

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Daniela Rubio Baltazar

Funcionalização do pericárdio bovino por plasma frio e análise de seu potencial
como um biomaterial

Uberaba

2018

Daniela Rubio Baltazar

Funcionalização do pericárdio bovino por plasma frio e análise de seu potencial como um biomaterial

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação Programa Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração “Materiais Aplicados em Biociências”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Lenaldo Branco Rocha

Uberaba

2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

B158f Baltazar, Daniela Rubio
Funcionalização do pericárdio bovino por plasma frio e análise de
seu potencial como um biomaterial / Daniela Rubio Baltazar. -- 2018.
51 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Biociências Aplicadas)
-- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018
Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha

1. Colágeno. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Plasma. 4. Pericárdio.
5. Bovinos. 6. Teste de Materiais. I. Rocha, Lenaldo Branco. II. Univer-
sidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 547.962.9

DANIELA RUBIO BALTAZAR

Funcionalização do pericárdio bovino por plasma frio e análise de seu potencial como um biomaterial

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração - Materiais Aplicados em Biociências, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

21 de novembro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogério Valentim Gelamo
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.ª Dr.ª Ana Cristina de Souza
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto
Universidade de Uberaba

Dedico este trabalho ao meu esposo, amor da minha vida e fonte de força e coragem, e aos meus pais, que me apoiam incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem uma série de pessoas. Meu marido lindo, fonte de amor e confiança, minha família, em especial meus pais, sempre me apoiando e aconselhando, minha avó Conceição e tias Zô e Lurdes que intercedem por mim a Deus e Nossa Senhora aqui da Terra e minha vó Mira, minha linha direta no Céu, sempre intercedendo e cuidando de mim. Meu orientador Lenaldo, que aceitou me orientar e fez isso de maneira formidável, os professores que muito me auxiliaram nesse projeto, Rogério, Ricardo, Odonório, Ana, aos técnicos que sempre se colocaram à disposição, sempre extremamente competentes e amigáveis, Alberto, Vandaír e Sonia da Patologia e Flávio, Thaíla, Rheltheer e Geraldo e especialmente ao Fernando, secretário do programa de pós-graduação que sempre resolveu prontamente todas os problemas trazidos por mim, mesmo que as cinco da tarde! Obrigada a todos de coração. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Some believe it is only great power that can hold evil in check, but that is not what I have found. It is the small everyday deeds of ordinary folk that keep the darkness at bay. Small acts of kindness and love.”
– J. R. R. Tolkien, *The Hobbit*.

RESUMO

O colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos, sendo o tipo I a forma prevalente. Essa proteína possui propriedades interessantes, como baixa imunogenicidade e toxicidade, biocompatibilidade, além de promover o reconhecimento, adesão e diferenciação celular através de sequências RGD (arginina-glicina-aspartato). Por isso, o colágeno é utilizado na composição de diversos biomateriais. Contudo, após a implantação *in vivo*, a degradação do material por colagenases endógenas pode ocorrer rapidamente, limitando sua utilização. A funcionalização com plasma frio pode superar essa limitação, sendo capaz de adicionar uniformemente grupos funcionais na superfície de materiais e ser modulada para preservar ou alterar de maneira seletiva as propriedades do material. Este estudo buscou funcionalizar o pericárdio bovino (PB) – composto principalmente por colágeno tipo I – utilizando plasma frio a fim de obter um novo biomaterial. Para isso, amostras de PB foram tratadas com plasma de argônio e CO₂ a 2,45GHz e 500 W em um intervalo tempo desde 0s (PBCT) a 240s (PB240) com incrementos de 30s. As amostras foram analisadas por espectroscopia de infravermelho e a validação da análise foi realizada através de modelagem molecular computacional. O material foi caracterizado por microscopia óptica e eletrônica de varredura, ângulo de contato e capacidade higroscópica. A biocompatibilidade do PB tratado foi verificada pela implantação do material na camada subcutânea de camundongos Balb/c durante 3, 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que as modificações causadas pelo tratamento com plasma foram tempo dependente. Após 120s de tratamento (PB120) houve a adição de grupos éster na forma de ligações *crosslink* sem alterações à estrutura proteica. Entretanto, após 150s foi observado o início de um processo de *etching* e degradação do colágeno, acentuado aos 240s. Além disso, o tratamento provocou um aumento na hidrofobicidade da superfície do material. A implantação subcutânea mostrou que não houve perda na biocompatibilidade dos grupos tratados quando comparado ao controle. Dessa forma, verificou-se que o tratamento com plasma pode ser modulado para modificar o colágeno sem que haja perdas em suas propriedades de interesse. Novos estudos são necessários para a adequação da funcionalização com plasma, direcionando-a para modificações desejadas e aplicações específicas do biomaterial.

Palavras chave: *Biocompatibilidade; biomaterial; colágeno; plasma frio.*

ABSTRACT

Collagen is the most commonly found protein in mammals and Type I is its most prevalent type. This protein shows interesting properties as low immunogenicity and toxicity, biocompatibility, besides the ability to promote cell recognition, differentiation and induce cell attachment through RGD (arginine-glycine-aspartate) sequences. Due to these characteristics, collagen is used in many biomaterials. However, after *in vivo* implantation, the degradation of the material by endogenous collagenases can occur too soon, impairing its application. Cold plasma functionalization can overcome this limitation; it is able to add evenly new functional groups on materials' surfaces and can be tailored to preserve or alter selectively the bulk properties of the material. Therefore, this study aimed the functionalization of bovine pericardium (PB) – material composed of collagen type I – using cold plasma in order to obtain a new biomaterial. PB was treated with argon (Ar) and carbon dioxide (CO₂), microwave power source 2.45Hz, 500 W. The treatment was carried out from 0 (PBCT) up to 240s (PB240), with a 30s increment. The samples were analysed by FTIR-ATR and the analysis validation was done through computing molecular modelling. The material was characterized by optical microscopy, SEM, contact angle and swelling. PB biocompatibility was assessed through subcutaneous implantation of the material in mice Balb/c for 3, 7, 15 and 30 days. The results indicated the changes caused by plasma treatment were time-dependent. By 120s of treatment (PB120) ester groups were added in the material, forming crosslink bonds without modification within the protein structure while 150s of treatment caused the beginning of an etching process and collagen degradation, which was more distinct at 240s; there was also an increase in the hydrophobicity on the surface of the treated material. The subcutaneous implantation test showed there wasn't biocompatibility loss of treated PB when compared to control. Therefore, it was verified that plasma treatment can be tailored to modify collagen without impairing its properties of interest. New studies are necessary to suit plasma functionalization according the desired modifications and specific applications of the biomaterial

Key words: *Biomaterial, biocompatibility; collagen; cold plasma.*

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FONTE DE PLASMA _____	26
Fig. 2 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PB IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS. _____	30
Fig. 3 ESPECTROS FTIR – ANÁLISE DA SUPERFÍCIE TRATADA COM PLASMA. _____	34
Fig. 4 ESPECTROS FTIR – ANÁLISE DA SUPERFÍCIE NÃO TRATADA COM PLASMA. _____	35
Fig. 5 ESPECTROS FTIR – ANÁLISE DA PARTE INTERIOR DA AMOSTRA DE PB. _____	36
Fig. 6 MODELO DE COLÁGENO _____	39
Fig. 7 MODELO DE COLÁGENO EDITADO E FUNCIONALIZADO COM GRUPOS ÉSTER. _____	39
Fig. 8 ESPECTRO TEÓRICO VERSUS ESPECTRO EXPERIMENTAL. _____	40
Fig. 9 VISUALIZAÇÃO DA MICROESTRUTURA DO PERICÁRDIO BOVINO TRATADO COM PLASMA POR DE MICROSCOPIA ÓPTICA _____	42
Fig. 10 VISUALIZAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DO PERICÁRDIO BOVINO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. _____	43
Fig. 11 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE ATRAVÉS DE IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA EM CAMUNDONGOS. _____	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: FUNCIONALIZAÇÃO DE PERICÁRDIO BOVINO COM PLASMA FRIO DE AR E CO ₂ . O GRUPO CONTROLE (PBCT) NÃO FOI TRATADO COM O PLASMA.	26
TABELA 2: DIVISÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS PARA O TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE ATRAVÉS DA IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA.	31
TABELA 3: ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS DE INFRAVERMELHO DE ACORDO COM A LITERATURA	37
TABELA 4: RAZÃO A ABSORBÂNCIA DOS PICOS 1235 cm ⁻¹ E 1450 cm ⁻¹	38
TABELA 5: ABSORÇÃO DE ÁGUA APÓS 48H E MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO DA ÁGUA COM A SUPERFÍCIE DO MATERIAL.	45

LISTA DE SÍMBOLOS ABREVIATURAS

δ	Tesoura
ν	Estiramentos
ρ	Rotação
ω	Balanço
τ	Torção
γ_{sl}	Tensão sólido-líquido
γ_{sv}	Tensão sólido-vapor
μm	Micrômetros
Å	Ângstron
a.a.	Aminoácidos
Ar	Argônio
ATR	Refletância total atenuada
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (Ovário de hamster chinês)
COOH	Carboxila
dH ₂ O	Água deionizada
ESB	Sociedade Europeia de Biomateriais
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
Gly	Glicina
H&E	Hematoxilina e eosina
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1- β
Kv	Quilovolt
MEC	Matrix extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
nm	Nanômetros
OH	Hidroxila
PB	Pericárdio bovino
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PDB	Protein Data Bank
PDB ID	Identificação no <i>Protein Data Bank</i>

PECVD	<i>Plasma-enhanced chemical vapor deposition</i>
RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
SD	Desvio padrão
SW	Absorção de água
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
W_d	Peso seco
W_s	Peso úmido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVO GERAL	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
1.3	JUSTIFICATIVA	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	REPARO TECIDUAL	18
2.2	BIOMATERIAIS	18
2.3	COLÁGENO	20
2.4	COLÁGENO MODIFICADO	21
2.5	FUNCIONALIZAÇÃO POR PLASMA FRIO	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	AMOSTRAS DE PERICÁRDIO BOVINO	25
3.2	TRATAMENTO COM PLASMA	25
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL	26
3.3.1	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR)	26
3.3.2	MODELAGEM MOLECULAR COMPUTACIONAL	27
3.3.3	MICROSCOPIA ÓPTICA	28
3.3.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	28
3.3.5	MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO	28
3.3.6	CAPACIDADE HIGROSCÓPICA	29
3.4	ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE	30
3.4.1	IMPLANTAÇÃO EM ANIMAIS	30
3.4.2	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE HISTOLÓGICA	31
3.4.3	ANÁLISE DE DADOS	31

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR)	32
4.2	MODELAGEM MOLECULAR COMPUTACIONAL	38
4.3	MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA	41
4.4	CAPACIDADE HIGROSCÓPICA E ÂNGULO DE CONTATO	44
4.5	BIOCOMPATIBILIDADE	45
5	CONCLUSÃO	48
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população durante as últimas décadas teve como consequência o aumento de lesões e doenças ósseas em idosos, devido a redução da capacidade de regeneração óssea dessa faixa etária (RAMÍREZ-GLINDON; LLEDÓ-GIL, 2010).

Nos últimos cinquenta anos, as ciências dos materiais têm investigado diferentes tipos de biomateriais e suas aplicações para substituir ou restaurar a função de tecidos e órgãos comprometidos ou degenerados. Todo ano mais de e13 milhões de próteses e dispositivos médicos são implantados somente nos EUA (MINATI et al., 2017).

Uma abordagem para o desenvolvimento de novos materiais que possuam características de interesse é através da modificação dos materiais já utilizados, afim de aprimorar suas propriedades químicas e mecânicas; desta forma, novos materiais podem ser desenvolvidos de forma rápida e economicamente viável.

O colágeno é a principal proteína do tecido conectivo e corresponde a cerca de 25% das proteínas totais em vertebrados. É presente na matriz extracelular e tem o papel de fornecer força, resistência a tração e promover adesão e diferenciação celular. Devido às suas funções, abundância na natureza, bem como o fato de o colágeno ser degradado quando implantado, essa proteína é utilizada na composição de diversos biomateriais (STENZEL; MIYATA; RUBIN, 1974). O colágeno pode ser modificado por métodos químicos e físicos a fim de melhorar suas propriedades como biomaterial.

Um método de funcionalização de superfícies relativamente novo é a funcionalização com plasma frio. Plasma é gerado quando um campo elétrico é aplicado a um precursor gasoso neutro. Íons e elétrons presentes no gás são acelerados pelo campo elétrico e colidem com moléculas neutras gerando novas moléculas carregadas (MINATI et al., 2017) que irão interagir com a superfície do material a ser tratado. O tratamento com plasma é um método rápido e economicamente viável de funcionalizar materiais e apresenta como grandes vantagens frente aos tratamentos químicos e físicos o fato de poder ser amplamente modulado e não deixar resíduos químicos no material tratado. Desta forma, o tratamento com plasma frio é um método interessante para a funcionalização do colágeno, a fim de se obter um novo biomaterial.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho busca desenvolver e caracterizar um novo biomaterial pela da funcionalização do colágeno tipo I do pericárdio bovino com plasma frio de argônio e dióxido de carbono.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Analisar o efeito do tratamento com plasma na composição do PB utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).
- II. Validar os resultados da FTIR utilizando modelagem molecular computacional para criar um espectro infravermelho teórico e compará-lo com o espectro experimental.
- III. Caracterizar morfologicamente as amostras tratadas e não tratadas utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.
- IV. Caracterizar a umectabilidade das amostras utilizando a técnica de ângulo de contato.
- V. Verificar a biocompatibilidade do material tratado com plasma utilizando a técnica de implantação subcutânea em camundongos linhagem Balb/c.

1.3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho pode ser relevante, uma vez que a funcionalização do colágeno utilizando plasma pode melhorar as características mecânicas, químicas e biológicas do colágeno, enquanto mantém intactas as características desejáveis da molécula como biocompatibilidade, flexibilidade e resistência a tração, produzindo, portanto, um biomaterial potencialmente aplicável em tratamentos de reparo tecidual.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 REPARO TECIDUAL

Reparo tecidual e regeneração são processos fundamentais para manutenção da saúde (WYNN; VANNELLA, 2016). Doenças, feridas e traumas podem causar dano e perda em tecidos e órgãos no corpo humano, sendo necessárias intervenções para facilitar seu reparo, regeneração ou substituição (O'BRIEN, 2011). Este é um grande problema de saúde pública e representa aproximadamente metade do gasto anual do sistema de saúde dos Estados Unidos. As opções de tratamento incluem transplantes – podendo estes ser autólogos, advindos do próprio receptor, alogênicos, proveniente de doadores ou xenotransplantes, advindos de outras espécies – cirurgias e próteses artificiais (MOCHIZUKI et al., 2000).

Transplantes autólogos são considerados o padrão ouro quando há perda de tecidos (NAUTH et al., 2011); entretanto, essa técnica está limitada à disponibilidade de material que se pode retirar do paciente, bem como a alta morbidade e custo resultantes de um segundo sítio cirúrgico (STEVENS, 2008). Transplantes alogênicos e xenotransplantes podem transmitir patógenos e causar reações imunológicas indesejadas (METCALFE; FERGUSON, 2007; PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2010).

Desta forma, substitutos artificiais capazes de auxiliar o reparo tecidual tem sido desenvolvidos com o intuito de evitar reações adversas relacionadas ao uso de transplantes.

2.2 BIOMATERIAIS

Um biomaterial é um material natural e/ou sintético, que pode estar em contato íntimo com células vivas e fluidos biológicos, cujo objetivo é auxiliar ou substituir uma função no organismo (VOGLER, 1998). Um biomaterial pode ser classificado como inerte, induzindo mínima resposta tecidual, bioativo, que estimula o crescimento e adesão celular ou degradável, que dissolve com o tempo (MENZIES; JONES, 2010). Há diversos fatores a serem considerados ao se projetar um biomaterial, como toxicidade, sítio de implantação, tempo de exposição do material ao organismo e biocompatibilidade. Este último fator avalia a performance do biomaterial *in situ*, ou

seja, é a medida de sucesso da interação entre o biomaterial e o organismo resultando em uma função específica (VOGLER, 1998).

A matriz extracelular (MEC) tem a função de suporte para o tecido, além de fornecer sinais que definem comportamento celular e função tecidual (DONG; LV, 2016). Portanto, o desenvolvimento de materiais que mimetizem a MEC é uma abordagem racional (BAKHSHANDEH et al., 2017)

Um ponto chave para o reparo tecidual é um microambiente favorável, com suficientes sinais iniciadores da resposta inflamatória, porém, que não induzam uma resposta inflamatória exacerbada ou crônica ou ainda uma resposta alérgica (CHANGI et al., 2018). Desta forma, durante as últimas décadas houve uma mudança no conceito de biomateriais ideais, antes definidos como materiais inertes, para materiais capazes de causar uma resposta adequada no organismo (WILLIAMS, 2008).

A interação das células com o material depende, dentre outros fatores, das características da superfície do material, como carga, rigidez, rugosidade, porosidade e umectabilidade (KIM et al., 2007; LAMPIN; LEGRIS; DEGRANGE, 1996; LEE et al., 1997, LEE et al., 2013). A topografia do material influencia de maneira significativa a adesão, proliferação e diferenciação celular e reparo tecidual (TAYLOR; OLIVEIRA; MANO, 2012); a porosidade em matrizes 3D é importante para permitir a vascularização e difusão de nutrientes e gases (SADER et al., 2013), enquanto a maior rugosidade do material promove melhor adesão celular devido a maior área disponível (CHEN et al., 2017; RAFAT et al., 2007). LEE et al. (1997) analisou em seu estudo a adesão e proliferação celular de células de ovário CHO em polietileno carregado de forma gradiente com diferentes grupos funcionais; seu trabalho verificou melhores resultados em células cultivadas em superfícies carregadas positivamente com grupos amina, o que pode se dever a atração eletrostática de proteínas carregadas negativamente presentes no soro e membrana plasmática. Por outro lado, materiais carregados negativamente tiveram melhor desempenho na recuperação de defeitos ósseos quando comparados a materiais não carregados (MIGUEL et al., 2013; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002). O melhor desempenho de materiais carregados, seja positiva ou negativamente, pode estar relacionado não somente aos grupos funcionais em si, mas ao aumento da hidrofiliabilidade do material; estudos mostram que a melhor adesão e proliferação celular ocorrem em superfícies moderadamente hidrofílicas (KIM et al., 2007; TAMBURACI; TIHMINLIOGLU, 2017)

As características da superfície do material podem, portanto, ser projetadas para otimizar a interação célula-material conforme a aplicação desejada.

Uma abordagem eficiente e economicamente viável para desenvolvimento de novos biomateriais é a modificação de materiais já utilizados, a fim de aprimorar suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, resultando em materiais com melhor desempenho ou que possam ser utilizados para outras aplicações.

A matriz extracelular é formada majoritariamente por colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico. Esses componentes providenciam a estrutura de sustentação para outros compostos da MEC, bem como para células (MOUW; OU; WEAVER, 2014). Matrizes porosas tridimensionais tem sido desenvolvidas a partir de materiais naturais ou sintéticos a fim de mimetizar a MEC. O colágeno, sendo um dos principais componentes da matriz é um dos compostos utilizados para este propósito.

2.3 COLÁGENO

Colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos e representa cerca de 30% das proteínas totais e 90% da parte orgânica dos ossos (NIMNI et al., 1987), estando presente em todos os tecidos, principalmente na córnea, vasos sanguíneos, pele, cartilagem, tendões e ligamentos (WILLIAMS, 2008); o colágeno é responsável pela resistência à tração, flexibilidade e organização da matriz extra celular ou MEC (MOREIRA et al., 2004). O colágeno tipo I é a forma mais prevalente; a proteína é formada por duas cadeias polipeptídicas idênticas chamadas α_1 e uma cadeia polipeptídica α_2 , que diferencia-se da primeira por um resíduo de aminoácido; as três cadeias se unem para formar uma tripla hélice com 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Um pré-requisito para formação da tripla hélice é a ocorrência de um resíduo de glicina (Gly) a cada três aminoácidos, ou seja, as cadeias α são formadas pelo tripeptídeo Gly-X-Y, na qual X e Y são frequentemente prolina e hidroxiprolina, embora possam ser qualquer outro aminoácido, exceto cisteína e triptofano (RICH; CRICK, 1961).

Essa proteína apresenta propriedades interessantes, como baixa imunogenicidade, mesmo quando vindo de fontes heterólogas, devido ao seu alto grau de conservação entre espécies; baixa toxicidade; habilidade de promover reconhecimento e adesão de células através de sequências de arginina-glicina-

aspartato (sequências RGD) presentes na estrutura da proteína, além de estimular crescimento celular (PAIM et al., 2003).

Por ser uma proteína tão abundante, existem diversas fontes de obtenção de colágeno, sendo que as mais comuns são bovina e porcina, entretanto, a molécula também pode ser extraída de caudas de ratos, animais marinhos como peixes, esponjas e águas-vivas e podem ser sintetizadas por clonagem molecular (OLSEN et al., 2003; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

Devido à essas propriedades, o colágeno é amplamente utilizado no desenvolvimento de biomateriais, que podem ser estruturados em diversas formas, como membranas, filmes, matriz porosa, esponjas, géis e implantes sólidos (FRIESS, 1998a). Essa versatilidade torna os materiais a base de colágeno amplamente aplicáveis na área de reparo tecidual. Seu emprego abrange os campos médico, dental e farmacológico; dentre suas aplicações, estão sua utilização como membrana de barreira na forma de filmes; curativos para queimaduras, feridas crônicas e úlceras na forma de esponjas, cuja, função é absorver exsudato e formar uma barreira primária contra patógenos; hidrogéis injetáveis para usos oftalmológicos, *pallets* carreadores de drogas, pele artificial, enxertos ósseos e implantes dentários (KHAN; KHAN, 2013; SIONKOWSKA; KOZŁOWSKA, 2013).

A utilização do colágeno como biomaterial é uma escolha racional. Entretanto em alguns casos, após a implantação *in vivo*, sua biodegradação por collagenases endógenas e bioabsorção ocorrem antes que ele cumpra sua a função no organismo (ARYON; BARBOSA, 2013; SAMOUILLAN et al., 2012). Portanto, materiais derivados do colágeno podem passar por algumas modificações através de tratamentos físicos ou químicos afim de melhorar suas propriedades bioquímicas e mecânicas.

2.4 COLÁGENO MODIFICADO

A principal modificação realizada para melhorar a estabilidade do colágeno *in vivo* é aumentando a reticulação ou ligações *crosslinks* da proteína. *Crosslinks* são ligações intermoleculares presentes na fibra do colágeno. Quanto maior o número de *crosslinks*, maior resistência mecânica e estabilidade da proteína (CEN et al., 2008). Ligações *crosslink* podem ser induzidas por métodos físicos ou químicos; o primeiro inclui aquecimento, irradiação γ ou ultravioleta enquanto os principais agentes químicos utilizados são os aldeídos, como glutaraldeído, formaldeído e glioxal

(STENZEL; MIYATA; RUBIN, 1974). Glutaraldeído é o principal composto utilizado para aumentar o número de reticulações do colágeno devido ao seu baixo custo e alta eficiência, promovendo maior grau de reticulação quando comparado a outros aldeídos; entretanto, o tratamento com glutaraldeído está associado com citotoxicidade e calcificação de tecido (PLONSKA-BRZEZINSKA et al., 2015; STENZEL; MIYATA; RUBIN, 1974).

Outras modificações químicas podem ser realizadas para alterar as propriedades do colágeno. O tratamento alcalino é um dos processos clássicos de funcionalização do material. O processo causa a hidrólise das carboxiamidas dos resíduos de asparagina e glutamina da proteína, transformando-os em ácidos carboxílicos. Como resultado, é obtido colágeno aniônico, ou seja, um material com mais cargas negativas quando comparado ao colágeno nativo (FRIESS, 1998b). O colágeno aniônico apresenta melhores propriedades piezoelétricas, maior porosidade, promove melhor adesão celular (MIGUEL et al., 2013; MOREIRA et al., 2004). O estudo de Rocha et al. (2002) utilizou tratamento alcalino em pericárdio bovino e analisou sua biocompatibilidade por meio de implantação do material em defeitos ósseos realizados cirurgicamente na tíbia de ratos; o trabalho mostrou que o colágeno aniônico implantado causou uma baixa resposta inflamatória e ausência de remoção e reabsorção do material antes da neoformação do osso; resultados semelhantes foram obtidos por Rosa et al. (2003). Entretanto, apesar do tratamento alcalino gerar bons resultados, o protocolo é extenso e laborioso, além de apresentar certa dificuldade de padronização. Esses gargalos podem dificultar uma futura transferência da técnica do laboratório para aplicações clínicas.

Tratamentos químicos de modo geral possuem a grande desvantagem de apresentarem um potencial efeito tóxico devido a substâncias residuais presentes no material ou compostos imunogênicos que podem ser formados durante a degradação *in vivo* do material. Métodos físicos, como tratamentos térmicos ou com radiações γ e UV, superam essa limitação; entretanto, as fibras colágenas são parcialmente degradadas quando submetidas a esses tratamentos (FRIESS, 1998a).

As propriedades mecânicas do colágeno também podem ser modificadas por de ligas com outros compostos naturais, sintéticos ou inorgânicos, como quitosana, ácido polilático (PLA) e hidroxiapatita. Além disso, as matrizes de colágeno natural ou modificado podem ser funcionalizadas com fatores de crescimento como TGF- β e

fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou outras moléculas bioativas para melhorar seu desempenho *in vivo*; entretanto é essencial que esses fatores sejam liberados pela matriz de maneira sustentada e controlada (DONG; LV, 2016).

Apesar de existirem diversos protocolos para modificação do colágeno, todos apresentam suas vantagens e limitações. Por suas propriedades e já extensa aplicação como biomaterial, a procura de novos e melhores métodos de modificação do colágeno é importante, podendo contribuir para tratamentos na área de reparo tecidual.

2.5 FUNCIONALIZAÇÃO POR PLASMA FRIO

Plasma frio pode ser definido como um gás contendo espécies neutras e carregadas, como elétrons, cátions, ânions, radicais, átomos e moléculas. Ele é gerado ao se aplicar energia em um gás. Íons e radicais são formados primariamente por impactos eletrônicos; o movimento e a energia cinética das cargas dependem do campo elétrico aplicado por fonte externa. (PONCIN-EPAILLARD; LEGEAY, 2003).

As espécies carregadas podem modificar a superfície do material de diversas formas, adicionando grupos funcionais ou filmes finos a superfícies (PECVD) ou retirando material da superfície tratada (*plasma etching*) (TENDERO et al., 2006). Os efeitos do tratamento com plasma dependem da espécie e quantidade de gás utilizado, fonte e nível de energia gerada pela fonte (METZGER et al., 2015), bem como tempo de tratamento.

A funcionalização de superfícies com plasma é uma técnica simples, rápida, eficiente e relativamente de baixo custo (CHEN et al., 2016a); o processo é geralmente feito em uma única etapa, não faz uso de solventes, não gera resíduos químicos tóxicos e é capaz de funcionalizar estruturas complexas de forma homogênea (CHU et al., 2002). Além disso, o tratamento com plasma pode ser planejado para funcionalizar a superfície do material sem que haja prejuízo em suas propriedades de interesse (CHU, 2007).

A modificação de biomateriais por plasma tem crescido nos últimos anos. Polímeros naturais e sintéticos já utilizados na composição de biomateriais tem sido funcionalizados a fim de se obter novos materiais. BAX et al. (2010) tratou politetrafluoretileno (PTFE) com plasma de nitrogênio e verificou a adesão e organização de colágeno no material tratado; o estudo verificou que no material

tratado a conformação do colágeno foi mais organizada quando comparado ao não tratado e que fibroblastos semeados em ambos os materiais proliferavam mais no PTFE tratado com colágeno aderido. Em outro estudo, os autores mostraram que foi possível imobilizar tropoelastina através de ligações covalentes em PTFE tratado com plasma de N₂ (BAX et al., 2011). TARABALLI et al. (2013) funcionalizou colágeno com plasma de NH₂/H₂ e CO₂; o tratamento adicionou ao colágeno grupos NH₂ e COOH respectivamente, fazendo com que a hidrofiliabilidade do material aumentasse em ambas as condições de tratamento, sem que houvesse comprometimento da estrutura da proteína. Dessa forma, o plasma mostra-se um método interessante para a funcionalização de biomateriais, conseguindo superar algumas das limitações dos métodos químicos e físicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE PERICÁRDIO BOVINO

Patches de pericárdio bovino (PB) com 0,1 cm de espessura fixados em paraformaldeído 4% foram obtidos da Braille Biomédica (São José do Rio Preto, SP – Brasil).

O material foi cortado em amostras de dimensões aproximadas de 0,5x0,5x0,1 cm. As amostras foram lavadas com água deionizada (dH₂O) por 72 horas, com trocas de água a cada 12 horas para remoção do paraformaldeído, congeladas a -80°C durante 48 horas e liofilizadas. As amostras liofilizadas foram funcionalizadas com plasma.

3.2 TRATAMENTO COM PLASMA

Foi utilizado plasma frio de argônio (Ar) e dióxido de carbono (CO₂) para a funcionalização das amostras. O tratamento com plasma foi realizado no Laboratório de Filmes Finos e Processos de Plasma (LFFPP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), utilizando uma fonte de plasma fabricada dentro do próprio laboratório. O equipamento é composto por uma bomba de vácuo, que mantém a baixa pressão experimental; um tubo de quartzo onde o plasma é gerado; uma fonte de micro-ondas, fonte de energia utilizada para a produção do plasma e porta amostras; a entrada de gás é controlada por válvulas (Fig. 1).

Foram delimitadas condições experimentais de pressão dos gases e potência da fonte de energia para a produção do plasma. As pressões Ar e CO₂ utilizadas foram respectivamente 0,4 mTorr e 0,2 mTorr; a fonte de micro-ondas operou a 2,45 GHz, 500 W. O porta-amostra foi inserido no tubo de quartzo a uma distância de 25 cm e as amostras foram tratadas de 0 a 240 segundos com incrementos de 30s conforme a Tabela 1.

Fig. 1 Representação esquemática da fonte de plasma

O fluxo do gás é controlado por válvulas (needle valves) e a pressão pela bomba de vácuo (vacuum pump). A fonte de micro-ondas (microwave source) fornece energia para a produção do plasma, gerado no tubo de quartzo (quartz tube) onde a amostra (substrate) é posicionada sobre o porta-amostra. As amostras de PB foram tratadas a uma distância de 25 cm da entrada do tubo de quartzo.

Fonte: (GELAMO, ROGÉRIO VALENTIM; CARVALHO; RODRIGUES; MOSHKALEV, 2015)

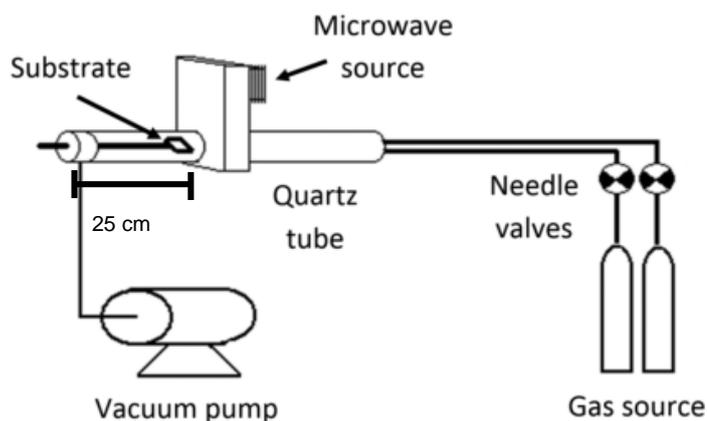


Tabela 1: Funcionalização do pericárdio bovino com plasma frio de Ar e CO₂. O grupo controle (PBCT) não foi tratado com o plasma.

Grupo	PBCT	PB30	PB60	PB90	PB120	PB150	PB180	PB210	PB240
Tempo (s)	0	30	60	90	120	150	180	210	240

Fonte: Do autor

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com refletância total atenuada (ATR)

A FTIR se baseia no estudo da interação da luz infravermelha com a matéria. As bandas de absorção correspondem às transições das vibrações moleculares do material analisado (VIDAL; MELLO, 2011). A luz infravermelha pode ser incidida sobre o material de diversas formas e o sinal pode ser coletado utilizando diferentes tipos de detectores. FTIR ATR utiliza um material transparente ao infravermelho, que possui um alto índice de refração. A luz entra na amostra em forma de uma onda evanescente

em uma profundidade de 2 a 5 μm (GLASSFORD; BYRNE; KAZARIAN, 2013), portanto, a apenas a superfície do material é caracterizada por FTIR ATR.

O material tratado com plasma foi previamente analisado por FTIR ATR em sua superfície tratada, não tratada e interior, a fim de verificar possíveis modificações estruturais ou funcionais no intervalo de número de onda de 4000-550 cm^{-1} . As modificações químicas e estruturais causadas pelo tratamento foram analisadas por FTIR, utilizando o espectrômetro Cary 600 Series (Agilent Technologies, EUA) no equipado com o acessório de refletância total atenuada (ATR), realizado no LFFPP, UFTM. A FTIR é uma técnica de caracterização não-destrutiva e não necessita de nenhum tipo de marcação prévia do material (ANDREW CHAN; KAZARIAN, 2016).

A fim de se verificar a penetração do tratamento nas amostras, foram analisadas as superfícies tratadas, não tratadas e parte internas. Para análise do interior das amostras, estas foram cortadas longitudinalmente e suas superfícies internas foram testadas; o experimento foi feito em duplicata. Os resultados obtidos na FTIR ATR foram utilizados para selecionar as amostras tratadas. As amostras PB60, PB90, PB180 e PB210 apresentaram espectros semelhantes ao controle, sem modificações aparentes, portanto foram eliminadas. Os próximos experimentos aqui descritos foram realizados caracterizando apenas as amostras PBCT, PB30, PB120, PB150 e PB240. O software gráfico utilizado foi o OriginPro 8.5 (OriginLab Co., EUA).

3.3.2 Modelagem Molecular Computacional

A modelagem molecular computacional foi utilizada para validar os resultados obtidos pela FTIR ATR. A interpretação do espectro indicou que o tratamento com plasma resultou na adição de grupos éster à amostra PB120. A fim de confirmar esse resultado, foi construído um modelo *in silico* do colágeno funcionalizado com ligações éster. Para isso, um peptídeo semelhante ao colágeno (PDB 4Z1R, 30 a.a. por cadeia, resolução de 1.27Å, sequência hidroxipolina-prolina-glicina) (PLONSKA-BRZEZINSKA et al., 2015) foi modificado com dois grupos éster através da reação dos grupos hidroxila (OH) da hidroxiprolina com os grupos carboxila (COOH) da glicina.

O peptídeo foi editado utilizando o software MAESTRO (Schrödinger Ltda, EUA). A molécula foi cortada em um peptídeo menor (10 a.a. por cadeia) a fim de diminuir a demanda computacional. A molécula foi otimizada com o método PM6 (STEWART,

2007) antes e depois da adição dos grupos éster utilizando o software MOPAC 2016. (Stewart Computational Chemistry, EUA). O espectro teórico foi construído utilizando a função *force* do MOPAC 2016 e visualizado com o software de interface gráfica Gabedit version 2.4.8 (ALLOUCHE, 2009).

3.3.3 Microscopia óptica

As amostras tratadas foram fixadas em formalina 10%, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As amostras foram cortadas longitudinalmente a 5 μm de espessura utilizando micrótomo, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisados em microscópio óptico Zeiss (Axiolab) equipado com uma câmera (Icc, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). As imagens foram feitas com o auxílio do software Axiovision. Os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Microscopia e Histotecnologia da UFTM.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

MEV foi utilizada para analisar modificações ultraestruturais causadas pelo tratamento com plasma. As amostras foram revestidas com um filme fino de ouro-paládio e analisadas com microscópio eletrônico Zeiss DSM940A (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), operando a 5 kV. A análise foi feita no laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.3.5 Medida do ângulo de contato

A umectabilidade da superfície tratada do material foi analisada pela medida do ângulo de contato entre água e amostra utilizando a técnica da gota séssil. O ângulo de contato foi calculado utilizando a equação de Young-Dupré (1), em que γ_{sv} corresponde à tensão da interface sólido-vapor, γ_{sl} a tensão sólido-líquido e γ_{lv} à tensão líquido-vapor (KWOK; NEUMANN, 1999). Materiais com ângulo de contato menor que 10° são considerados super-hidrofílicos, entre 10° e 90° são considerados

hidrofílicos, entre 91° e 120° são considerados hidrofóbicos e acima de 120°, super-hidrofóbicos (TAYLOR; OLIVEIRA; MANO, 2012).

$$\cos\theta=(\gamma_{sv}-\gamma_{sl})/\gamma_{lv} \quad (1)$$

Amostras do *patch* de pericárdio bovino foram cortadas em tamanho 2x2x0,1 cm. O processamento e tratamento das amostras procederam conforme descrito nos itens supracitados 4.1 e 4.2. As amostras foram colocadas sob uma seringa de precisão e uma gota de 15µL de dH₂O foi liberada sobre a amostra. O ângulo formado pela interface sólido-líquido foi medido, utilizando 10 leituras. O ângulo de contato das amostras foi correspondente à média e desvio padrão das leituras. O experimento foi feito em duplicata e realizado no Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” *campus* Sorocaba utilizando um goniômetro 100-00 (Ramé-Hart Co., EUA).

3.3.6 Capacidade higroscópica

A quantidade de reticulação em um polímero é inversamente proporcional à sua capacidade de absorção de água (ASTM INTERNATIONAL, 2008; BUENO et al., 2013). Para verificação da capacidade higroscópica do material tratado, amostras de PB foram incubadas em dH₂O, à 37°C e tiveram sua massa aferida em balança de precisão até a obtenção de massa constante. A pesagem das amostras foi realizada após 2h, 4h, 6h, 12h, 24h e 48h de incubação; o excesso de água foi removido previamente à pesagem, colocando-as sobre papel filtro. A absorção de água pelo material foi calculada pela equação (2) em que %SW representa a porcentagem de água absorvida, W_d corresponde ao peso seco do material e W_s ao peso úmido. O experimento foi realizado em duplicata.

$$SW\% =[(W_s-W_d)/W_d]x100 \quad (2)$$

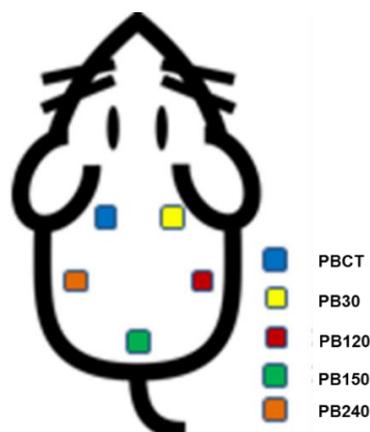
3.4 ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE

3.4.1 Implantação em animais

A biocompatibilidade do material foi analisada pelo teste de implantação subcutânea em camundongos. Foram utilizados 20 camundongos linhagem Balb/c, adultos (8 a 12 semanas de idade). As amostras foram implantadas no subcutâneo do dorso dos animais conforme o esquema na Fig. 2. Os animais foram anestesiados utilizando cetamina e xilazina na dose 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. Foi feita uma incisão no dorso dos animais e com uma tesoura de ponta romba o tecido cutâneo foi dilacionado para criação de bolsos na direção das patas e cauda, onde amostras foram posicionadas individualmente.

Fig. 2 Representação esquemática do PB implantado no subcutâneo de camundongos.

Fonte: do autor.



Os animais foram divididos igualmente em quatro grupos (n=5) com tempos de implantação de 3, 7, 15 ou 30 dias (Tabela 2), períodos estes escolhidos para avaliação da inflamação aguda, sub-crônica e crônica causadas pela implantação do biomaterial. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério do laboratório de bioquímica, no Departamento de Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia (DBFF) em gabinetes com condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (37%) e ciclo de claro/escuro de 12/12 horas. Após o término do tempo de implantação, os animais foram eutanasiados com sobredose de xilazina e cetamina e a confirmação da morte foi feita por deslocamento cervical e as amostras do material foram recuperadas. O protocolo experimental foi revisado e aprovado pela Comissão

de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFTM (processo 406) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as suas diretrizes.

Tabela 2: Divisão dos grupos de animais para o teste de biocompatibilidade através da implantação subcutânea.

Grupo (n=5)	Tempo de implantação
G1	3 dias
G2	7 dias
G3	15 dias
G4	30 dias

Fonte: do autor.

3.4.2 Processamento das amostras e análise histológica

As amostras recuperadas foram imediatamente identificadas e imersas em solução de formalina tamponada (formol em tampão fosfato na diluição 1:10, pH=7,4). O material permaneceu na solução fixadora por 24h. Após a fixação, o material foi desidratado em etanol, diafanizado em xilol, incluído em parafina e cortado a 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e o infiltrado inflamatório ao redor da amostra foi analisado em microscópio óptico Zeiss (Axiolab) equipado com uma câmera (Icc, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) as imagens foram feitas com o auxílio do software Axiovision.

3.4.3 Análise de dados

Análises quantitativas foram feitas por análise de variância (*one-way* ANOVA) com pós-teste de Newman-Keuls. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR)

As figuras 4, 5 e 6 mostram respectivamente os espectros das superfícies tratadas, não tratadas e parte interior de todas as amostras. O espectro foi decomposto em quatro regiões, cujos picos podem ser vistos em detalhes: 3500-3000 cm^{-1} (Fig.4-6 (B)), 3000-2800 cm^{-1} (Fig.4-6 (C)), 1800-1200 cm^{-1} (Fig.4-6 (D)), 1200-950 cm^{-1} (Fig.4-6 (E)). Os principais picos estão centralizados por uma linha e suas atribuições podem ser consultadas na Tabela 3.

A Fig. 4 (A) mostra os espectros obtidos para superfície tratada. O perfil de picos da amostra PBCT é condizente com o espectro do Colágeno tipo I. Os picos 1030 e 1081 cm^{-1} (Fig. 4 (E) e Tabela 3) correspondem a estiramentos (ν) de ligações C–O e C–O–C de carboidratos presentes na proteína devido à glicosilação (BELBACHIR et al., 2009a). Os picos 1637 cm^{-1} , 1534 cm^{-1} e 1236 cm^{-1} (Fig. 4 (D) e Tabela 3) correspondem respectivamente às Amidas I, II e III (CHADEFAUX et al., 2009; SUSI; ARD; CARROLL, 1971).

As amostras PB30 e PB150 apresentaram espectros equivalentes a amostra controle, o que mostra que o tratamento não causou alterações na superfície do material. No espectro da amostra PB240 é possível verificar um ligeiro deslocamento de picos na Amida II e Amida A (região 3300 cm^{-1}), regiões que fornecem informações sobre a estrutura da proteína. Esses deslocamentos indicam que o plasma causou mudanças estruturais na proteína, o que sugere algum grau de desnaturação no colágeno (RABOTYAGOVA; CEBE; KAPLAN, 2008).

O espectro da amostra PB120 não apresenta deslocamento de picos significativos, implicando que não houve desnaturação. Entretanto, é possível observar picos inexistentes nas outras amostras, portanto o tratamento com plasma por 120s foi capaz de funcionalizar o material. Os picos 1159 e 1743 cm^{-1} representam (C–OH) ν e (C=O) ν de um grupo éster (YAN et al., 2017); os picos 2870 e 2954 cm^{-1} correspondem a (C–H₂) ν . A formação de um éster envolve um grupo carboxila (COOH) e um grupo hidroxila (OH); é provável que este grupo funcional seja resultado da reação entre a porção C-terminal das cadeias α de uma molécula de colágeno com a porção hidroxila da

hidroxiprolina de outra molécula formando ligações de reticulação entre as proteínas. Esta reação explicaria os estiramentos C–H₂, visto que os grupos OH formam ligações de hidrogênio com os átomos de hidrogênio, o que impossibilita seu estiramento, mascarando essas ligações no espectro infravermelho, entretanto, com os grupos OH participando das ligações éster, os hidrogênios ficam livres para vibrar.

A Fig. 5(A) mostra os espectros infravermelho do lado não tratado das amostras. É possível observar o mesmo perfil de picos descritos acima, mostrando que o tratamento com plasma conseguiu funcionalizar a amostra PB120 de maneira uniforme. A amostra PB240 apresenta dois picos na região da Amida A; os picos 3354 e 3193 cm⁻¹ correspondem ao estiramento das ligações O–H e N–H respectivamente (REHMAN, IHTESHAM UR; MOVASAGH, ZANYAR; REHMAN, 2012), já os picos 1410 e 1424 cm⁻¹ correspondem respectivamente a deformação angular no plano da ligação C–OH e estiramento do carbonato (CHEN et al., 2016b; LEE et al., 2017)

Foi ainda verificado se houve penetração do tratamento no material, através da análise do interior da amostra (Fig. 6(A)). É possível observar nesses espectros que o tratamento ficou limitado à superfície da amostra PB120, entretanto os mesmos picos são encontrados na amostra PB150, sugerindo que o plasma tenha se difundido pelo material e funcionalizado seu interior apesar de a superfície permanecer semelhante ao controle.

O tratamento com plasma foi capaz de funcionalizar o pericárdio bovino de forma tempo dependente. Aos 120s de tratamento, grupos ésteres foram adicionados ao material sem danos à estrutura do colágeno. Um resultado semelhante foi obtido por GARCÍA et al. (2010) que observou a presença de ligações *crosslink* C–O–C em filmes de colágeno tratados com plasma de argônio. O colágeno, apesar de ser uma proteína muito estável, é susceptível à ação da colagenase; *crosslinks* fornecem uma resistência à degradação proteolítica (ASTM INTERNATIONAL, 2008), portanto essas ligações podem fornecer maior tempo de vida do implante no organismo.

Fig. 3 Espectros FTIR – Análise da superfície tratada com plasma.
 (A) Espectros de todas as amostras. (B) Região 3500-3000 cm^{-1} . (C) Região 3150-2800 cm^{-1} . (D) Região 1800-1200 cm^{-1} . (E) Região 1200-950 cm^{-1} . Linhas pretas marcam o centro dos picos da amostra controle; linhas azuis e verdes mostram picos específicos das amostras PB120 e PB240, respectivamente.
 Fonte: Do autor.

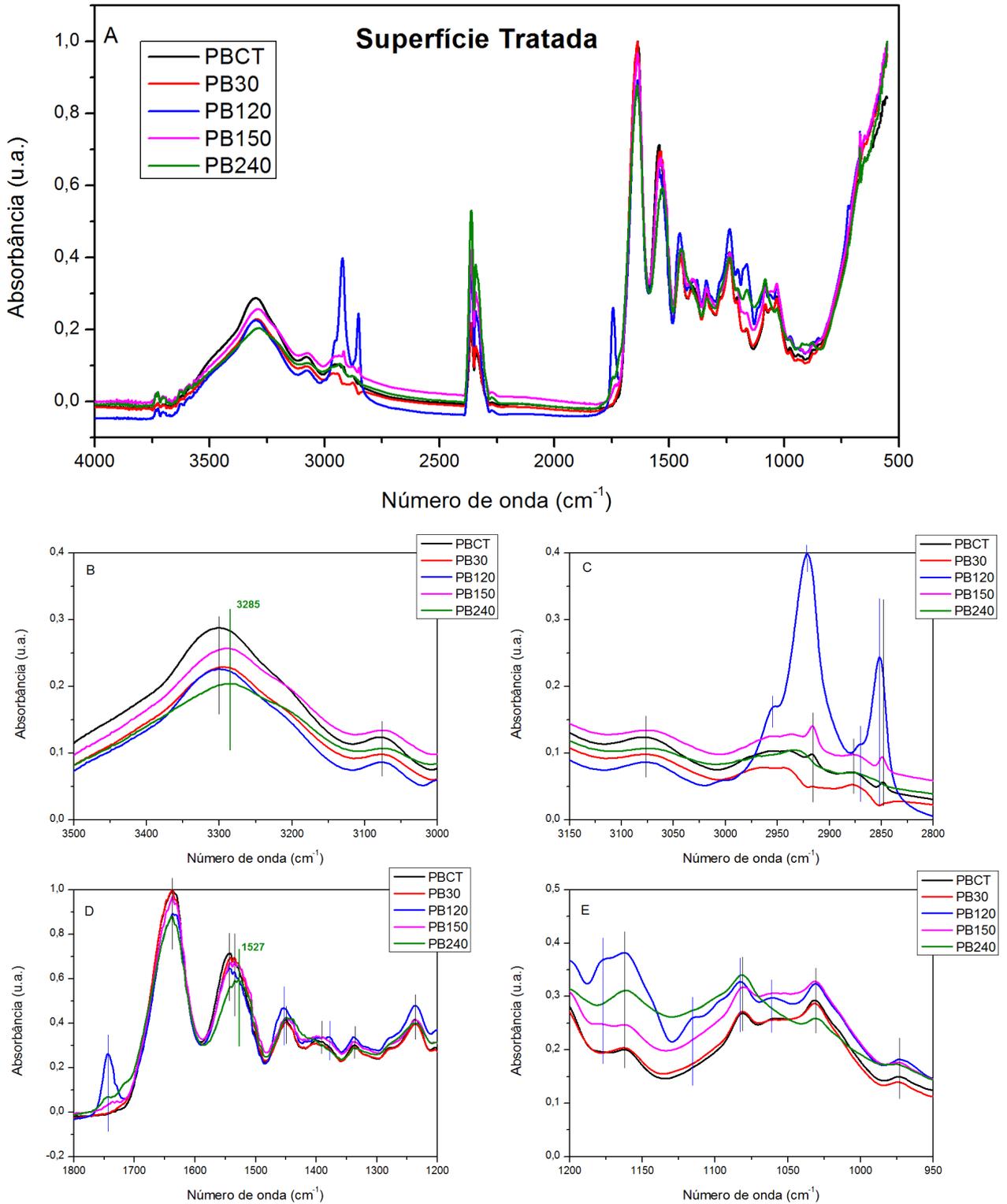


Fig. 4 Espectros FTIR – Análise da superfície não tratada com plasma.
 (A) Espectros da superfície não tratada de todas as amostras. (B) Região 3500-3000 cm^{-1} . (C) Região 3150-2800 cm^{-1} . (D) Região 1800-1200 cm^{-1} . (E) Região 1200-950 cm^{-1} . Linhas pretas marcam o centro dos picos da amostra controle; linhas azuis e verdes mostram picos específicos das amostras PB120 e PB240, respectivamente.
 Fonte: Do autor.

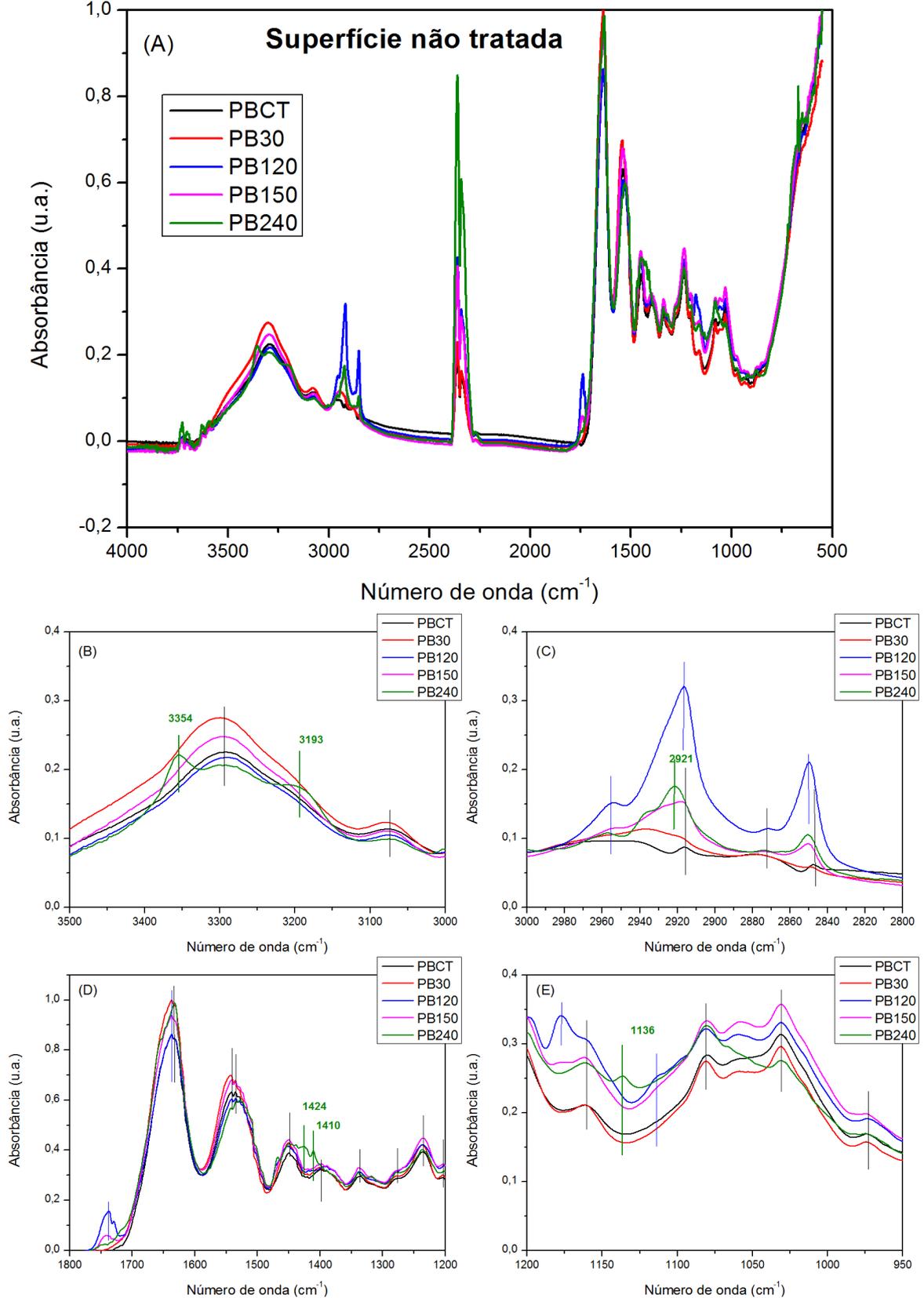
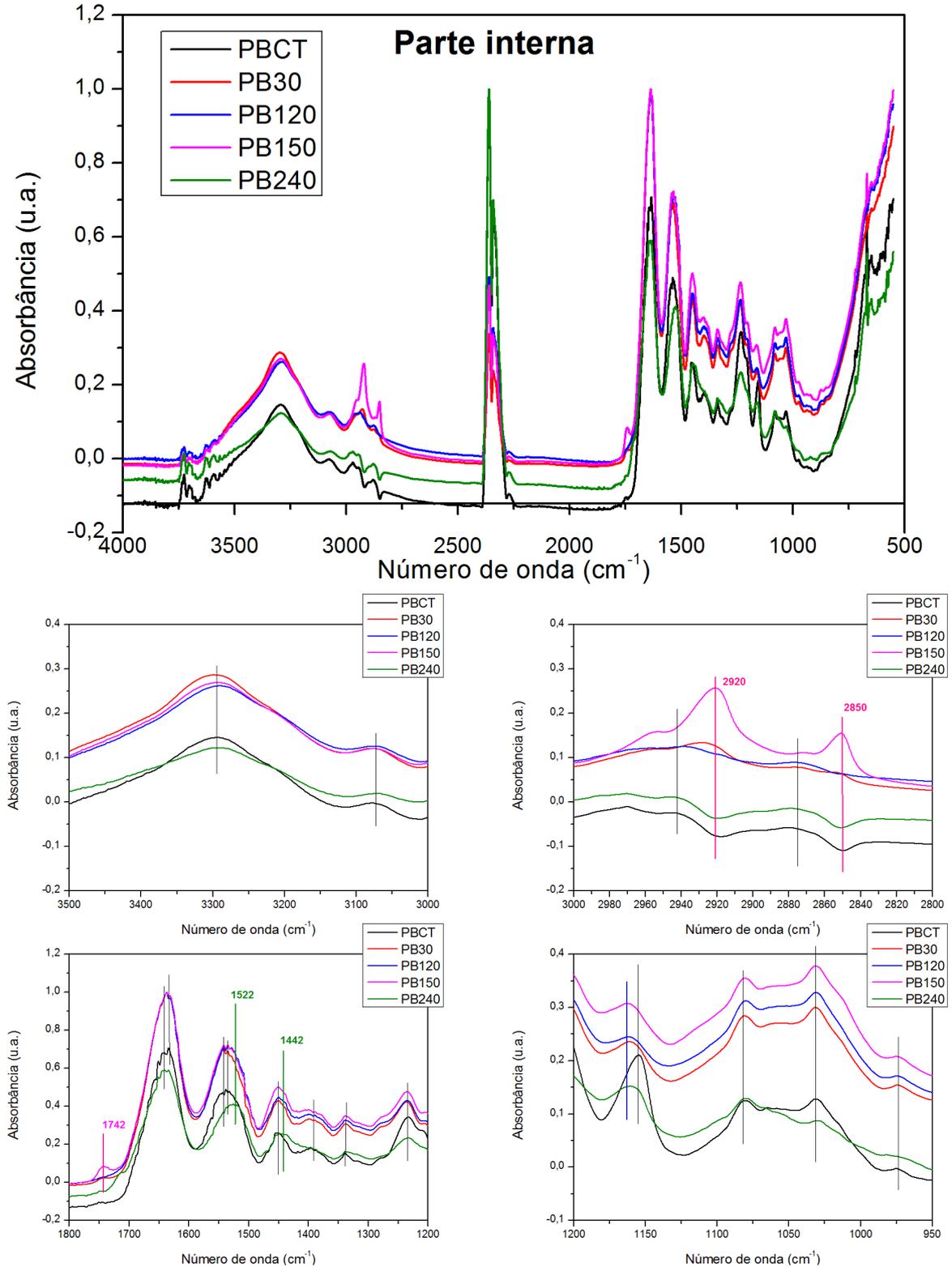


Fig. 5 Espectros FTIR – Análise da parte interior da amostra de PB.

(A) Espectros do interior de todas as amostras. (B) Região 3500-3000 cm^{-1} . (C) Região 3150-2800 cm^{-1} . (D) Região 1800-1200 cm^{-1} . (E) Região 1200-950 cm^{-1} . Linhas pretas marcam o centro dos picos da amostra controle; linhas azuis, rosas e verdes mostram picos específicos das amostras PB120, PB150 e PB240, respectivamente.

Fonte: Do autor.



A integridade da tripla hélice do colágeno pode ser determinada pela razão da absorbância das bandas da Amida III (1235 cm^{-1}) e da ligação C-H do anel pirrolidina da prolina/hidroxiprolina 1450 cm^{-1} (RIAZ et al., 2018). Uma razão próxima de 1 indica integridade da estrutura enquanto razões próximas de 0,5 indicam comprometimento da estrutura (SILVA et al., 2015) A Tabela 4 mostra essa razão; para todas as amostras os valores foram próximos a 1 indicando integridade da tripla hélice

Tabela 4: Razão a absorbância dos picos 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1}

	PBCT	PB30	PB120	PB150	PB240
Superfície tratada	1,0000	0,9768	1,0236	0,9750	0,9522
Superfície não tratada	1,0134	0,9819	1,0124	1,0110	0,9398
Interior	1,3120	0,9841	0,9659	0,9477	0,8983

O tratamento com plasma não causou completa desnaturação no material tratado, embora os valores da amostra PB240 sejam consideravelmente menores quando comparados às outras amostras, indicando início da desestabilização da estrutura do colágeno.

4.2 MODELAGEM MOLECULAR COMPUTACIONAL

A modelagem computacional foi realizada para tentar validar o espectro FTIR da amostra PB120. Um peptídeo semelhante ao colágeno (Fig. 6) foi funcionalizado com dois grupos éster (Fig. 7). A estrutura do peptídeo semelhante ao colágeno foi obtida pela cristalografia de um peptídeo recombinante (PLONSKA-BRZEZINSKA et al., 2015) e é uma representação hiper-simplificada do colágeno tipo I. Esta molécula foi escolhida devido à inviabilidade de utilização da estrutura da proteína nativa, por seu tamanho, complexidade e ausência de uma estrutura de alta resolução disponível na base de dados.

Fig. 6 Modelo de colágeno

Para modelagem molecular computacional foi escolhido um peptídeo semelhante ao colágeno no PDB (PDB ID: 4Z1R), cujas cadeias α possuem 30 a.a. e sequência hidroxiprolina-prolina-glicina. A resolução da proteína é de 1.27Å. As esferas cinza representam átomos de carbono, as vermelhas, átomos de oxigênio e as azuis, átomos de nitrogênio. O software JSMol foi usado como interface gráfica.

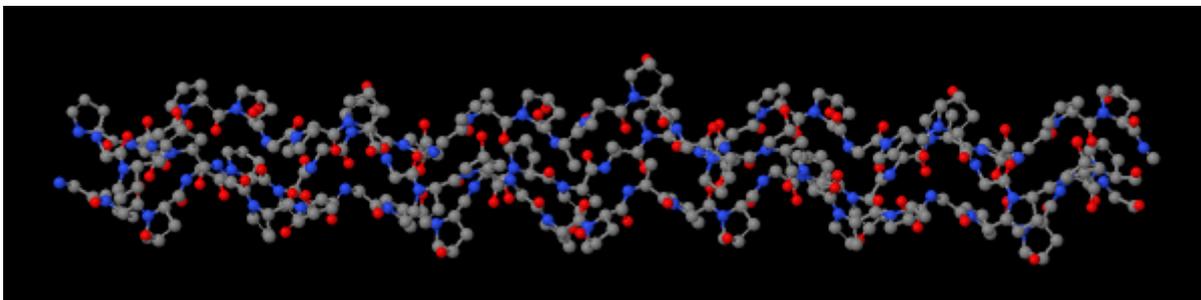
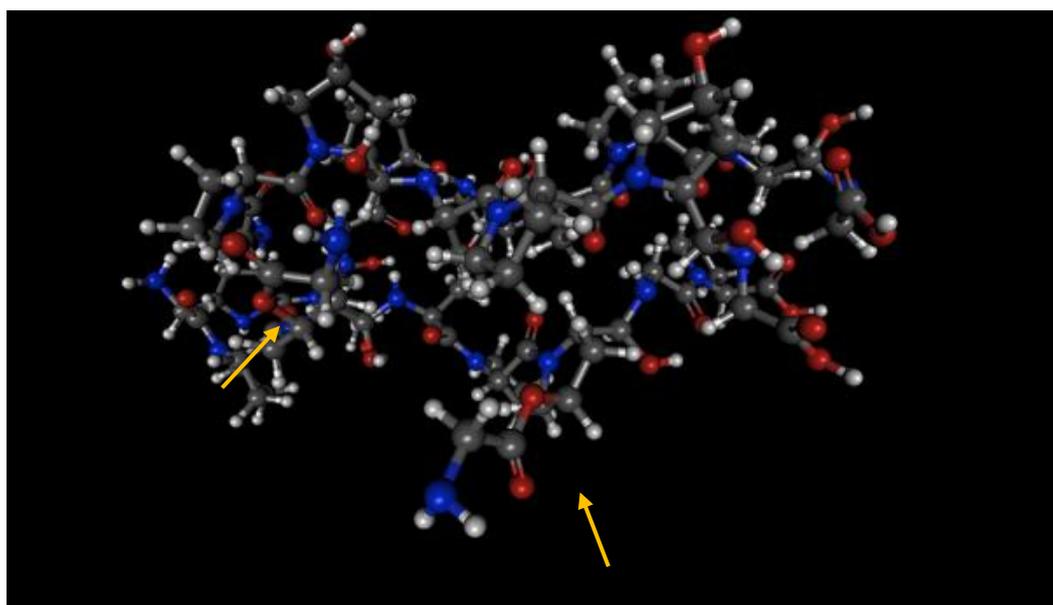


Fig. 7 Modelo de colágeno editado e funcionalizado com grupos éster.

As setas em amarelo indicam onde os grupos éster foram adicionados. As esferas cinza escuras representam átomos de carbono; as azuis, nitrogênio; as vermelhas, oxigênio e as esferas cinza claras representam átomos de hidrogênio. O software Gabedit 2.4.8 foi usado como interface gráfica.

Fonte: Do autor.



O espectro infravermelho resultante (Fig. 8) revela um perfil muito semelhante ao da amostra PB120, porém apresenta ausência e deslocamento de picos, devido às limitações da técnica.

A modificação pode ser confirmada pelo espectro infravermelho teórico do peptídeo modificado por modelagem molecular computacional. A análise dos picos foi feita através da função *Animation* oferecida pelo programa Gabedit versão 2.4.8, com a qual é possível observar as vibrações de cada pico na estrutura da molécula. Os

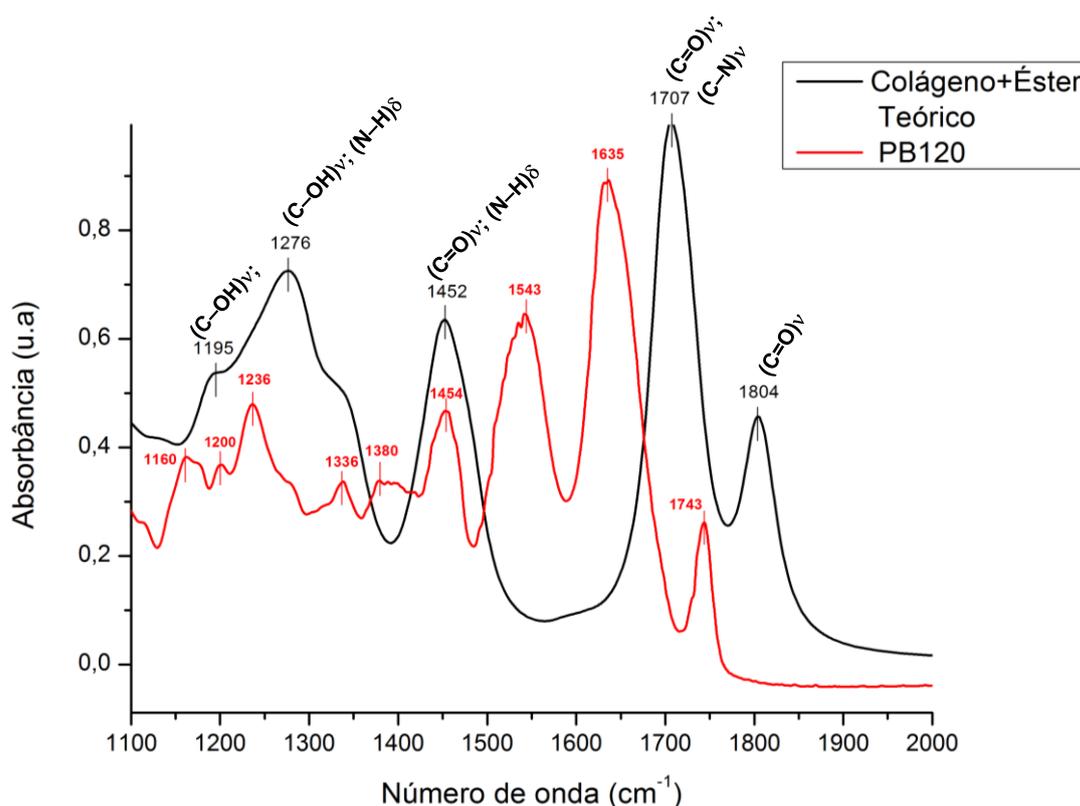
picos 1804, 1707 e 1452 cm^{-1} correspondem respectivamente ao estiramento C=O da ligação éster, estiramentos C=O e C–N da Amida I e estiramento C=O e tesoura N–H da Amida II.

As diferenças entre os espectros teórico e experimental se devem a diversos fatores. A proteína utilizada na modelagem experimental foi um peptídeo semelhante ao colágeno simples, de baixo peso molecular, com cadeias α_1 igual a α_2 , e os grupos éster adicionados não formam ligações *crosslink*, pois o desenho exigiria um segundo peptídeo, o que tornaria a demanda computacional inviável; dessa forma, a estrutura possui mais liberdade nas vibrações, o que pode explicar o deslocamento de picos. Adicionalmente, apesar do PB ser majoritariamente constituído por colágeno tipo I, sendo um tecido ele apresenta resquícios celulares, carboidratos, lipídeos e outras proteínas, que se refletem no espectro experimental. Apesar de o espectro teórico não conseguir validar o espectro experimental da amostra PB120, que apresenta diversos picos a mais, foi possível validar que a modificação causada pelo tratamento com plasma foi realmente a adição de um grupo éster.

Fig. 8 Espectro teórico versus espectro experimental.

O espectro do peptídeo semelhante ao colágeno modificado com grupos éster (preto) apresenta um perfil de picos semelhante ao da amostra PB120 (vermelha), porém apresenta deslocamento e ausência de picos.

Fonte: Do autor



4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise da micro e ultra estrutura do material foi feita através de microscopia de luz e MEV. A Fig. 9 mostra o material tratado corado com H&E a um aumento de 400x. Células estão presentes em todas as amostras, portanto o tratamento com plasma não foi capaz de decelularizar o PB. As amostras controle, PB30, PB120 e PB150 não apresentam diferenças estruturais significativas, enquanto, a amostra PB240 (Fig. 9 (E)) apresenta as fibras de colágeno amorfas, corroborando para hipótese de desnaturação do material. Entretanto, com a microscopia eletrônica de varredura (Fig. 10) foi possível observar que a desnaturação do colágeno começou a ocorrer a partir de 150s de tratamento; a amostra PB150 (Fig. 10 (D)) apresenta alguns focos de desgaste, enquanto as fibras colágeno da amostra PB240 (Fig. 10 (E)) estão intensamente desgastadas e porosas.

É provável após 120s de tratamento, o plasma ao invés de adicionar grupos ao material começou a desgastar a superfície do PB, processo chamado de plasma *etching* (TENDERO et al., 2006) , no qual espécies altamente reativas reagem com a superfície do material quebrando-a em compostos voláteis ou pequenos compostos que são sugados pela bomba de vácuo (WANG, 2012). Esse desgaste aparenta ter início na amostra PB150 onde há pequenos focos de deterioração (Fig. 10 (D)). As estruturas das amostras tratadas com tempos inferiores encontram-se intactas.

Fig. 9 Visualização da microestrutura do pericárdio bovino tratado com plasma por de microscopia óptica

(A) PBCT. (B) PB30. (C) PB120. (D) PB150. (E) PB240. As setas mostram núcleos celulares presentes no material. Aumento: 400x.

Fonte: Do autor

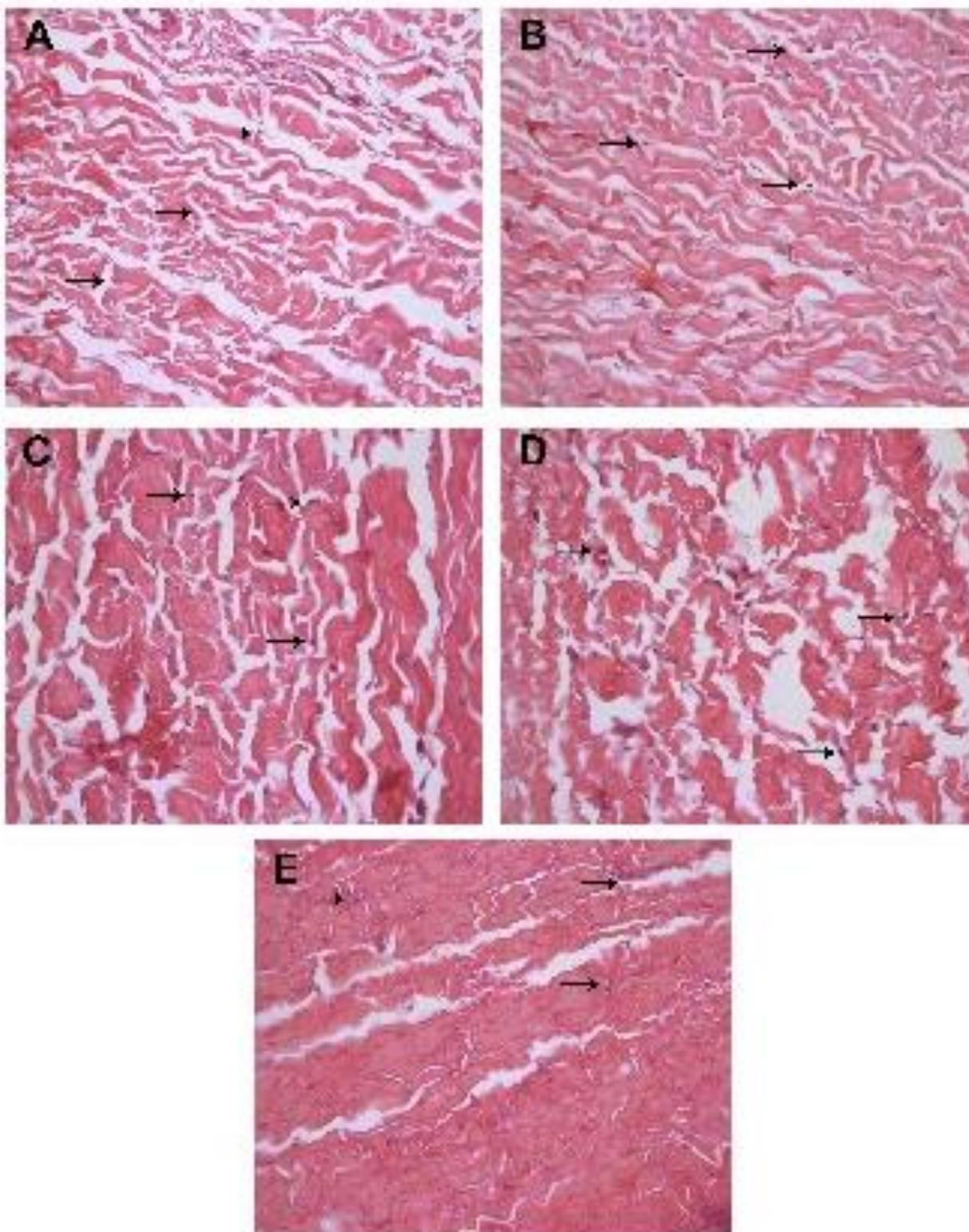
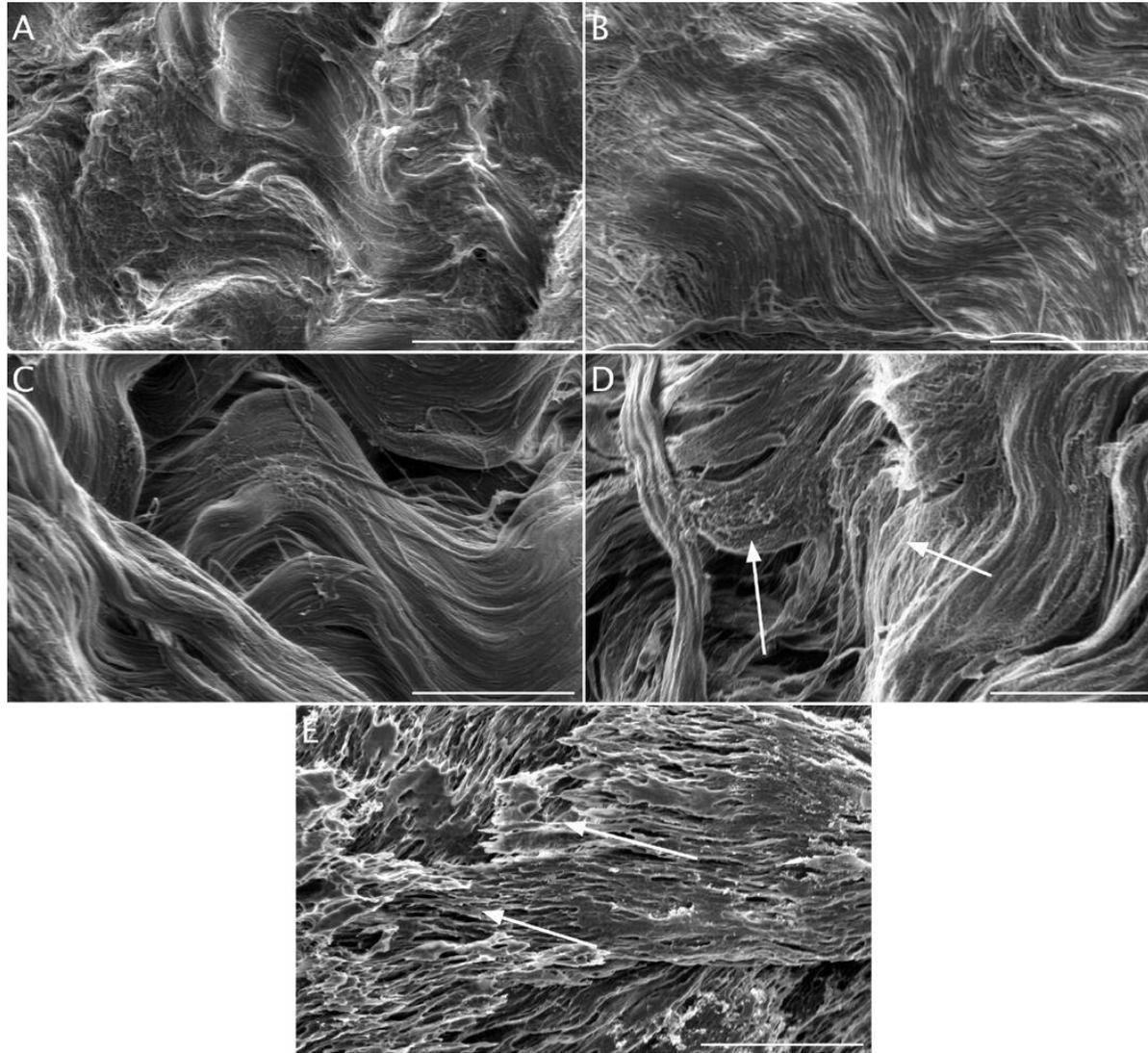


Fig. 10 Visualização da ultraestrutura do pericárdio bovino por microscopia eletrônica de varredura.
(A) PBCT. (B) PB30. (C) PB120. (D) PB150. (E) PB240. As setas mostram partes degradadas do material. Aumento: 1000x.
Fonte: Do autor



4.4 CAPACIDADE HIGROSCÓPICA E ÂNGULO DE CONTATO

O número de reticulações ou ligações *crosslink* de um polímero pode ser indiretamente analisado através da hidratação do material. A absorção de água é inversamente proporcional ao número de reticulações (ASTM INTERNATIONAL, 2008; JUÁREZ-MORENO et al., 2015). A Tabela 5 mostra a absorção de água pelo PB após 48h, tempo no qual a massa se estabilizou. Apesar da tendência de o material tratado com plasma absorver menos água, não houve diferença estatística entre as amostras.

O tratamento com plasma causou um aumento do ângulo de contato da água com o material, ou seja, houve uma diminuição da hidrofiliabilidade do colágeno. Não foi possível medir o ângulo de contato da amostra PB240, devido a imediata absorção da água pelo material; isso pode ser devido a um aumento da hidrofiliabilidade devido ao tratamento com plasma ou à porosidade da superfície da amostra causada pelo tratamento (Fig. 8 (E)). Este resultado é conflitante com o de TARABALLI et al. (2013), estudo no qual colágeno tratado com plasma de CO₂ apresentou um aumento na hidrofiliabilidade. Essa diferença se deve à natureza dos grupos funcionais adicionados ao material; no estudo mencionado, o colágeno foi funcionalizado com grupos COOH, enquanto neste trabalho houve a adição de grupos éster na forma de ligação *crosslink*. Se considerarmos a hipótese de que essas ligações envolveram os grupos hidroxila da hidroxiprolina e o ácido carboxílico da porção C terminal da proteína, a diminuição da hidrofiliabilidade é lógica.

Um fator importante para a biocompatibilidade de um material implantado é a sua umectabilidade, já que esta propriedade está relacionada com adesão e proliferação celular. Estudos mostram que uma melhor proliferação celular, portanto melhor biocompatibilidade, ocorre quando o material apresenta uma hidrofiliabilidade moderada, ou seja, ângulos de contato entre 50 e 70° (KIM et al., 2007; MENZIES; JONES, 2010; TAMBURACI; TIHMINLIOGLU, 2017). Esta faixa é favorável pois a hidrofiliabilidade do material promove a adsorção de proteínas, o que iniciará adesão celular, porém uma alta hidrofiliabilidade resultaria em uma alta interação célula/substrato e baixa interação célula/célula, desfavorecendo a formação da monocamada celular e prejudicando a proliferação (TAMBURACI; TIHMINLIOGLU, 2017).

Tabela 5: Absorção de água após 48h e medida do ângulo de contato da água com a superfície do material.

	Absorção de água (%Média ± SD)	Ângulo de contato (°Média ± SD) ^a
PBCT	145,9±26,17	54,08±0,5553
PB30	121,1±30,30	64,80±1,713**
PB120	113,7±29,29	69,28±16,36*** ##
PB150	133,3±23,03	86,01±5,445***##
PB240	116,2±13,02	----

^aFoi realizado teste de análise de variância One-Way ANOVA. Controle vs. material tratado: ** p<0,01 *** p<0,001. PB150 vs. amostras: ## p<0,01.

4.5 BIOCOMPATIBILIDADE

Biointegração é o resultado ideal esperado de um implante. Isso ocorre quando a interface implante-tecido do receptor não induz a nenhum efeito deletério como uma resposta inflamatória crônica ou formação anormal de tecido (CHU et al., 2002). A resposta inflamatória é um fator importante no início do processo de reparo, pois é responsável por fagocitar de debris celulares e bactérias e outros patógenos, além de recrutar células responsáveis pelo remodelação e reparo do tecido danificado (CHEN et al., 2017); a inflamação crônica entretanto, causa prejuízo para a biointegração do implante.

A mudança no conceito de biocompatibilidade levou à busca de novos materiais com propriedades mais interessantes A funcionalização de biomateriais com plasma, apesar de ser relativamente recente apresenta resultados muito promissores. A técnica pode ser utilizada para diferentes aplicações como imobilização de drogas em matrizes através de ligações covalentes (DONG; LV, 2016; KONDYURIN et al., 2018), aplicação de jato de plasma em feridas para diminuição da carga bacteriana estimulação do processo de reparo (BEKESCHUS et al., 2018) e funcionalização de superfícies. GARCÍA et al. (2010) comparou o crescimento de queratinócitos humanos imortalizados (células HaCaT) cultivados em filmes de colágeno nativo e tratado com plasma de argônio; o estudo mostrou que o tratamento com Ar causou um aumento da rugosidade do filme, o que promoveu melhor adesão e proliferação celular. O trabalho de CHEN et al. (2017) analisou a resposta inflamatória de PBMCs de humanos quando cultivadas em filmes de colágeno tratados com plasma de O₂ ou N₂; foram quantificadas citocinas pró e anti-inflamatórias. Os autores observaram que a

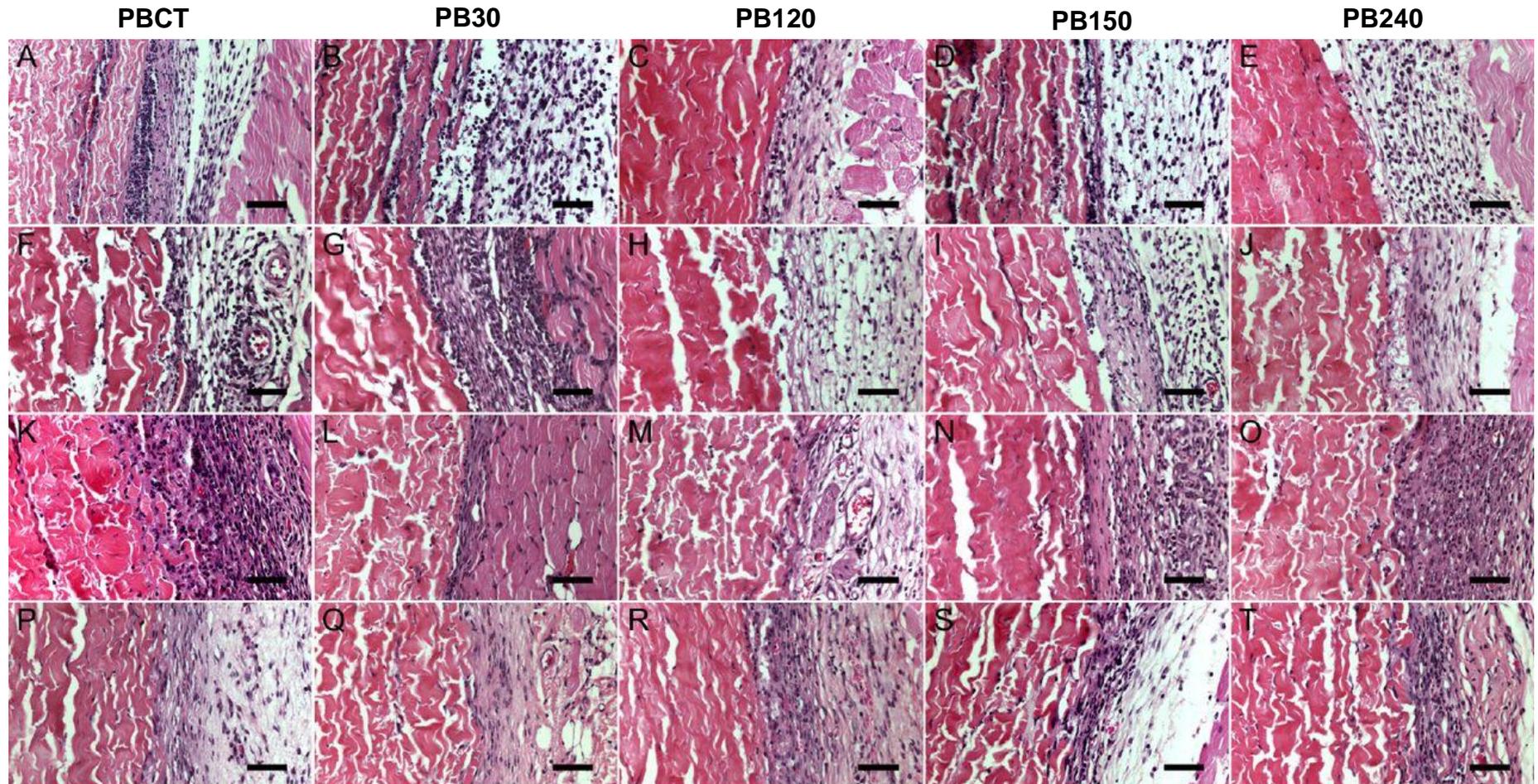
produção de IL-1 β e TNF- α foi maior nas células cultivadas em colágeno funcionalizado com O₂ e a produção de IL-10 foi maior no material tratado com N₂; o perfil pró-inflamatório do material tratado com plasma de oxigênio foi atribuído à maior rugosidade da superfície, que promove maior adesão de macrófagos e granulócitos e às mudanças químicas, como funcionalização do material com grupos hidroxila, que ativam o sistema complemento através da via alternativa.

Após os três primeiros dias de implantação, a resposta inflamatória foi similar em todas as amostras (Fig. 11 A-E), podendo ser possível observar um infiltrado inflamatório típico da fase aguda, contendo predominantemente neutrófilos. Este perfil de resposta também pode ser observado após 7 dias de implantação (Fig. 11 F-J). Aos 15 dias após a implantação (Fig. 11 K-O), é possível observar a presença de uma resposta inflamatória mais exacerbada nas amostras PB150 e PB240. O número de células diminui aos 30 dias de implantação (Fig. 11 P-T), sugerindo uma resolução da inflamação. Portanto, o tratamento com plasma não influenciou a biocompatibilidade do PB de forma significativa

Fig. 11 Avaliação da biocompatibilidade através de implantação subcutânea em camundongos.

A-E: 3 dias de implantação das amostras PBCT, F-J: 7 dias de implantação; K-O: 15 dias de implantação e P-T: 30 dias de implantação. Coloração H&E. Barra de referência 200µm

Fonte: Do autor



5 CONCLUSÃO

A modificação de materiais por plasma frio apresenta diversas vantagens. A técnica é versátil, podendo ser ajustada em diversos parâmetros, como gás utilizado, tempo de tratamento e intensidade da fonte de energia, além de ser relativamente simples e rápida. Enquanto modificações químicas normalmente exigem protocolos com múltiplos passos, a funcionalização por plasma frio é realizada em poucos minutos em um único passo, além de não utilizar solventes que podem deixar resíduos e interferir na biocompatibilidade do material. Outras vantagens se dão na preservação das propriedades mecânicas, sendo possível funcionalizar o material sem prejuízo às suas propriedades de interesse, e na homogeneidade do tratamento, que permite funcionalizar uniformemente superfícies de estruturas complexas, como válvulas cardíacas. Apesar de seu potencial, a técnica apresenta a limitação de até o momento não ser possível prever com exatidão as modificações do material.

O plasma frio de Ar e CO₂ conseguiu funcionalizar com sucesso a superfície do PB aos 120s de tratamento sem causar prejuízos a estrutura do colágeno. Foram adicionados grupos éster ao colágeno, que formaram reticulações. A caracterização do material mostrou que o tratamento com plasma diminuiu a hidrofiliabilidade das amostras de forma tempo dependente. Além disso a implantação subcutânea do PB mostrou que a funcionalização com plasma não interferiu na biocompatibilidade do material.

Uma das modificações mais realizadas no colágeno para sua utilização como biomaterial é o tratamento com glutaraldeído, que estabiliza o colágeno através do aumento de *crosslinks*. É preciso analisar a se a densidade de ligações *crosslink* induzidas pelo tratamento com plasma pode se equivaler a modificação química, pois superaria a limitação da toxicidade causada pelo glutaraldeído, além de apresentar um protocolo mais rápido e simples.

Além disso, esses resultados abrem portas para pesquisas mais aplicadas futuramente, como a verificação da eficiência do material funcionalizado em condições específicas, como no tratamento de defeitos ósseos, substituto vascular ou plataforma *drug delivery*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOUCHE, A.-R. Gabedit—A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 28, n. 1, p. 73–86, 2009.

ANDREW CHAN, K. L.; KAZARIAN, S. G. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. **Chem. Soc. Rev.**, v. 45, n. 7, p. 1850–1864, 2016.

ARYON, M.; BARBOSA, D. A. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, p. 2567–2575, 2013.

ASTM INTERNATIONAL. ASTM F2212-02, Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products (TEMPs). n. March, p. 14, 2008.

BAKSHANDEH, B. et al. Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 144–172, 2017.

BAX, D. V. et al. The linker-free covalent attachment of collagen to plasma immersion ion implantation treated polytetrafluoroethylene and subsequent cell-binding activity. **Biomaterials**, v. 31, n. 9, p. 2526–2534, 2010.

BAX, D. V. et al. Binding of the cell adhesive protein tropoelastin to PTFE through plasma immersion ion implantation treatment. **Biomaterials**, v. 32, n. 22, p. 5100–5111, 2011.

BEKESCHUS, S. et al. White paper on plasma for medicine and hygiene: Future in plasma health sciences. **Plasma Processes and Polymers**, n. April, p. 1–12, 2018.

BELBACHIR, K. et al. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. p. 829–837, 2009a.

BELBACHIR, K. et al. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 3, p. 829–837, 2009b.

BUENO, V. B. et al. Synthesis and swelling behavior of xanthan-based hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1091–1099, 2013.

CEN, L. et al. Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 492–496, 2008.

CHADEFAUX, C. et al. Curve-Fitting Micro-ATR-FTIR Studies of the Amide I and II Bands of Type I Collagen in Archaeological Bone Materials. **e-PRESERVATIONScience**, p. 129–137, 2009.

CHANGI, K. et al. Biocompatibility and immunogenicity of elastin-like recombinamer biomaterials in mouse models. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 4, p. 924–934, abr. 2018.

CHEN, F. et al. Stability of plasma treated superhydrophobic surfaces under different ambient conditions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 470, p. 221–228, maio 2016a.

CHEN, L. et al. Synthesis and cytocompatibility of collagen/hydroxyapatite nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. **Polymer Composites**, v. 37, n. 1, p. 81–90, jan. 2016b.

CHEN, R. et al. In vitro response of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to collagen films treated with cold plasma. **Polymers**, v. 9, n. 7, 2017.

CHU, P. K. et al. Plasma surface modification of biomaterials. **Mat. Sci. Eng. R**, v. 36, n. 5, p. 143–206, 2002.

CHU, P. K. Enhancement of surface properties of biomaterials using plasma-based technologies. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 19–20 SPEC. ISS., p. 8076–8082, 2007.

DONG, C.; LV, Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. **Polymers**, v. 8, n. 2, p. 1–20, 2016.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 113–136, 1998a.

FRIESS, W. Collagen - Biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 113–136, 1998b.

GAO, L. et al. Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 398–405, maio 2014.

GARCÍA, J. L. et al. Cell Proliferation of HaCaT Keratinocytes on Collagen Films Modified by Argon Plasma Treatment. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2845–2856, 20 abr. 2010.

GELAMO, ROGÉRIO VALENTIM; CARVALHO, F. H. O.; RODRIGUES, V. A.; MOSHKALEV, S. Synthesis of Carbon Nanostructures Near Room Temperature Using Microwave PECVD. **Materials Research**, v. 18, n. 4, p. 860–866, ago. 2015.

GLASSFORD, S. E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 12, p. 2849–2858, 2013.

IAFISCO, M. et al. **Electrospun nanostructured fibers of collagen-biomimetic apatite on titanium alloy** **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2012.

JUÁREZ-MORENO, J. A. et al. Effect of wettability and surface roughness on the adhesion properties of collagen on PDMS films treated by capacitively coupled oxygen plasma. **Applied Surface Science**, v. 349, p. 763–773, set. 2015.

KHAN, R.; KHAN, M. H. Use of collagen as a biomaterial: An update. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 4, p. 539–42, 2013.

KIM, S. H. et al. Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 18, n. 5, p. 609–22, 2007.

KONDYURIN, A. et al. Plasma ion implantation of silk biomaterials enabling direct covalent

immobilization of bioactive agents for enhanced cellular responses. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2018.

KWOK, D. Y.; NEUMANN, A. W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 81, n. 3, p. 167–249, set. 1999.

LAMPIN, M.; LEGRIS, C.; DEGRANGE, M. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 36, n. 1, p. 99–108, 1996.

LEE, J. H. et al. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. **Biomaterials**, v. 18, n. 4, p. 351–358, 1997.

LEE, K. et al. Preparation and characterization of multi-layered poly(ϵ -caprolactone)/chitosan scaffolds fabricated with a combination of melt-plotting/in situ plasma treatment and a coating method for hard tissue regeneration. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 42, p. 5831, 2013.

LEE, Y. C. et al. Evidence of preserved collagen in an Early Jurassic sauropodomorph dinosaur revealed by synchrotron FTIR microspectroscopy. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–8, 2017.

MENZIES, K. L.; JONES, L. The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. **Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry**, v. 87, n. 6, p. 387–399, 2010.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. **Biomaterials**, v. 28, n. 34, p. 5100–5113, 2007.

METZGER, W. et al. Surface modification by plasma etching impairs early vascularization and tissue incorporation of porous polyethylene (Medpor V) implants. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Materials**, v. 00B, n. 0, p. 1–11, 2015.

MIGUEL, F. B. et al. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 11, p. 2567–2575, 2013.

MINATI, L. et al. Plasma assisted surface treatments of biomaterials. **Biophysical Chemistry**, v. 229, n. July, p. 151–164, 2017.

MOCHIZUKI, N. et al. No Title. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. Supp, p. IT56-IT58, 1 out. 2000.

MOREIRA, P. L. et al. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 229–237, 2004.

MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. **Nature Reviews**, v. 15, n. 12, p. 771–785, 2014.

NAUTH, A. et al. Managing bone defects. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 25, n. 8, p. 462–466, 2011.

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

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

OLSEN, D. et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1547–1567, 2003.

PAIM, F. et al. Tissue response to polyanionic collagen : elastin matrices implanted in rat calvaria. **Biomaterials**, v. 24, p. 207–212, 2003.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863–1887, 2010.

PÉREZ-SÁNCHEZ, M. J. et al. Biomaterials for bone regeneration. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 15, n. 3, p. 1–6, 2010.

PETTENAZZO, E.; VALENTE, M.; THIENE, G. Octanediol treatment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: evidence of anticalcification efficacy in the subcutaneous rat model☆. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 34, n. 2, p. 418–422, ago. 2008.

PLONSKA-BRZEZINSKA, M. E. et al. Triple helical collagen-like peptide interactions with selected polyphenolic compounds. **RSC Advances**, v. 5, n. 116, p. 95443–95453, 2015.

PONCIN-EPAILLARD, F.; LEGEAY, G. Surface engineering of biomaterials with plasma techniques. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 14, n. 10, p. 1005–1028, 2003.

RABOTYAGOVA, O. S. .; CEBE, P.; KAPLAN, D. Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1420–1429, dez. 2008.

RAFAT, M. et al. Plasma surface modification and characterization of collagen-based artificial cornea for enhanced epithelialization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, n. 3, p. 2056–2064, 5 nov. 2007.

RAMÍREZ-GLINDON, E.; LLEDÓ-GIL, M. Biomaterials for bone regeneration. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 15, n. 3, p. 1–6, 2010.

REHMAN, IHTESHAM UR; MOVASAGH, ZANYAR; REHMAN, S. **Vibrational Spectroscopy for Tissue Analysis**. 1st editio ed. [s.l: s.n.].

RIAZ, T. et al. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 4928, p. 1–44, 2018.

RICH, ALEXANDER; CRICK, F. H. C. The Molecular Structure of Collagen. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 483–506, 1961.

ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 449–456, 2002.

ROY, D. et al. Label-free Imaging of Arterial Cells and Extracellular Matrix Using a Multimodal CARS Microscope. **Optics Communications**, v. 292, n. 3, p. 342–351, 2009.

SADER, M. S. et al. Production and in vitro characterization of 3D porous scaffolds made of magnesium carbonate apatite (MCA)/anionic collagen using a biomimetic approach. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 7, p. 4188–4196, 2013.

SAMOUILLAN, V. et al. Effect of Low-Temperature Plasma Jet on Thermal Stability and Physical Structure of Type I Collagen. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 40, n. 6, p. 1688–1695, 2012.

SILVA, Z. S. et al. Effect of papain-based gel on type I collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–7, 2015.

SIONKOWSKA, A.; KOZŁOWSKA, J. Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, n. 1, p. 250–259, 2013.

STENZEL, K. H.; MIYATA, T.; RUBIN, A. L. Collagen as a Biomaterial. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 231–253, jun. 1974.

STEVENS, M. M. Biomaterials for bone Materials that enhance bone regeneration have a wealth of potential. **Bone**, v. 11, n. 5, p. 18–25, 2008.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173–1213, 2007.

SUSI, H.; ARD, J. S.; CARROLL, R. J. The infrared spectrum and water binding of collagen as a function of relative humidity. **Biopolymers**, v. 10, n. 9, p. 1597–1604, 1971.

TAMBURACI, S.; TIHMINLIOGLU, F. Diatomite reinforced chitosan composite membrane as potential scaffold for guided bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 222–231, 2017.

TARABALLI, F. et al. Amino and carboxyl plasma functionalization of collagen films for tissue engineering applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, n. 1, p. 590–597, 2013.

TAYLOR, P.; OLIVEIRA, S. M.; MANO, J. F. Cell interactions with superhydrophilic and superhydrophobic surfaces. **Journal of adhesion science and technology**, v. 23, n. May 2013, p. 37–41, 2012.

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

VIDAL, B. D. C.; MELLO, M. L. S. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. **Micron**, v. 42, n. 3, p. 283–289, 2011.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 74, p. 69–117, 1998.

WANG, J. H. Surface preparation techniques for biomedical applications. In: **Coatings for Biomedical Applications**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 143–175.

WILLIAMS, D. **Tissue Engineering**. 1. ed. [s.l: s.n.].

WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450–462, mar. 2016.

YAN, Y. et al. Tailoring the wettability and mechanical properties of electrospun poly(L-lactic acid)-poly(glycerol sebacate) core-shell membranes for biomedical applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 508, p. 87–94, 2017.