio de um equipamento *Omicron SPHERA spectrometer*; o analisador foi utilizado no modo CAE (*Constant Analyzer Energy*), com uma energia de passagem de 5 eV utilizando radiação Mg - $K\alpha$ (1.253,6 eV), produzindo uma resolução entre 1,2 - 1,8 eV. O deslocamento do ângulo foi de 53°, e o tratamento dos dados foi realizado usando o software CASA XPS.

A análise de XPS realizada neste trabalho foi para determinar o tipo e a quantidade de ligações químicas presentes na superfície das amostras de PS tratadas pelo processo de imersão em plasma de N_2/H_2 .

3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Reflexão Total Atenuada (ATR-IR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que permite a identificação de grupos funcionais através da absorção de energia associada aos movimentos vibracionais (principalmente estiramentos e deformações angulares). Fornece informações sobre os tipos de ligações presentes em um material e muitas vezes pode permitir ao analista identificar o material [37].

As moléculas orgânicas absorvem e convertem a radiação infravermelha (IR) em vibração molecular. Uma mudança na energia vibracional é acompanhada por mudanças na energia rotacional das moléculas. As bandas de energia vibracional/rotacional aparecem entre 4000 e 400 cm^{-1} . A frequência ou o comprimento de onda de absorção depende da massa dos átomos, da constante de força das ligações, e da geometria dos átomos [38].

O espectro de FTIR do PS revela bandas de absorção típicas das ligações C-H presentes neste polímero como o estiramento de C-H sp^2 entre 3080 e 3020 cm^{-1} , estiramento C-H sp^3 e grupos CH_2 entre 2920 e 2850 cm^{-1} , deformação do anel aromático entre 1603 e 1454 cm^{-1} [39].

As análises por ATR-IR foram realizadas em um espectrômetro *PerkinElmer Spectrum 400* disponível no Laboratório de Caracterização de Materiais 2 da Universidade de Caxias do Sul (UCS). Os ensaios foram realizados no modo ATR, empregando-se a faixa de varredura compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e com 32 corridas de leitura.

3.3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM), também conhecida como “scanning force microscopy” (SFM), tem sido bastante utilizada no estudo de polímeros devido a sua capacidade de fornecer informações que não são possíveis de se obter com os melhores microscópios ópticos ou com a microscopia eletrônica de varredura [40]. O microscópio de força atômica é capaz de resolver estruturas na ordem de angstroms (10^{-10} m), de modo que sua resolução seja aproximada 10^6 vezes. Diversas informações podem ser extraídas de medidas de AFM, tais como, topografia e rugosidade da superfície analisada [36].

O microscópio de força atômica trabalha de forma semelhante às agulhas dos antigos toca discos. No lugar da agulha, no microscópio de força atômica encontra-se o *cantilever*, que consiste de uma haste flexível em cuja parte inferior é crescida uma ponta (*probe*) com dimensão de poucas micras. Para percorrer a amostra de forma a se obter uma imagem é utilizado um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas, capazes de realizar movimentos nas três direções (xyz), com precisão de angstroms. Durante a varredura, também se emprega um sistema de alinhamento com feixe de laser, que incide sobre o *cantilever* e reflete em um sensor de quatro quadrantes. Este sensor fornece informações de localização para o sistema de realimentação e controle, que corrige a posição do *cantilever* de forma a manter o contato com a amostra, durante a varredura, e permitir a obtenção da imagem. A Figura 9 mostra um diagrama de funcionamento do microscópio de força atômica. [40].

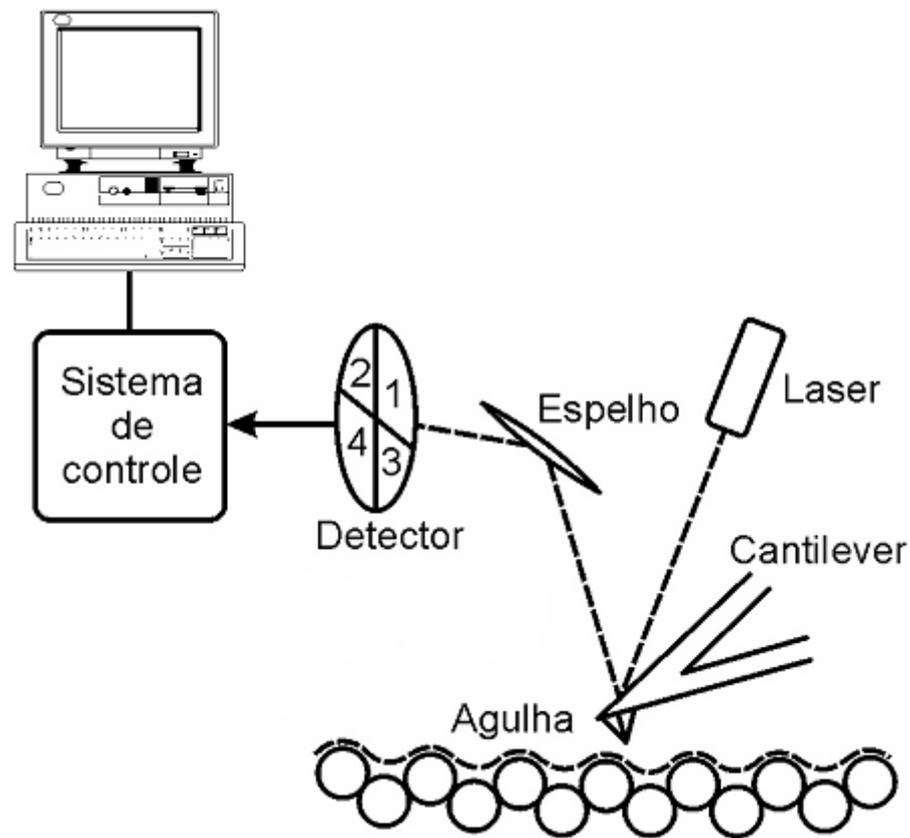


Figura 9. Diagrama de funcionamento do microscópio de força atômica [40].

Durante a varredura, forças de atração ou repulsão (que variam em função da distância entre o *cantilever* e a amostra) podem atuar. As forças de atração podem ter origem tanto em fatores físicos, como a capilaridade e a interação de Van der Waals, ou químicos, como a afinidade entre o *cantilever* e a amostra. A força de repulsão deve-se à interação coulômbica [40]. A Figura 10 apresenta um esquema das forças envolvidas na análise AFM em algumas de suas diferentes formas de varredura.

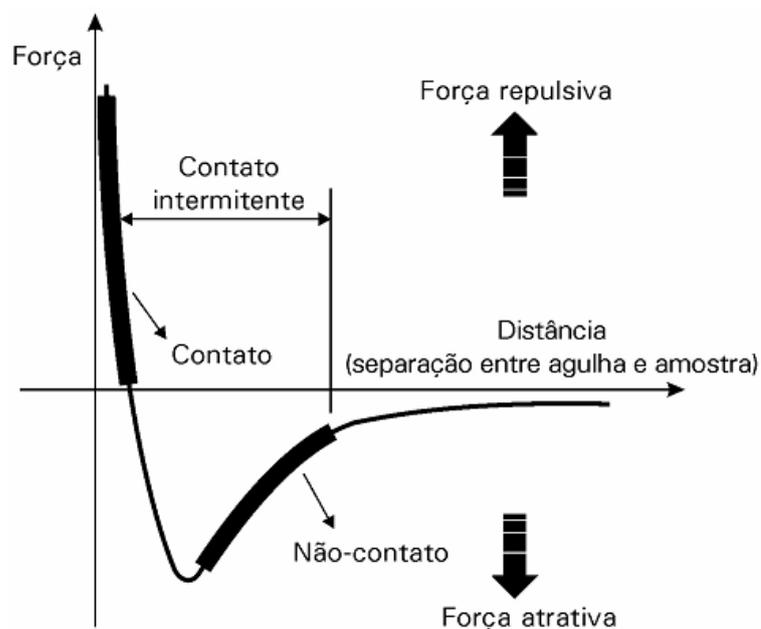


Figura 10. Mapa de forças entre a amostra e a ponteira em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica [40].

Os diferentes modos de se obter uma imagem variam em função de vários fatores: amostra, tipo de *cantilever* utilizado e o tipo de varredura. Para o modo contato, é utilizado um *cantilever* com baixa constante de mola, na faixa de 0,02 a 2 N/m. Este modo de operação é indicado para amostras rígidas pois a ponteira toca suavemente a superfície da amostra não danificando-a. O modo de força lateral é utilizado para indentificar diferentes materiais em blendas poliméricas, pois a força de atrito varia significativamente em função do material da amostra e assim consegue identificar regiões compostas por diferentes materiais. O modo não contato e contato intermitente é indicado para amostras hidrofílicas, este modo de operação utiliza um *cantilever* bem mais rígido do que o utilizado para modo contato. Neste tipo de varredura, a constante de mola varia de 10 a 80 N/m. No caso do modo contato intermitente, a ponteira do *cantilever* vibra em alta frequência, dezenas a centenas de megahertz, sobre a superfície da amostra, tocando-a suavemente durante a varredura, podendo ocorrer contaminação do *cantilever* com o material ejetado da superfície durante o contato. Quanto maior a constante de mola, mais rígido é o *cantilever* e, maior será a frequência de oscilação

deste durante a varredura. No caso do modo não contato, o cantilever oscila sobre a amostra sem tocá-la. Nesse caso não há contaminação da agulha com o material da superfície da amostra. As informações obtidas são sempre da superfície de estudo não sendo possível obter informações sobre a camada interna do material. As amostras devem ser razoavelmente planas, pois a diferença máxima de altura permitida para a utilização destas técnicas é cerca de 10 μm [40].

Esta análise foi realizada no Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IF-UFRGS). A fim de avaliar as características topográficas da superfície das amostras de PS submetidas ao processo de imersão em plasma de N_2/H_2 . Imagens de AFM foram adquiridas em modo de contato intermitente usando um extenso *multi-mode Digital Instruments Nanoscope III* microscópio equipado com scanner "E", um único *cantilever* e uma *probe* do tipo seta de frequência de ressonância de 286 kHz. A *probe* utilizada foi uma *probe* de silício em forma de seta, o modelo da *probe* é Arrow NC do tipo AC MODE (AIR) e foi fabricada pela NanoWorld. As imagens de AFM foram analisadas utilizando o *WSxM 5,0 SPM Develop package*.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A microscopia eletrônica de varredura consiste em varrer a superfície da amostra com um feixe de elétrons emitidos termoiônica através da saturação de um filamento. Esse feixe é colimado através de lentes sendo incidido sobre a amostra, a qual é varrida com um padrão de rastreamento pelo feixe de elétrons energéticos. Neste processo, vários fenômenos ocorrem na superfície, produzindo diferentes tipos de sinais, incluindo elétrons espalhados, secundários e Auger, fótons de fluorescência de raios X e fótons de várias energias. Estes sinais tem sido usados para estudos de superfícies, mas os mais comuns são elétrons

espalhados e secundários, e emissão de raios X que é empregada em análises com microsonda eletrônica [41].

O SEM, conforme pode ser visto na Figura 11, consiste basicamente da coluna óptico-eletrônica (canhão de elétrons e sistema de demagnificação), da unidade de varredura, da câmara de amostra, do sistema de detectores e do sistema de visualização da imagem.

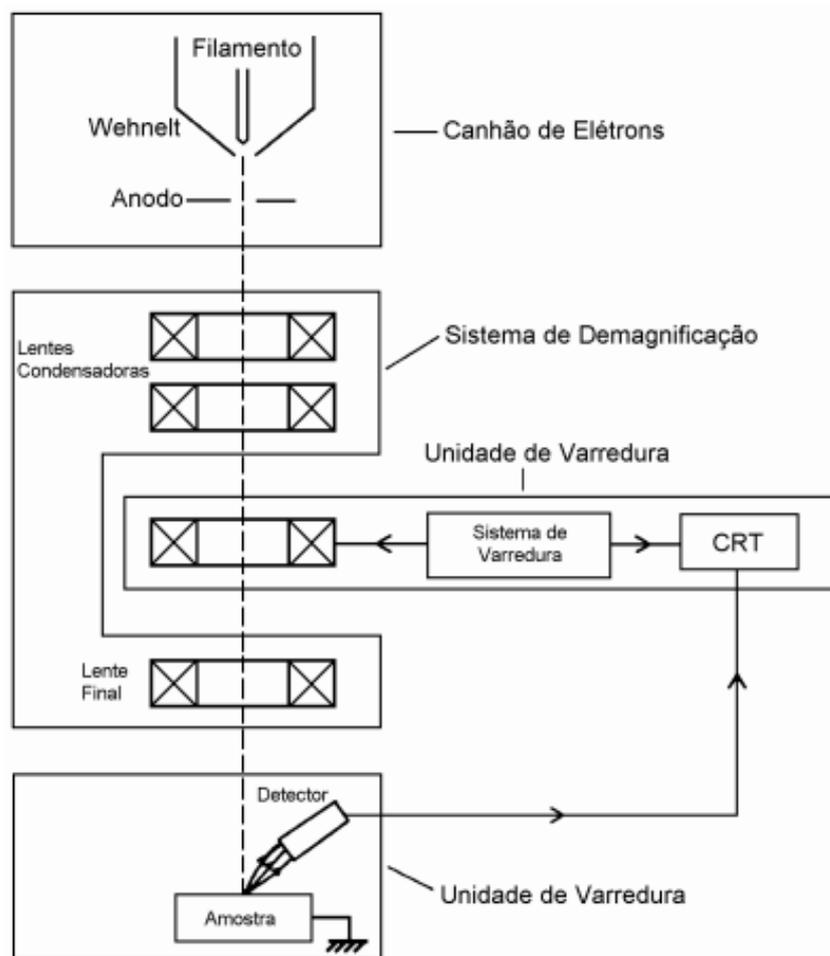


Figura 11. Representação esquemática dos componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura [42].

O canhão de elétrons é usado para a produção do feixe de elétrons com energia e quantidade suficiente para ser captado pelos detectores. Esse feixe eletrônico é então demagnificado por várias lentes eletromagnéticas, cuja finalidade é produzir um feixe de elétrons focado com um pequeno diâmetro numa determinada região da amostra [42].

Com a utilização dessa técnica podem-se obter informações relativas à morfologia da amostra, dentre outras. As imagens foram registradas por meio de um microscópio Shimadzu SSX-550, disponível no Laboratório de Caracterização de Materiais 1 da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

3.3.5 Ângulo de Contato com Água (WCA)

Quando uma gota de líquido é disposta em uma superfície sólida, a interface tríplice sólido/líquido/vapor se moverá em resposta às forças referentes às três tensões interfaciais (γ_{SL} , γ_{LV} , γ_{SV}) até que uma condição de equilíbrio seja atingida (espalhamento da gota) conforme descrita a equação a seguir:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (2)$$

Na equação 2, γ_{SV} é a tensão superficial na interface sólido/vapor, γ_{SL} é a tensão superficial na interface sólido/líquido, e γ_{LV} é a tensão superficial na interface líquido/vapor. Este cenário é ilustrado na Figura 12, a qual representa uma gota de líquido (L) sobre uma superfície sólida (S) com o ar em volta (V) sendo a terceira fase. O ângulo entre a superfície sólido/líquido e a tangente para a superfície líquido/vapor na linha de contato com o sólido é denominado ângulo de contato (θ). Por convenção, este ângulo de contato é medido na fase líquida. A molhabilidade é então determinada a partir do ângulo de contato de equilíbrio. Se $\theta < 90^\circ$, considera-se que o líquido “molha” o sólido; se $\theta = 0^\circ$ há uma molhabilidade completa ou perfeita; se $\theta > 90^\circ$ verifica-se que o líquido “não molha” o sólido. Portanto, o ângulo de contato é uma função da tensão superficial entre o sólido e o líquido, ou seja, se o mesmo líquido for utilizado, o ângulo de contato pode diminuir se a tensão superficial do sólido for aumentada. Em muitos estudos de modificação superficial de polímeros, a água é utilizada como

líquido de teste e as variações no ângulo de contato são usados para monitorar as mudanças na composição química das superfícies poliméricas [41, 43].

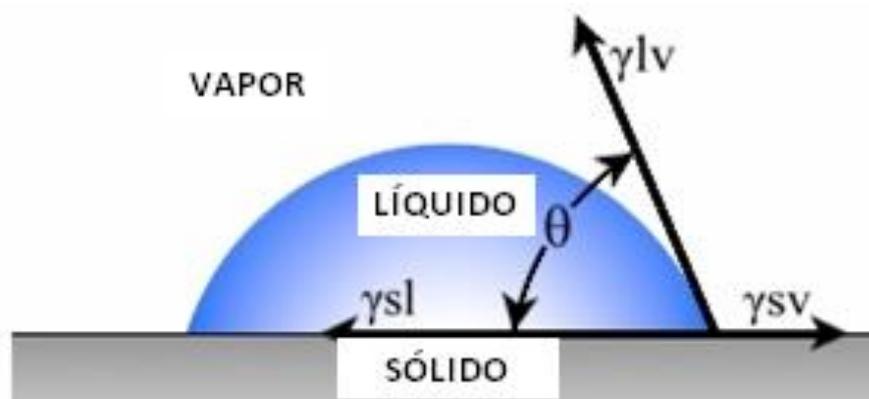


Figura 12. Esquema ilustrativo das forças que atuam na interface tríplice (sólido/líquido/vapor) para uma gota de líquido sobre uma superfície sólida [41].

Neste trabalho medidas de ângulo de contato foram feitas a fim de avaliar a hidrofilicidade da superfície tratada, a partir de três medidas em amostras independentes, utilizando-se água MilliQ à temperatura ambiente como líquido de teste com gotas de 1 μL .

3.4 Ensaios de Antibiofilme Bacteriano

Os ensaios de antibiofilme foram realizados no Centro de Biotecnologia da UFRGS. Após o tratamento a plasma, as placas de microtitulação de PS foram utilizadas como substrato nos ensaios de antibiofilme bacteriano. Foram utilizadas como amostras controle placas que haviam sido submetidas somente ao fluxo de gás de (N_2/H_2) na câmara de reação sem plasma. A *S. epidermidis* ATCC 35984 foi cultivada em caldo de Luria Bertani¹² (LB) a 37 °C e 150 rpm por 12 horas e, em seguida diluída a fim de produzir uma suspensão bacteriana de densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) cerca de 0,3, o equivalente a 10^8 unidades

¹² Caldo de Luria Bertani é um meio de cultura usado para cultura de microrganismos.

formadoras de colônias (UFC).mL⁻¹. No ensaio, adaptado de Stepanovic e colaboradores [44], 100 µL de bactéria diluída em suspensão e 100 µL de caldo LB foram adicionados aos poços e incubados a 37 °C por 24 h. O controle negativo consistiu de 200 µL de caldo LB. Depois da incubação, o conteúdo dos poços foi retirado e lavado três vezes com 200 µL de solução salina estéril 0,9 %. As bactérias que permaneceram foram expostas ao calor e fixadas pela exposição ao ar quente a 60 °C por 1 h. A camada de biofilme aderente foi corada com 200 µL de cristal violeta 0,4 % por 15 minutos em temperatura ambiente. A placa foi lavada, colocando-a em água corrente até que esta estivesse livre da mancha. O corante ligado às células foi resolubilizado com dimetilsulfóxido (DMSO) 99,5 % (*Sigma, St. Louis, MO, USA*) e a absorvância foi medida, espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 600 nm (*Spectramax M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*), nas amostras controle e nas amostras tratadas. E pelo valor de absorvância foi calculada a porcentagem de adesão de biofilme em cada amostra.

Para avaliar se o efeito do tratamento a plasma afeta o crescimento das bactérias (além da aderência), dois experimentos foram realizados: avaliação do crescimento bacteriano por (OD₆₀₀) e a medida de viabilidade celular por resazurina. Para o ensaio de crescimento bacteriano, a absorvância foi medida a 600 nm, antes e após a incubação, a diferença entre a absorvância inicial e final foi tomada como uma medida de crescimento bacteriano. Para avaliar a viabilidade das células, o conteúdo dos poços foi removido após a incubação no ensaio de antibiofilme e transferido para outra microplaca padrão de 96 poços estéril de PS de fundo plano e 25 µL de uma solução resazurina (0,1 mg.mL⁻¹) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 2 horas a 37 °C e avaliados visualmente: tons de azul não indicando células viáveis e tons de rosa, indicando células viáveis, como descrito por Sarker e colaboradores [45].

3.4.1 Análise Estatística

Essa análise foi realizada no Centro de Biotecnologia da UFRGS. Todos os experimentos microbiológicos foram desenvolvidos em triplicata. Para análise do tempo de tratamento a plasma, três placas foram utilizadas, cada uma com um inóculo bacteriano independente. Experiências que envolveram a atividade antibiofilme e crescimento bacteriano (OD_{600}) foram analisadas pelo teste *t-Student's* com o software SPSS 12.0, e de sentido único ANOVA seguido por *Tukey test post hoc* com o software Minitab versão 1.4.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras usadas neste trabalho foram obtidas de acordo com os procedimentos descritos no capítulo III. Propriedades físico-químicas e morfologia superficial das amostras de poliestireno tratadas foram obtidas pelo uso das técnicas experimentais de XPS, ATR-IR, AFM, SEM, WCA. Testes de adesão de biofilme bacteriano, formado pela *S. epidermidis*, avaliados por ensaios microbiológicos conforme também descritos no capítulo III.

4.1 Composição Superficial

4.1.1 Análise de XPS

A técnica de XPS foi usada para estudar a química na superfície das amostras de poliestireno modificado por imersão em plasma na mistura N_2/H_2 (24 % : 76 %), a quantificação dos resultados, e as informações sobre a natureza das ligações químicas foram obtidas a partir dos valores de energia de ligação. A Figura 13 apresenta espectros de XPS para o poliestireno antes e após o tratamento em diferentes tempos (5, 15, 30, 60 e 120 min). Primeiramente, observa-se nestes espectros a presença de picos de emissão Auger para emissões de átomos de carbono e oxigênio em todas as amostras, e de nitrogênio somente nas amostras tratadas. Observa-se também, dentro do limite de detecção da técnica (cerca 0,1 at.% entre 0-10 nm de profundidade), que as amostras estão livres de contaminantes provenientes da câmara de reação, como exemplo o ferro.

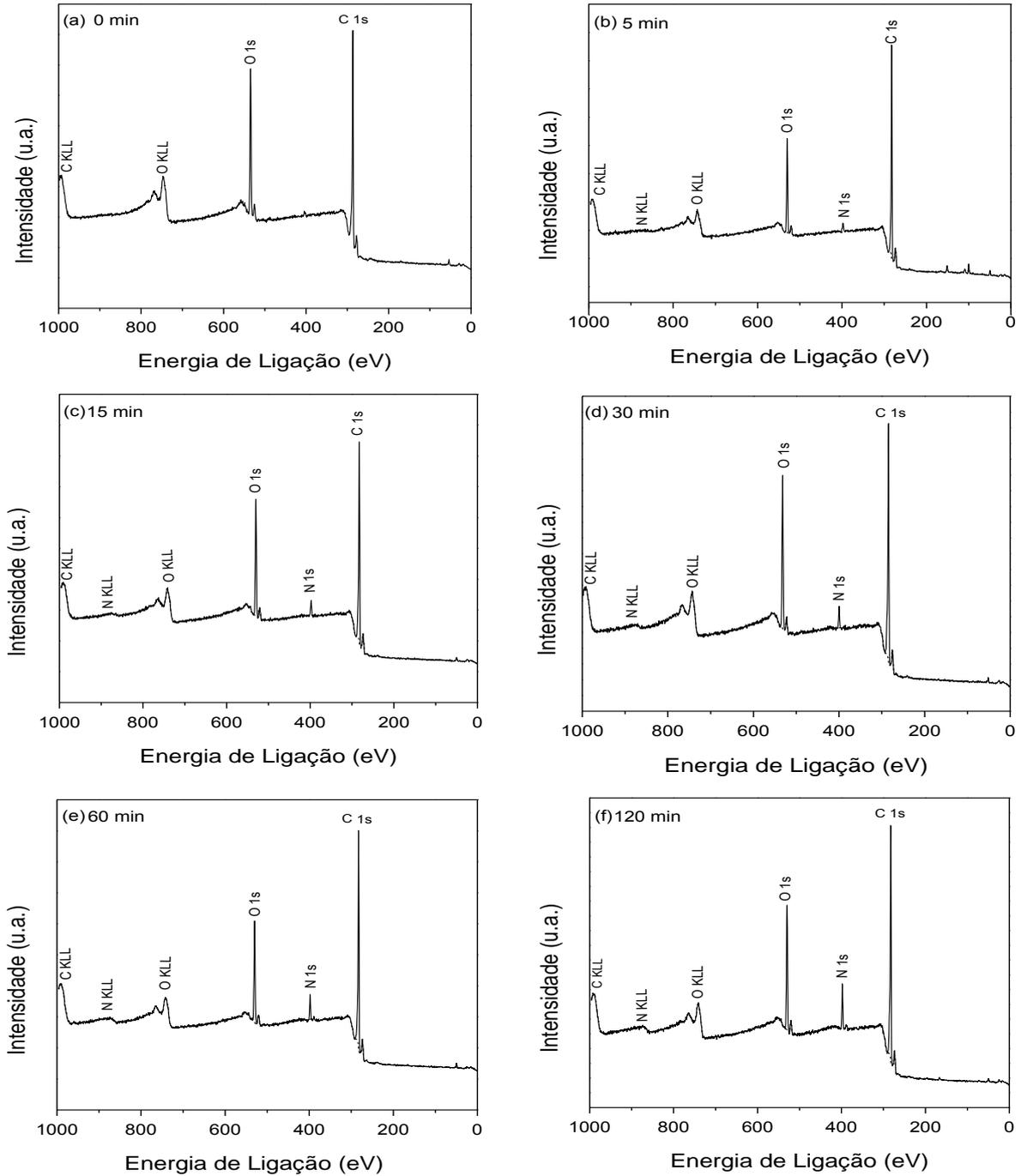


Figura 13. Espectros de fotoelétrons excitados por raios X da superfície de poliestireno.

Com relação à presença de oxigênio nas amostras, gás não alimentado ao processo de imersão, uma amostra de PS teve sua superfície limpa por pulverização catódica com He^+ na câmara de análise de XPS. Da análise, revelou que o oxigênio não está presente na massa das amostras e sim em regiões próximas a superfície. Portanto, o oxigênio observado é

provavelmente proveniente da descarga corona, submetido pelo fabricante das placas de microtitulação, e da exposição da amostra ao oxigênio presente na atmosfera.

Para identificar os diferentes grupos funcionais introduzidos no PS com o tratamento a plasma, espectros de alta resolução para a faixa de energia de fotoelétrons C 1s, N 1s e O 1s, foram realizados. A Figura 14 apresenta espectros na região de fotoelétrons C 1s para os diferentes tempos de tratamento.

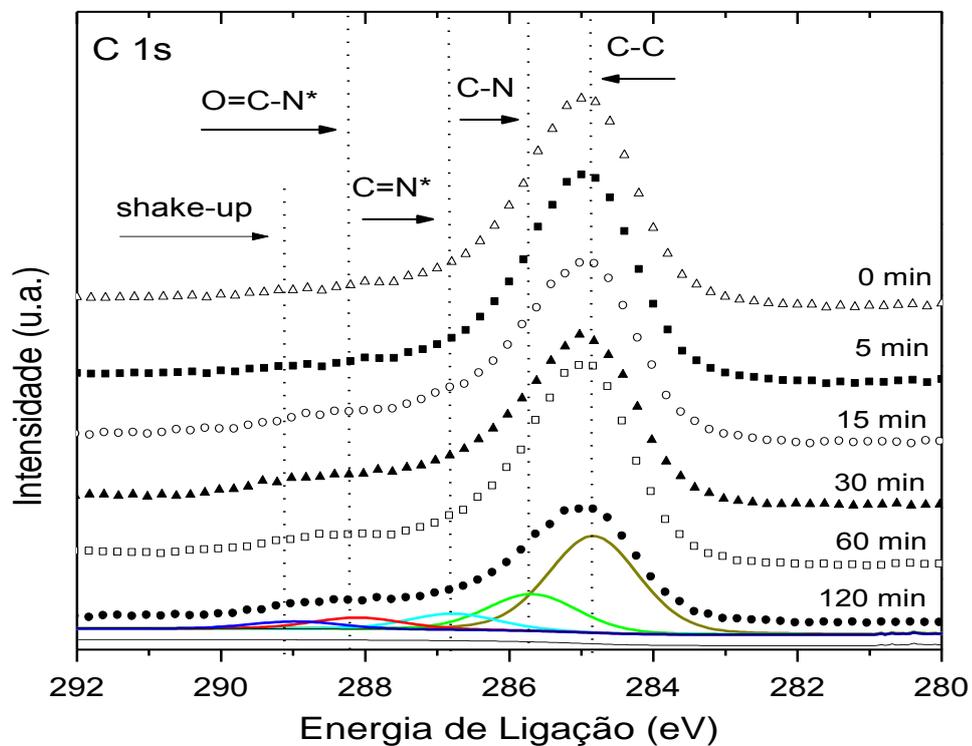


Figura 14. Espectros da região de fotoelétrons C 1s da superfície de poliestireno. Sem tratamento ou 0 min (triângulos abertos); tratadas em 5 min (quadrados sólidos); 15 min (círculos abertos), 30 min (triângulos sólidos), 60 min (quadrados abertos) e 120 min (círculos sólidos).

Foi feita uma deconvolução de cada banda para identificar os grupos funcionais a partir dos valores de energia de ligação de cada banda, os grupos encontrados foram: C-C (284,6 eV) [25], C-N (285,95 eV) [46, 47], C=N* (287,9 eV) [25, 48], O = C-N* (288,33 eV) [25, 4848] e um *shake-up* satélite (289,47 eV) [48]. Os grupos marcados com (*) não podem

ser atribuídos de forma clara, uma vez que diferenças de energia de ligação com relação à configuração de outras substâncias químicas estão abaixo da resolução instrumental. Ou seja, C=N também pode ser atribuído às emissões de C-O e O=C-N pode ser atribuído às emissões de C=O. Os grupos polares C-N, C=N e O=C-N são observados somente após o tratamento de imersão em plasma, e suas concentrações relativas aumentam com o tempo de tratamento. O pico de emissão mais intenso C-C é atribuído à ligação carbono-carbono presente no PS. Contribuições alifáticas e aromáticas não podem ser separadas, mas a presença do π - π^* *shake-up* satélite indica a presença de aromaticidade mesmo após o tratamento a plasma.

Espectros obtidos para a região de fotoelétrons N 1s, mostrados na Figura 15 (A), indicam um aumento sistemático na área do pico de nitrogênio como função do tempo de tratamento. Na Figura 15 (B) foi feita uma deconvolução de cada banda a fim de identificar os grupos funcionais a partir dos valores de energia de ligação de cada banda.

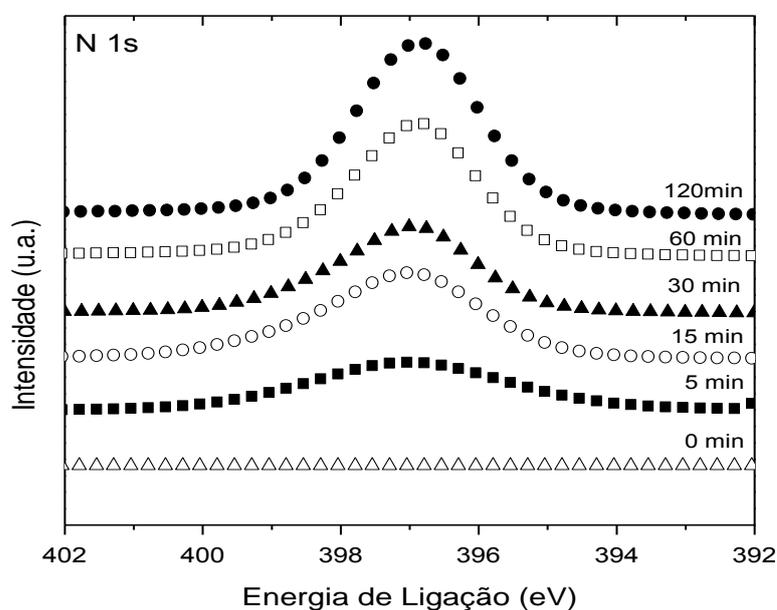


Figura 15 (A). Espectros da região de fotoelétrons N 1s da superfície de poliestireno. Sem tratamento ou 0 min (triângulos abertos), tratadas em 5 min (quadrados sólidos), 15 min (círculos abertos), 30 min (triângulos sólidos), 60 min (quadrados abertos) e 120 min (círculos sólidos).

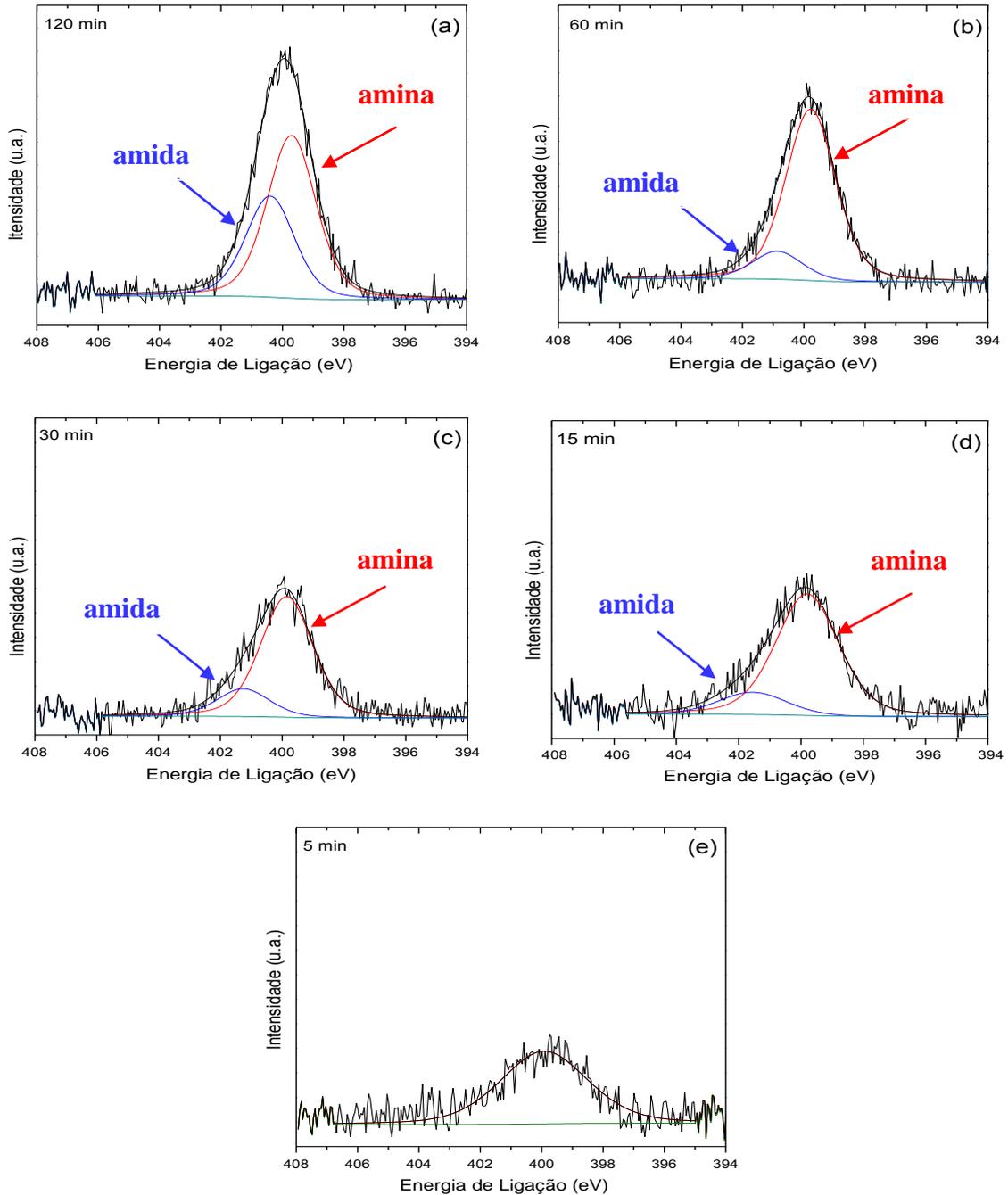


Figura 15 (B). Espectros da região de fotoelétrons N 1s da superfície de poliestireno tratada em plasma por (a) 120 min, (b) 60 min, (c) 30 min, (d) 15 min e (e) 5 min.

De acordo com a Figura 15 (B), a partir da deconvolução de cada banda em cada espectro os grupos funcionais encontrados foram: amina C-N (399 eV) [25] e a componente de mais alta energia de ligação “representada em azul” é atribuída ao grupo amida N-C=O (401 eV) [25]. Nas amostras a partir de 15 min foi observada a presença dos grupos amina e

amida, sendo a componente amina sempre maior. No espectro da amostra de 120 min foi observada a diminuição da componente amina em função do aumento das componentes amida.

O aumento da área do pico de nitrogênio nos espectros de XPS (Figura 15 (A)) é proporcional ao aumento da concentração relativa de nitrogênio incorporado à superfície do PS. Desse modo, podemos relacionar a concentração de N (em porcentagem atômica, at.%) como função do tempo de tratamento conforme mostra a Figura 16.

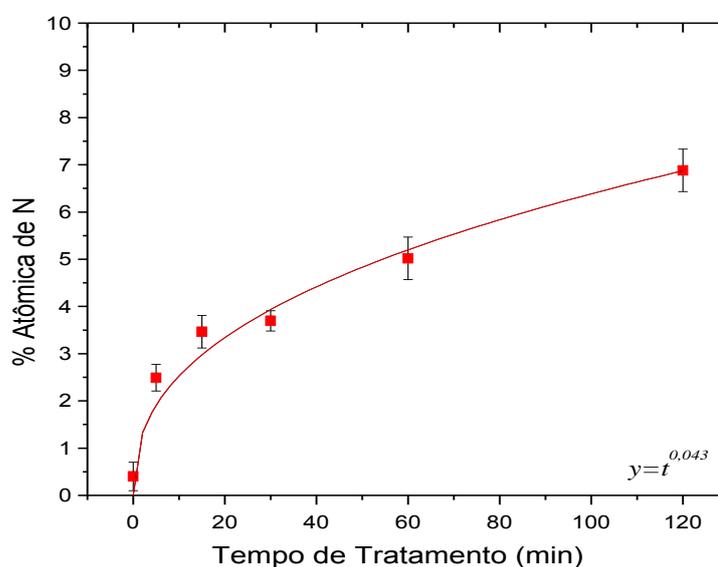


Figura 16. Porcentagem atômica de nitrogênio em função do tempo de tratamento a plasma de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min.

Da Figura 16, observa-se um comportamento com tendência a saturação para o nitrogênio em longos tempos de tratamento, chegando a uma concentração de 5 a 7 at.% de nitrogênio incorporado para os maiores tempos de tratamento usados neste trabalho. A saturação é esperada uma vez que dois mecanismos competitivos acontecem durante o processo de imersão em plasma: i) incorporação de íons de nitrogênio e ii) erosão (*sputtering*) da superfície modificada [49]. O primeiro mecanismo é predominante para tratamentos em

curto prazo, enquanto que, para tratamentos longos, os mecanismos de concorrência levam a um regime de estado estacionário na incorporação de nitrogênio.

Para a região de fotoelétrons O 1s, os espectros de XPS são apresentados na Figura 17 (a), e suas respectivas concentrações relativas como função do tempo de tratamento na Figura 17 (b).

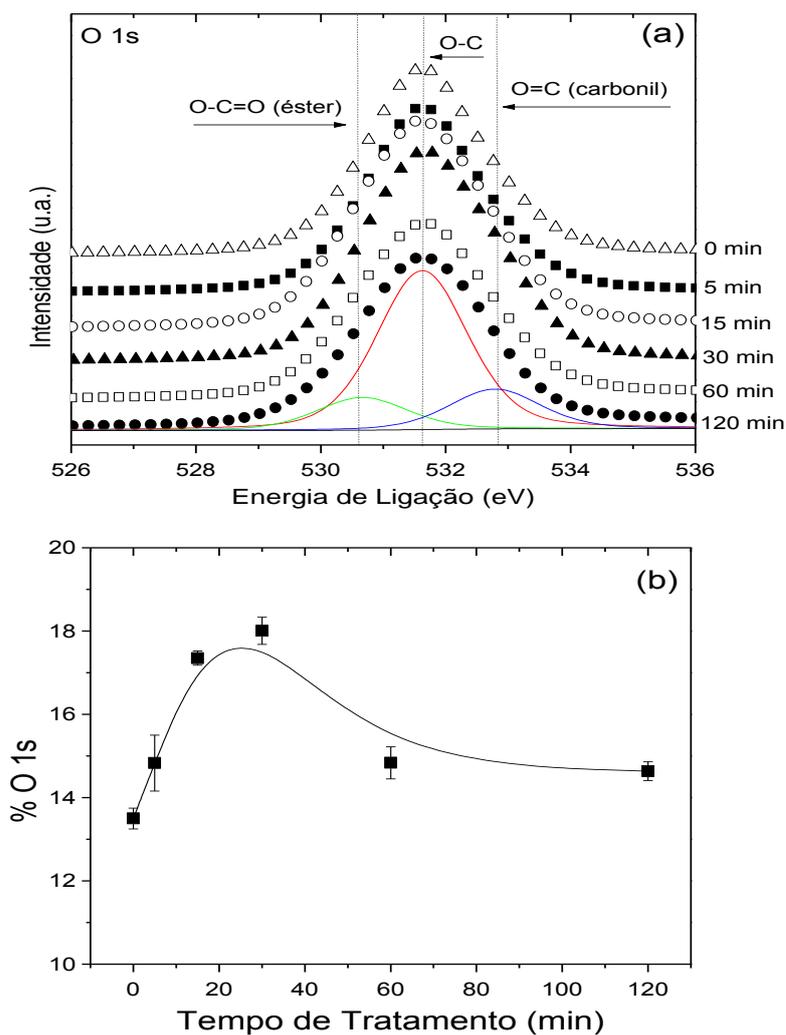


Figura 17. (a) Espectros da região de fotoelétrons O 1s da superfície de PS. Sem tratamento ou 0 min (triângulos abertos), tratadas em 5 min (quadrados sólidos), 15 min (círculos abertos), 30 min (triângulos sólidos), 60 min (quadrados abertos) e 120 min (círculos sólidos); (b) Porcentagem atômica de oxigênio em função do tempo de tratamento de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min.

De acordo com a Figura 17 (a) foi feita uma deconvolução de cada banda a fim de identificar os grupos funcionais a partir dos valores de energia de ligação de cada banda, os grupos encontrados foram: O-C (531,8 eV) [24], carbonil O=C (533 eV) [24, 25] e éster O-C=O (530,5 eV) [24]. A Figura 17 (b) indica um pequeno aumento relativo da concentração de oxigênio na superfície de PS nos primeiros tempos de tratamento, até 30 min, e a partir de 60 min a concentração de oxigênio diminui e se mantém constante. Este efeito pode ser explicado pelo fato de que, durante a irradiação do plasma na superfície da amostra, uma série de ligações estáveis à superfície do polímero são quebradas gerando radicais livres que podem se ligar com diferentes grupos funcionais [49]. Ou seja, em até 30 min de tratamento não há tempo suficiente para o nitrogênio se ligar a todos os sítios livres, que, após a retirada da amostra da câmara, os sítios livres remanescentes são ligados ao oxigênio atmosférico. Segundo Idage et al. (1998) a incorporação de oxigênio na superfície de polímero após o tratamento, mesmo com um plasma não contendo oxigênio é um fenômeno comum, os átomos de oxigênio não precisam necessariamente ser excitados por plasma. Depois do tratamento, certos radicais livres ainda podem estar na superfície, que pode reagir com o oxigênio quando a superfície da amostra é exposta à atmosfera, [49].

A Figura 18 relaciona as concentrações relativas em porcentagem atômica para o carbono e o oxigênio, obtidos das análises de XPS de poliestireno, como função do tempo de tratamento de imersão em plasma.

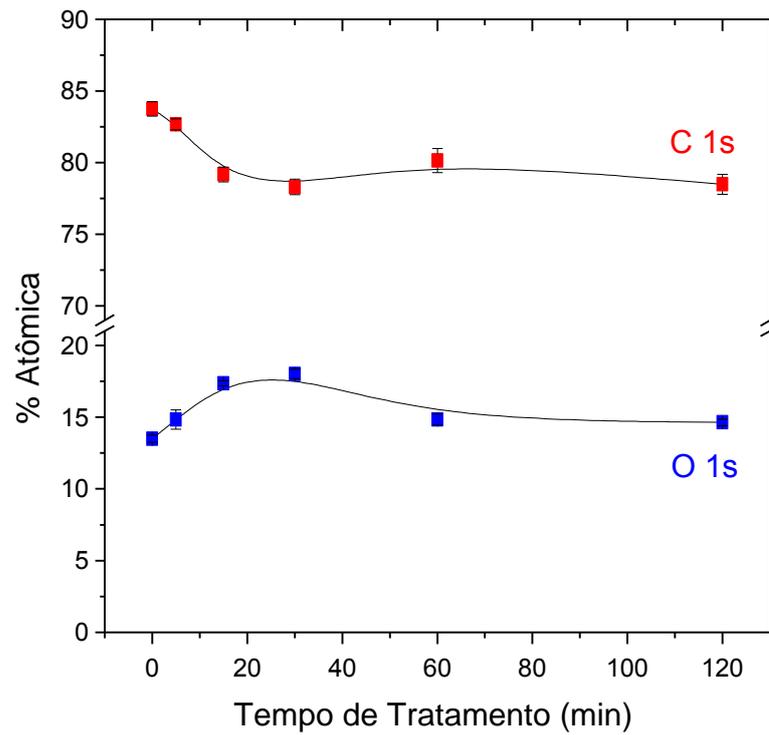


Figura 18. Porcentagem atômica de C1s e O1s em função do tempo de tratamento.

Comparando os resultados da Figura 18 observa-se uma redução relativa na concentração de C entre 15 e 30 min de tratamento e neste mesmo intervalo de tempo ocorre um aumento na concentração relativa de O. Para comparar esses resultados foi calculada a razão entre O/C apresentada na Figura 19.

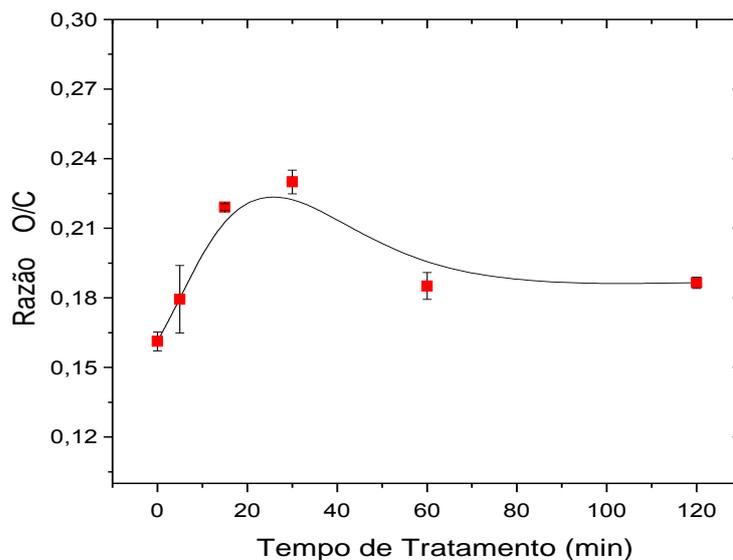


Figura 19. Razão oxigênio/carbono em função do tempo de tratamento de imersão em plasma de 0 a 120 min.

Essa razão entre O/C se mantém praticamente a mesma em 0 e 5 min, aumentando entre 15 e 30 min e, por fim, entre 60 e 120 min há uma redução mantendo-se constante na mesma razão inicial. Efeito relacionado ao processo de imersão em plasma, ou seja, da incorporação de nitrogênio, onde a partir de 60 min há tempo para uma maior quantidade de N se ligar nos sítios livres do carbono, assim a superfície fica mais estável e menos propícia para o oxigênio do ambiente reagir.

4.1.2 Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada (ATR-IR)

Os espectros de ATR-IR, revelam informações importantes no que diz respeito à composição da superfície de poliestireno e de camadas próximas a ela (entre zero a 500 nm até 5000 nm). A Figura 20 apresenta espectros de ATR-IR, na região do infravermelho médio, típicos para as medidas realizadas neste trabalho para a amostra sem tratamento e tratada a 120 min por imersão em plasma. Observam-se além das bandas típicas para o poliestireno,

duas regiões distintas onde há uma pequena alteração nos valores de transmissão, entre 3600 a 3100 cm^{-1} , entre 1780 a 1700 cm^{-1} e em 874 cm^{-1} .

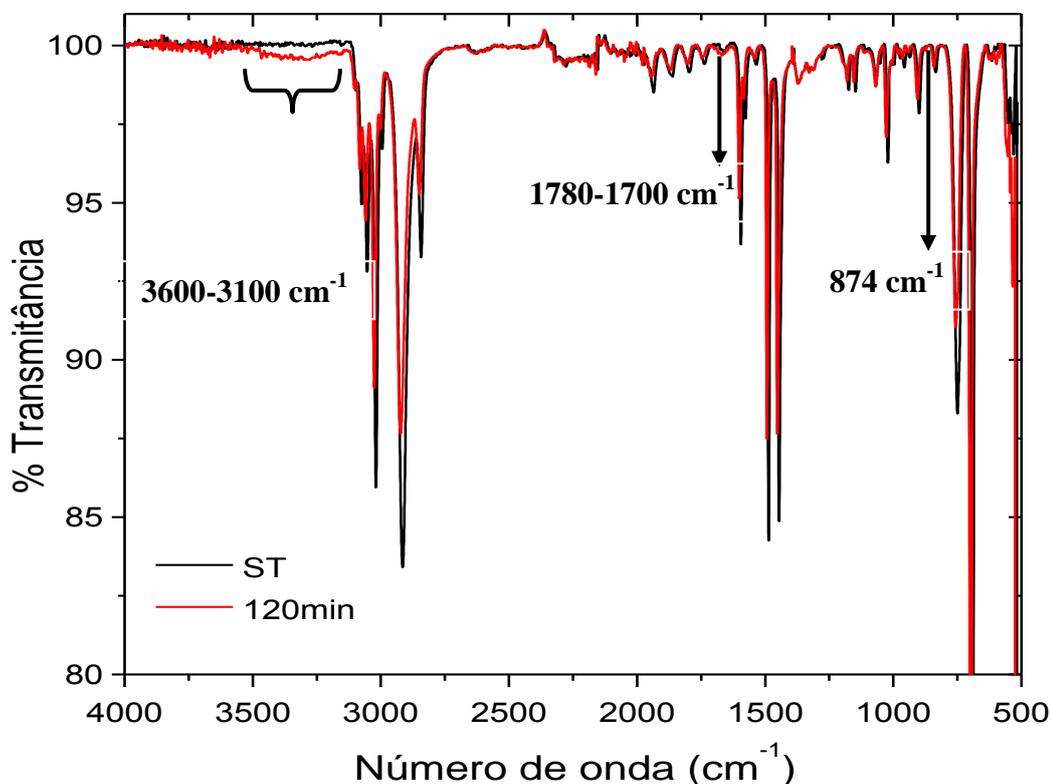


Figura 20. Espectros de ATR-IR de poliestireno sem tratamento (ST), e tratado em plasma na mistura de N_2/H_2 por 120 min.

Os espectros das amostras tratadas apresentam uma alteração envolvendo uma banda fraca e alargada na região entre 3600 a 3100 cm^{-1} , atribuída a amins e amidas (tabela 2) [39], mostradas em detalhe na Figura 21 (a), cujas intensidades aumentam com o tempo de tratamento. Há também uma pequena alteração na região entre 1780 a 1700 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento C=O [22], mostrada em detalhe na Figura 21 (c). A presença de uma banda de intensidade fraca em 874 cm^{-1} , também é mostrada em detalhe na Figura 21 (b), a qual pode ser atribuída a três configurações: estiramento C-N na região entre 910 a 870 cm^{-1} [22]; deformação angular simétrica fora do plano de N-H entre 900 a 700 cm^{-1} ; ou a deformação axial de C-C, C-O, C-N entre 1300 a 800 cm^{-1} [39].

Tabela 2: Frequências típicas de NH e NH₂ de grupos amida e amina [22]

	-NH ₂ , cm ⁻¹	-NH, cm ⁻¹
Amida	3500-3410	~ 3450
Amina	~ 3400	~ 3320

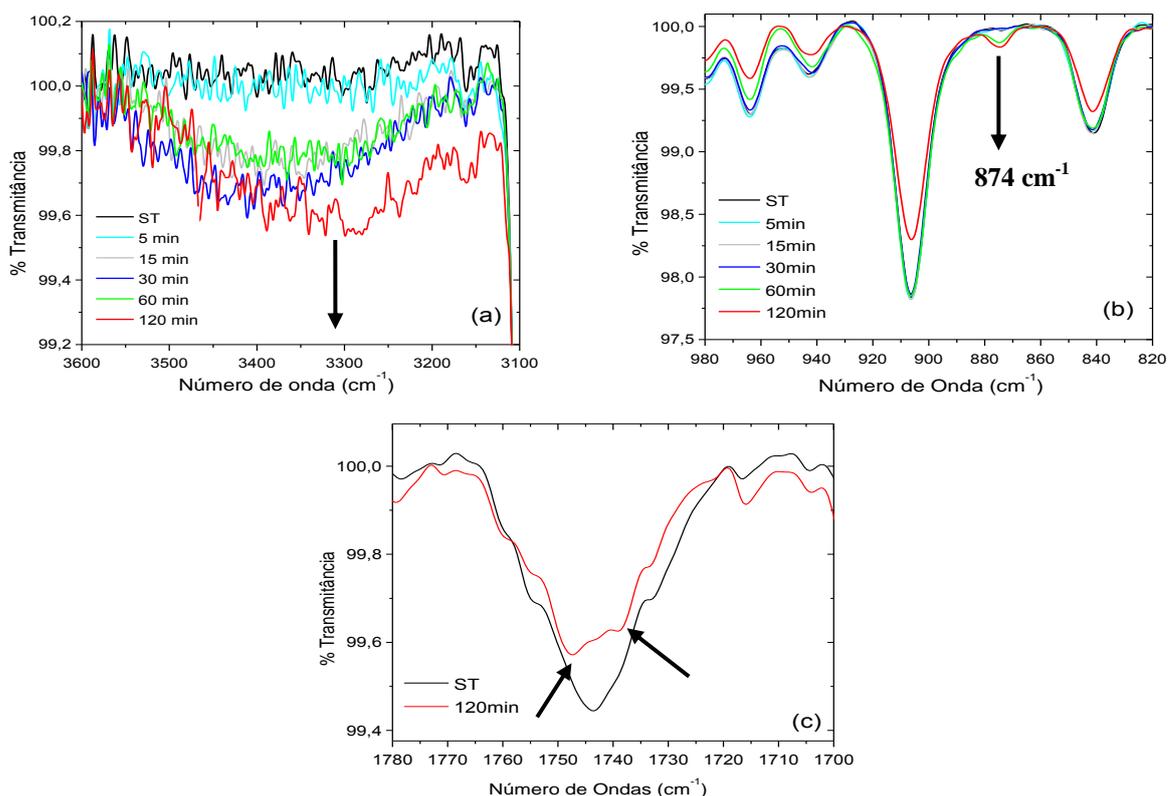


Figura 21. Espectros de ATR-IR de poliestireno sem tratamento, e de poliestireno tratado a plasma com uma mistura de N₂/H₂ por 5, 15, 30, 60 e 120 min: (a) espectros ampliados para a região de 3600-3100 cm⁻¹, (b) para a região de 980-820 cm⁻¹ e (c) espectros ampliados para a região de 1780-1700 cm⁻¹ da amostra sem tratamento (ST) e da amostra tratada por 120 min.

Na Figura 21 (a) é observado que a partir de 60 e 120 min há um aumento da formação de amina secundária. De acordo com a Figura 21 (b) e com o auxílio das análises de XPS para a região de fotoelétrons do C 1s, pelo fato da técnica de XPS ser mais sensível pois analisa a região mais externa da amostra, há um forte indício que o pico presente em 874 cm⁻¹ nos espectros obtidos para as amostras de 60 e 120 min, seja atribuído ao estiramento do grupo funcional C-N. Na Figura 21 (c) é observada uma pequena mudança na região entre 1780-1700 cm⁻¹, onde esta mudança esta relacionada com o estiramento do grupo C=O de amida [22].

4.2 Textura Superficial

4.2.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Além de mudanças químicas na superfície das amostras, como exposto anteriormente, também foram observadas mudanças na textura superficial. As imagens de AFM apontadas na Figura 22 revelam que o tratamento por imersão em plasma reduz a rugosidade superficial do polímero com o aumento do tempo de tratamento. Na Figura 22 são apresentadas imagens da topografia das amostras de PS tratadas a plasma em diferentes tempos (Figura 22 (b), (c), (d), (e) e (f)), bem como a de PS sem tratamento (Figura (a)).

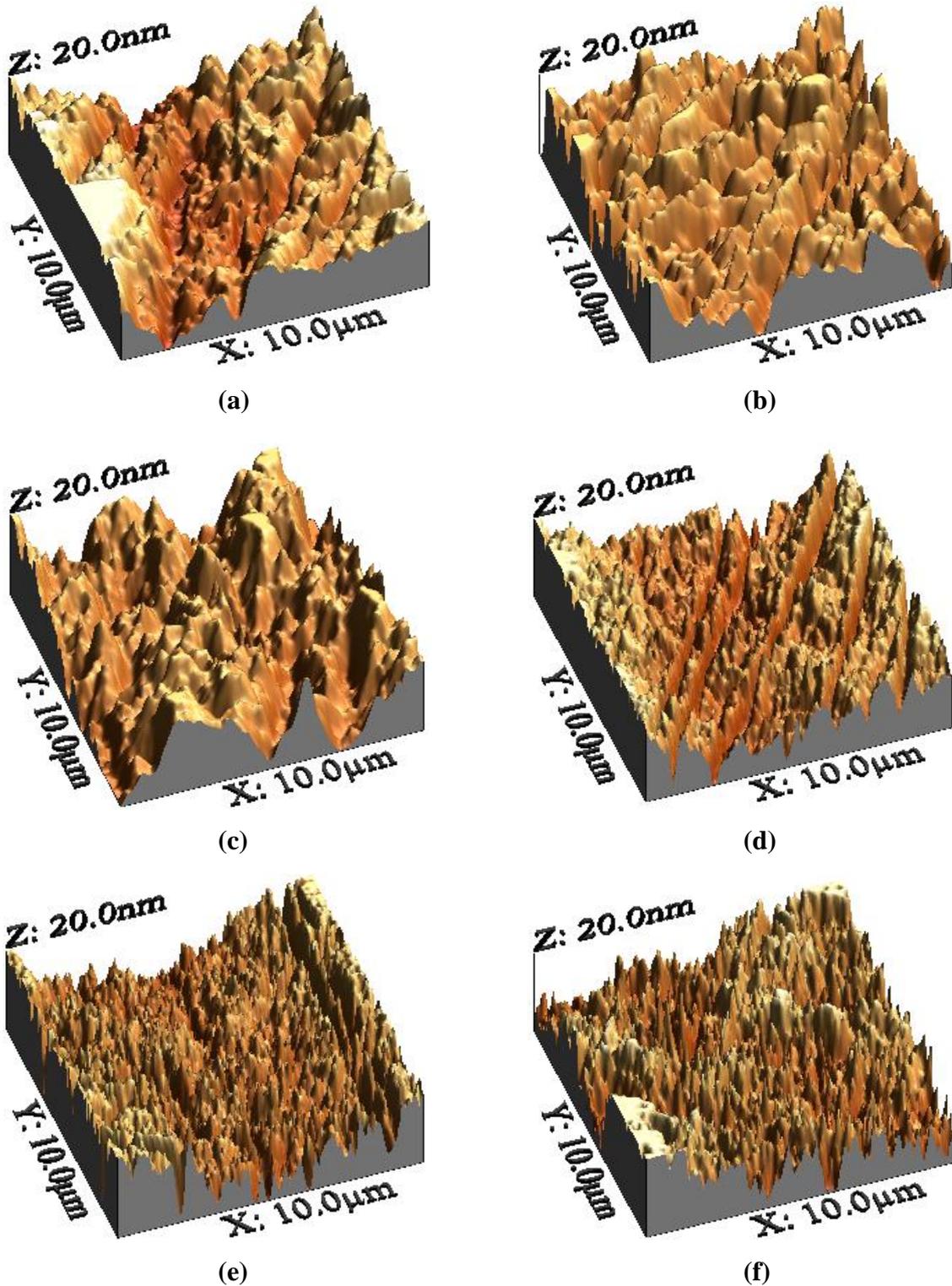


Figura 22. Topografia das amostras de PS por AFM (a) antes do tratamento a plasma e após o tratamento com N₂/H₂ por (b) 5 min (c) 15 min (d) 30 min (e) 60 min e (f) 120 min.

A partir da análise da textura superficial feita nestas imagens de AFM, foi possível obter valores para a rugosidade média (Ra) como função do tempo de tratamento, cujos

valores estão apresentados na Figura 23. É importante notar que, para tempos de tratamento superiores a 30 min, a rugosidade média é reduzida por um fator três de seu valor inicial mantendo-se constante em torno de 1,2 nm.

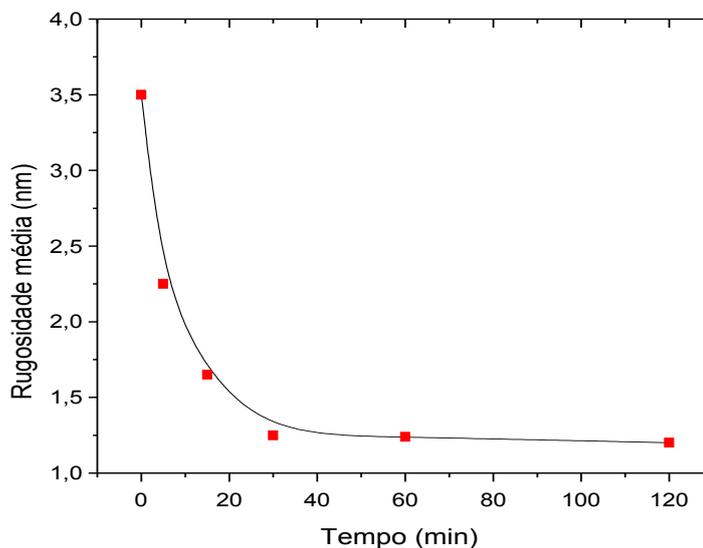


Figura 23. Rugosidade média das amostras de PS tratadas com N_2/H_2 em função do tempo de tratamento.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A fim de complementar as análises de AFM, foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de varredura para as amostras de PS. A Figura 24 apresenta imagens SEM para amostras sem tratamento e tratadas em plasma em diferentes tempos onde podemos visualizar algumas alterações topográficas da superfície dessas amostras.

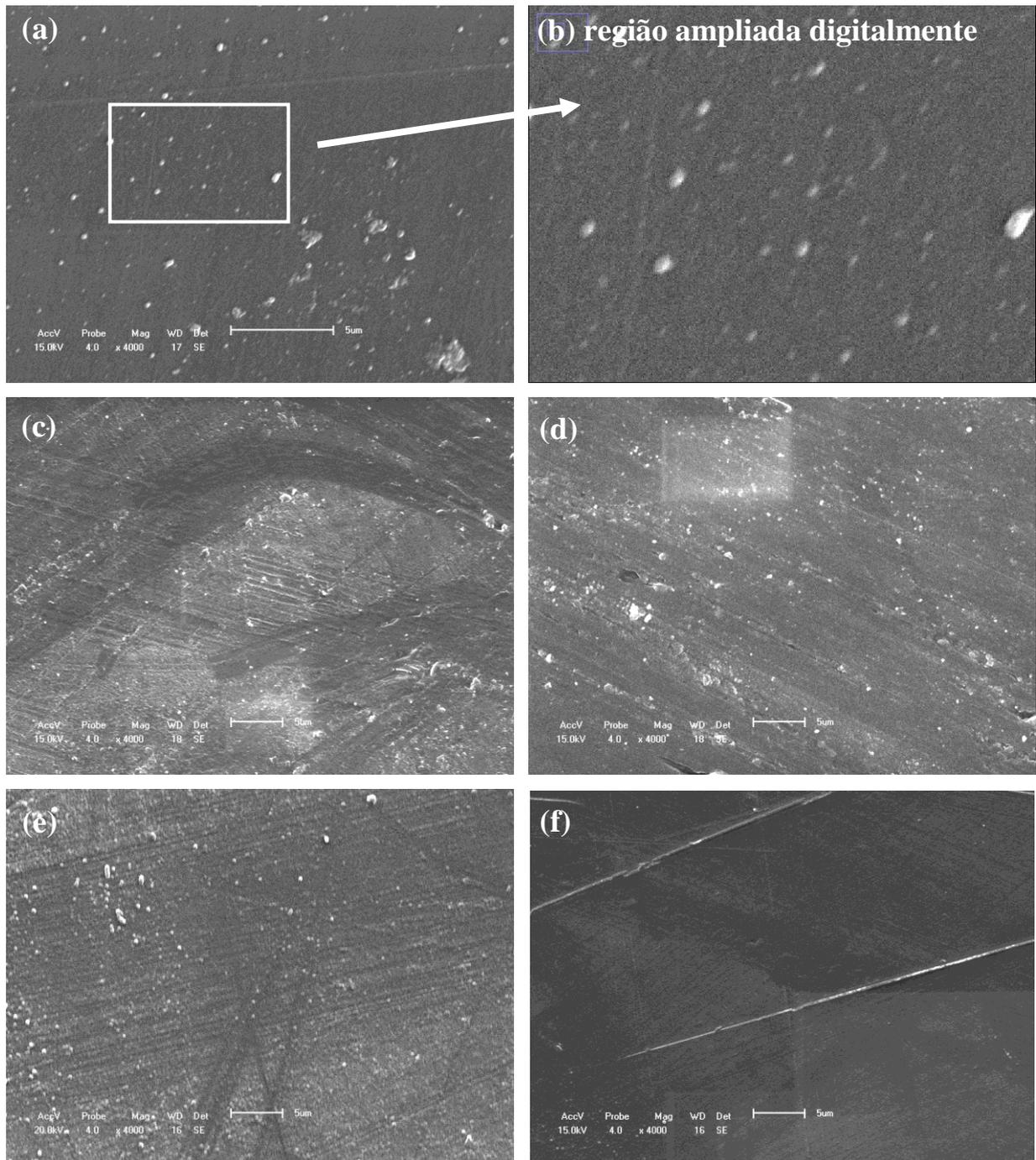


Figura 24. Imagem de SEM, (magnificação 4000x, escala 5µm), de amostras de PS tratadas com um mistura de N_2/H_2 por imersão em plasma em (a) e (b) 0 min, (c) 15 min, (d) 30 min, (e) 60 min e (f) 120 min.

As Figuras 24 (a) e (b) correspondem à amostra de PS sem tratamento, onde é possível observar em uma região ampliada, pequenos poços e protuberâncias de aspecto circular na superfície do material não visto nas demais imagens apresentadas. Eliminadas pelo tratamento

a plasma usado neste trabalho. Tais poços/protuberâncias são provavelmente provenientes da fabricação das placas de microtitulação originados do processo de descarga corona utilizado pelo fabricante, o que justifica a elevada rugosidade inicial da amostra sem tratamento comparada à rugosidade das amostras tratadas. Em estudo recente, Vesel (2010) modificou a superfície de poliestireno incorporando oxigênio à superfície por plasma de oxigênio, constatando que a rugosidade aumentava com o tempo de exposição [26].

Na sequência das figuras, observa-se uma modificação significativa da morfologia superficial das amostras com o aumento do tempo de tratamento após 15 min (c), 30 min (c), 60 min (e) e 120 min (f). Nestas imagens, surge a presença de ranhuras em diferentes direções aleatórias na superfície do material, compatíveis com as elevações colunares e vales observadas em algumas imagens de AFM da Figura 22. Já a redução da rugosidade pode estar relacionada ao próprio tratamento a plasma usado neste trabalho (incorporação de nitrogênio e erosão da superfície), reduzindo o efeito topográfico causado pelo tratamento corona efetuado pelo fabricante. Em nenhum momento foram observadas trincas e fissuras na superfície das amostras devido ao tratamento em plasma de N_2/H_2 .

4.3 Avaliação da Hidrofilicidade da Superfície-Ângulo de Contato (WCA)

Sabe-se que a molhabilidade superficial ou hidrofilicidade da superfície depende essencialmente da composição química da superfície [26]. Deste modo, a medida do ângulo de contato pode ser útil para avaliar o tratamento realizado na superfície do material. Para a medida de ângulo de contato com água (WCA), a Figura 25 apresenta os resultados para as amostras de poliestireno como função do tempo de tratamento.

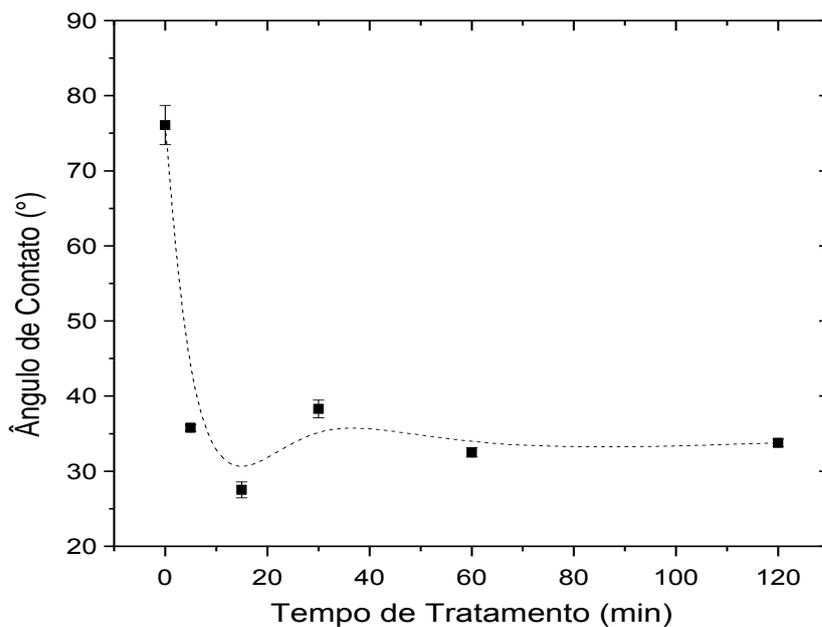


Figura 25. Medida de ângulo de contato com água em ($^{\circ}$), em função do tempo de tratamento em (min).

As medidas de ângulo de contato indicam que com o aumento do tempo de tratamento por imersão em plasma evidencia-se uma diminuição do ângulo de contato, ou seja, a gota de água apresenta uma maior interação com a superfície da amostra, isso ocorre devido a um aumento do caráter hidrofílico da superfície. O aumento da hidrofílicidade pode ser devido ao aumento da incorporação de nitrogênio e a formação de grupos amina e amida, esses grupos formam ligações de hidrogênio com a água, o que cria um maior caráter polar à superfície. De acordo com a literatura Vacheethasane et al. (1998) [33], demonstraram que a *S. epidermidis* é altamente hidrofóbica, o que indica que o resultado encontrado está de acordo com o nosso entendimento ao retardo da adesão da *S. epidermidis* a superfície tratada de PS. A Figura 26 apresenta a fotografia da gota de água sobre a superfície do poliestireno de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min.

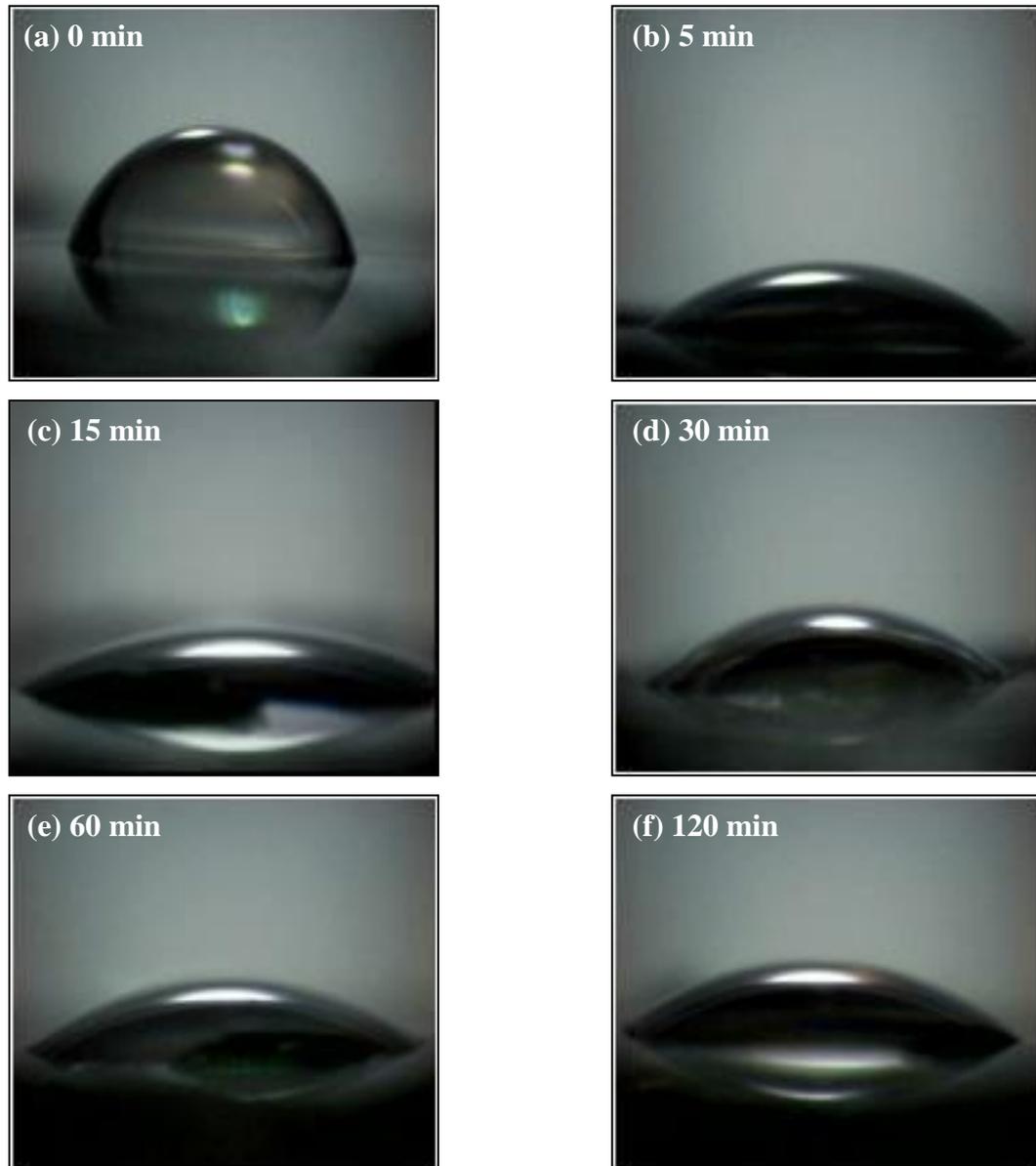


Figura 26. Amostras de poliestireno (a) sem tratamento e tratadas a plasma com N_2/H_2 em (b) 5 min, (c) 15 min, (d) 30 min, (e) 60 min e (f) 120 min.

Segundo Vesel (2010) geralmente a diminuição do ângulo de contato é devido à incorporação de novas funcionalidades polares na superfície da amostra. No entanto, a mudança da hidrofobicidade da superfície pode também ser atribuída a outros efeitos, como a carga superficial, a rugosidade, além de mudanças na estrutura química [26]. Neste caso a diminuição do ângulo de contato pode ocorrer pelo fato de incorporação de íons de nitrogênio

e formação de grupos amina e amida a superfície de PS conforme observado na análise das amostras pelas técnicas de XPS e ATR-IR.

4.4 Avaliação de Adesão Bacteriana

Os resultados dos testes de adesão para o biofilme bacteriano formado pela *S. epidermidis* no PS, em função do tempo de tratamento a plasma com N_2/H_2 é apresentado na Figura 27. Para tempos de tratamento variando de 5 a 30 min, uma redução gradual na adesão de biofilme foi observada, chegando a 20 % em relação ao controle. No entanto, quando o tratamento foi realizado durante 60 min, verificou-se uma redução de 93 %; e aumentando o tempo de tratamento para 120 min, a redução foi de 97 %. Na Figura 28 estão apresentadas imagens das placas de PS com 96 poços após os ensaios de adesão de biofilme bacteriano, amostras controle de 5 a 120 min e amostras tratadas em plasma com N_2/H_2 de 5 a 120 min. A diferença na intensidade da cor azul entre as amostras é diretamente relacionada ao número de bactérias aderidas à superfície de PS formando um biofilme.

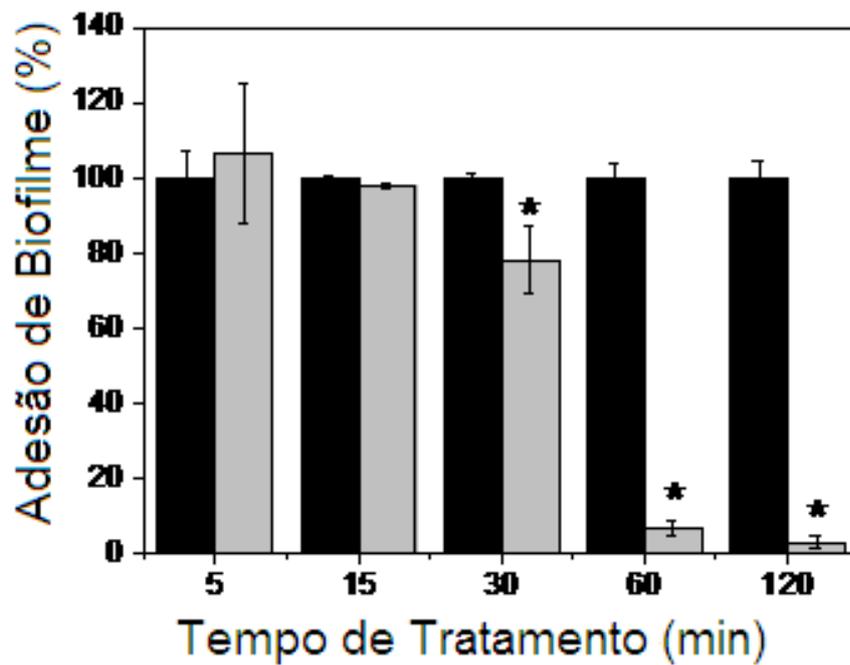


Figura 27. Adesão de biofilme, produzido pela *S. epidermidis*, na superfície da amostra. Barras pretas representam amostras controle e barras cinza representam amostras tratadas com N₂/H₂ em função do tempo de tratamento em plasma. (*) representa diferença significativa em relação às amostras controle em cada tempo (t-test, $p < 0,005$).

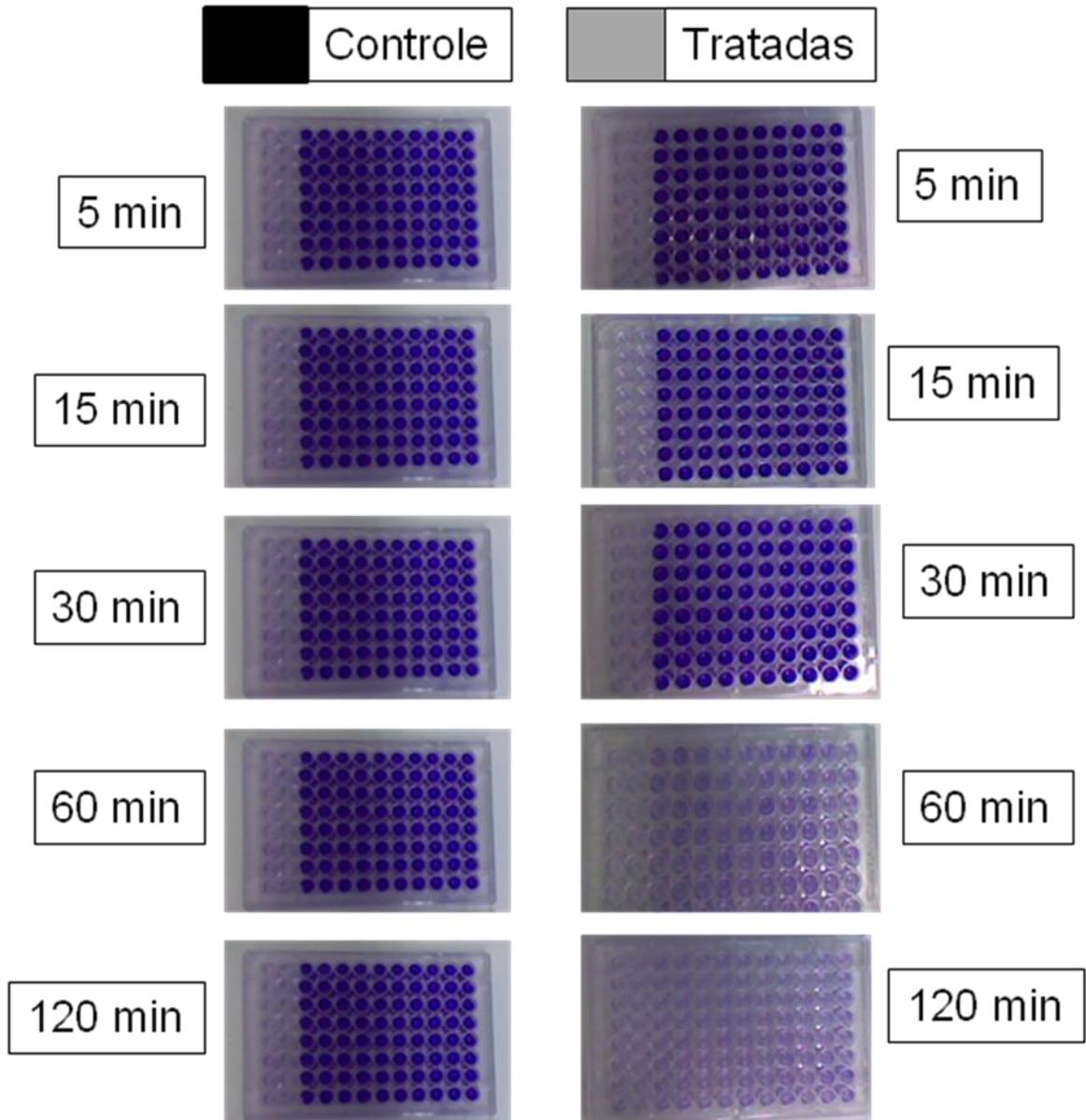


Figura 28. Amostras submetidas somente ao fluxo de N_2/H_2 (controle) de 5 a 120 min e amostras submetidas ao fluxo de N_2/H_2 e tratadas em plasma de 5 a 120 min.

De acordo com os resultados de adesão de biofilme bacteriano (Figura 27), a redução significativa mostrada nestes valores para os tempos de 60 e 120 min esta associada ao aumento da concentração de N na superfície do PS (Figura 16), a formação de grupos amina e amida observados pelas técnicas de XPS (Figura 15 (B)) e ATR-IR (Figura 21). E, a concentração de saturação de N na superfície do PS é aparentemente suficientemente alta para permitir a inibição da adesão inicial do biofilme.

Quanto à adesão do biofilme *S. epidermidis*, como citado anteriormente acredita-se que essa consiste em duas etapas básicas [17, 34]: adesão bacteriana à superfície (ligação primária), seguido de formação de biofilme real (acúmulo de bactérias). Embora os dados na Figura 27 evidenciem claramente uma forte supressão na adesão de biofilme sobre superfícies tratadas em plasma, não indica se isto é devido à inibição da fixação primária ou ao acúmulo de bactérias. Os ensaios antibacterianos descritos no item 3.4 “2º parágrafo” revelaram que as amostras de controle e as submetidas a tratamento a plasma por 120 min apresentam alterações semelhantes em medida de (OD₆₀₀) e cor-de-rosa no ensaio resazurina, indicando assim a viabilidade das células bacterianas. Portanto, o tratamento a plasma está inibindo a adesão bacteriana, não o seu crescimento.

Paynter, R.W. [46] relatou em seus estudos que superfícies de polímeros podem sofrer alterações com o tempo após o tratamento a plasma, ou seja, com o envelhecimento a temperatura ambiente. Dessa forma, amostras tratadas em plasma com N₂/H₂ por 120 min, foram deixadas em temperatura ambiente por períodos diferentes, e testou-se a inibição da adesão bacteriana de *S. epidermidis*. A Figura 29 apresenta inibição da adesão de biofilme de PS tratado com N₂/H₂ por 120 min em função do tempo (dias) após o tratamento.

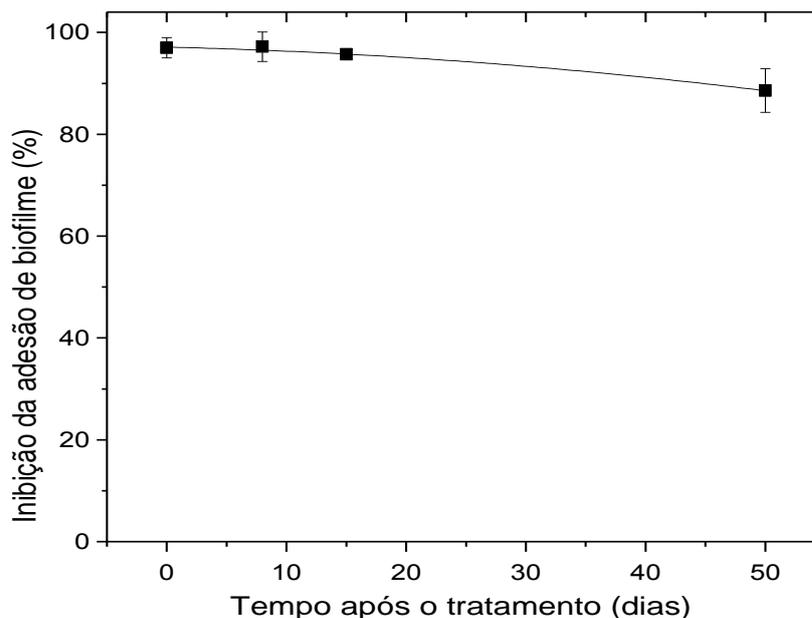


Figura 29. Inibição da adesão de biofilme em PS tratado em plasma com N₂/H₂ por 120 min em função do tempo após o tratamento (0, 8, 15 e 50 dias).

Os resultados apresentados na Figura 28 mostram que não houve muita diferença na adesão de biofilme observada até um máximo de 15 dias (95,7 % de supressão de biofilme). Mesmo 50 dias após o tratamento a plasma, não houve diferença significativa e ainda foi alcançado 88,6 % de supressão de biofilme. O efeito do envelhecimento é geralmente observado para superfícies tratadas em oxigênio, como o nosso substrato original de PS. A estabilidade das amostras, possivelmente é devido ao fato de que os grupos funcionais que contém nitrogênio, como C-N e C=N, apresentarem menor reatividade do que aqueles que contém oxigênio, tais como C-O e C=O.

CAPÍTULO V

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como proposta, investigar o efeito do processo de tratamento por imersão em plasma de radiofrequência, utilizando uma mistura padrão de N₂/H₂ (24 % : 76 %), em amostras de poliestireno como função do tempo de tratamento. Avaliando, as modificações superficiais geradas e a eficiência do processo, na adesão e crescimento de biofilme, produzido pela bactéria *S. epidermidis*, na superfície de PS.

As amostras foram caracterizadas por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), espectroscopia no infravermelho por reflexão total atenuada (ATR-IR), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (SEM), ângulo de contato com água (WCA) e ensaio de antibiofilme bacteriano. A partir da caracterização por XPS foi identificado grupos funcionais como: C-N, C=N, O=C-N, etc, além da ligação C-C na estrutura de PS, também foi constatado um aumento do conteúdo de nitrogênio com o aumento do tempo de tratamento. Por ATR-IR foi possível identificar os mesmos grupos com a presença de N e a indicação de formação de amins e amidas na região do espectro de infravermelho entre 3600-3100 cm⁻¹. Pela análise da morfologia e textura superficial por SEM e AFM, foi possível observar uma mudança na topografia e uma redução da rugosidade superficial com o tempo. Por medida de ângulo de contato com água foi verificado um aumento do caráter hidrofílico na superfície.

Pelo ensaio de antibiofilme bacteriano foi constatado que o tratamento de imersão em plasma está inibindo a adesão bacteriana, mas não o crescimento. Além disso, foi observado 93 % de supressão de adesão de biofilme durante 60 min de tratamento quando, a porcentagem atômica de nitrogênio era de 5 at.% e foi alcançado 97 % de supressão de

biofilme durante 120 min de tratamento quando, a porcentagem de N era de 7 at.%. Este efeito manteve-se em 88,6 % após 50 dias de envelhecimento em atmosfera ambiente.

Portanto, pode-se inferir que provavelmente a quantidade de nitrogênio introduzida pelo tratamento de imersão em plasma, juntamente com a formação de grupos polares como aminas e amidas na superfície do poliestireno, podem conduzir o desempenho apresentado contra a adesão de biofilme, produzido pela *S. epidermidis*, à superfície, sobretudo pelo fato desta bactéria ser hidrofóbica. Desse modo, foi possível aplicar um processo amplamente usado em engenharia de materiais, na redução de possíveis efeitos relacionados à contaminação biológica de dispositivos biocompatíveis. Que, associado a tecnologias antibactericidas, possa contribuir para redução de infecções causadas pela bactéria *Staphylococcus epidermidis*.

CAPÍTULO VI

6 REFERÊNCIAS

- [1] Rossini, P., Colpo, P., Ceccone, G., Jandt, K. D., Rossi, F., *Surfaces engineering of polymeric films for biomedical applications*. **Materials Science and Engineering**, 23: p. 353-358. 2003.
- [2] Chu, P. K., Chen, J.Y., Wang, L.P., Huang, N., *Plasma-surface modification of biomaterials*. **Materials Science and Engineering**, 36: p. 143-206. 2002.
- [3] Chan, C. -M., Ko, T. -M., Hiraoka, H., *Polymer surface modification by plasmas and photons*. **Surface Science Reports**, 24: p. 1-54. 1996.
- [4] Gray, J. E., Norton, P. R., Griffiths, K., *Surface modification of a biomedical poly(ether)urethane by a remote air plasma*. **Applied Surface Science**, 217: p. 210-222. 2003.
- [5] Ratner, B. D., Bryant, S. J., *Biomaterials: Where we have been and where we are going*. **Annu Rev Biomed Eng**, 6: p. 41-75. 2004.
- [6] Seal, B. L., Otero, T. C. Panitch, A., *Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration*. **Mater Sci Eng Rep**, 34: p. 147-230. 2001.
- [7] Wnag, H., Kwok, D. T. K., Wang, W., Wu, Z., Tong, L., Zhan, Y., Chu, P. K., *Osteoblast behaviour on polytetrafluorosthylene modified by long pulse high frequency oxygen plasma immersion ion implantation*. **Biomaterials**, 31: p. 419-431. 2010.
- [8] Hsu, S., Chen W., *Improved cell adhseion by plasma-induced grafting of L-lactide onto polyurethane surface*. **Biomaterials**, 21: p. 359-367. 2000.
- [9] Fray, M. E., Prowans, P., Puskas, J. E., Altstädt, V., *Biocompatibility and fatigue properties of polystyrene-polyisobutylene-Polysytyrene, an emerging thermoplastic elastometric biomaterial*. **Biomacromolecules**, 7: p. 844-850. 2006.

-
- [10] George, P. A., Donose, B. C., Cooper-White, J. J., *Self-assembling polystyrene-block-poly(ethylene oxide) copolymer surface coatings : Resistance to protein and cell adhesion. **Biomaterials***, 30: p. 2449-2456. 2009.
- [11] Lim, J. Y., Hansen, J. C., Siedlecki, C. A., Henstebeck, R. W., Cheng, J., Winograd, N., Donahue, H. J., *Osteoblast adhesion on Poly(L-lactic Acid)/Polystyrene Demixed Thin film Blends: Effect of Nanotopography, Surface Chemistry, and Wettability. **Biomacromolecules***, 6: p. 3319-3327. 2005.
- [12] Ih-Houng, L., S.D., *Plasma surface modification in biomedical applications. **AST Technical Journal***.
- [13] Nihlstrand, A., Johansson, T. H., *Plasma treatment of polyolefins: Influence of material composition: 1. Bulk and surface characterization. **Polymer***, 38: p. 3581-3589. 1997.
- [14] Vuong, C., Otto, M., *Staphylococcus epidermidis infections. **Microbes and Infection***, 4: p. 481-489. 2002.
- [15] O’Gara, J. P., Humphreys, H., *Staphylococcus epidermis biofilms: importance and implications. **J Med Microbiol***, 50: p. 582-587. 2001.
- [16] Park, J. B., Bronzino, J. D., *Biomaterials / Principles and Applications. **CRC Press***, 2003.
- [17] Lichter, J. A., Van Vliet, K. J., Rubner, M. F., *Design of antiacetal surfaces and interfaces: Polyelectrolyte multilayers as a multifunctional platform. **Macromolecules***, 42: p. 8573-8586. 2009.
- [18] Clough, R. L., *High-energy radiation and polymers: A review of commercial processes and emerging applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B***, 185: p. 8-33. 2001.
- [19] Guruvenket, S., Rao, G. M., Komath, M., Raichur, A. M., *Plasma surface modification of polystyrene and polyethylene. **Applied Surface Science***, 236: p. 278-284. 2004.

-
- [20] Characklis, W. G., Cooksey, K. E., *Biofilm and microbial fouling*. **Adv. Applied Microbiology**, 29: p. 93-137. 1983.
- [21] Soares, M. R. F., Estudo de difusão de impurezas introduzidas por implantação iônica em polímeros, Instituto de Física, 2003. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.
- [22] Miller, F. A., Mayo, D.W., Hannah, R.W., *Course notes on the interpretation of infrared and raman spect.* Publicado por John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.
- [23] Bruice, P. Y., Química Orgânica. Quarta edição, volume 2, São Paulo – SP: Pearson Prentice Hall, 2006.
- [24] Petrat, F. M., Wolany, D., Schewede, B. C., Wiedmann, L., Benninghoven, A., *In situ ToF-SIMS/XPS Investigation of Nitrogen Plasma-Modified Polystyrene Surfaces*. **Surface and Interface Analysis**, 21: p. 274-282. 1994.
- [25] Paynter, R. W., *XPS studies of the modification of polystyrene and polyethylenetephtalate surfaces by oxygen and nitrogen plasmas*. **Surface and Interface Analysis**, 26: p. 674-681.1998.
- [26] Vesel, A., *Modification of polystyrene with a highly reactive cold oxygen plasma*. **Surface & Coatings Technology**, 205: p. 490-497. 2010.
- [27] Toole, G.O', Kaplan, H. B., Kolter, R., *Biofilm formation as microbial development*. **Annu. Rev. Microbiol**, 54: p. 49-79. 2000.
- [28] Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R., *Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces*. **Journal of General Microbiology**, 68: p. 337-348. 1971.
- [29] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Brock Biology of Microorganisms. Ninth edition, Southern Illinois University Carbondale, Prentice Hall Upper Saddle River, NJ 07458.

-
- [30] Duddridge, J. E., Pritchard, A. M., *Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces. Proceeding of the conference on microbial corrosion teddington*, p. 28-35. 1983.
- [31] López, D., Vlamakis, H., Kolter, R., *Biofilms. Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010.
- [32] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., *Microbiologia de Broch. Décima Edição*, São Paulo – SP: Prentice Hall, 2004.
- [33] Vacheethasanee, K., et al., *Bacterial surface properties of clinically isolated Staphylococcus epidermidis strains determine adhesion on polyethylene. Journal of Biomedical Materials Research*, 42: p. 425-432. 1998.
- [34] Mack, D., *Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation. Journal of Hospital Infection*, 43: p. S113-S125. 1999.
- [35] Otto, M., *Staphylococcus epidermidis – the ‘accidental’ pathogen. Nature Reviews Microbiology*, 7: p. 555-567. 2009.
- [36] Soares, G. V., *Propriedades físico-químicas e características elétricas de estruturas dielétrico/SiC*, Instituto de Física – Escola de Engenharia – Instituto de Química - Instituto de Informática. 2008, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.
- [37] Walzak, M. J., Davidson, R., Biesinger, M., *The Use of XPS, FTIR, SEM/EDX, Contact Angle, and AFM in the Characterization of Coatings. Journal of Materials Engineering and Performance*, 7: p. 317-323. 1998.
- [38] Echeverrigaray, S. G., *Processamento reativo de nanocompósitos iPP-POSS*, Programa de Pós-Graduação em Materiais. 2009. Univerisidade de Caxias do Sul: Caxias do Sul.
- [39] Silverstein, R. M.; Webster, F. X., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Sexta Edição, Rio de Janeiro – RJ: LTC – Livros Técnicos e Científicos S.A., 2000.
- [40] Canevarolo Jr, S. V., *Técnicas de Caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2004.

-
- [41] Kauling, A. P., *Modificação da Superfície do Polipropileno por Imersão em Plasma de Baixa Energia*. Programa de Pós-Graduação em Materiais. 2009. Universidade de Caxias do Sul: Caxias do Sul.
- [42] Maliska, A. M., Apostila de Microscopia Eletrônica de Varredura. Laboratório de Materiais – LabMat, Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens – LCMAI, Departamento de Engenharia Mecânica – EMC, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.
- [43] Good, R. J., *Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review*. **Journal of Adhesion Science and Technology**, 6: p. 1269-1302. 1992.
- [44] Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., Ruzicka, F.A., *Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci*. **Acta Pathologica, Microbiológica et Immunológica Scandinavica**, 115: p. 891-899. 2007.
- [45] Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y., *Microtiter plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as a indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals*. **Methods**, 42: p. 321-324. 2007.
- [46] Paynter, R.W., *XPS studies of the aging of plasma-treated polymer surfaces*. **Surface and Interface Analysis**, 29: p. 56-64. 2000.
- [47] Netcheva, S., Bertrand, P., *Surface topography development of thin polystyrene films under low energy ion irradiation*. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Sections B: Interactions with Materials and Atoms**, 151: p. 129-134. 1999.
- [48] Briggs, D., *Surface analysis of polymers by XPS and Static SIMS*. **Cambridge Solid State Science Series**. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press. 1998.
- [49] Idage, S. B., Badrinarayanan, S., *Surface Modification of polystyrene using nitrogen plasma. An X-ray photoelectron spectroscopy study*. **Lamguir**, 14: p. 2780-2785. 1998.