

Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais
PPGE3M

Incorporação Superficial de Zinco em Titânio por Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) para
Dispositivos de Assistência Ventricular: Atividade Antibacteriana e com Células Endoteliais

KENNEDY QUEIROS PESSOA

Porto Alegre - RS

2024

Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais
PPGE3M

Incorporação Superficial de Zinco em Titânio por Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) para Dispositivos de Assistência Ventricular: Atividade Antibacteriana e com Células Endoteliais

Kennedy Queiros Pessoa

Engenheiro Civil

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Corrosão - LAPEC, da Escola de Engenharia da UFRGS, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais - PPGE3M, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia

Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Porto Alegre - RS

2024

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Célia de Fraga Malfatti

Coorientador: Prof. Dr. Joel da Silva Rodrigues

Banca Examinadora:

Dr. Victor Velho de Castro

Dr.a Estela Knopp Kerstner Baldin

Dr.a Natasha Maurmann

Dr. Leonardo Marasca Antonini

Prof. Dr. Rodrigo de Lemos Peroni

Coordenador do PPGE3M/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, José Marcelo e Maria Vanalda, aos meus irmãos, Ana Paula, Kelvin e Victoria, e ao Lucas por todo o apoio, amor e carinho durante todos esses anos de vida e de mestrado.

Agradeço à minha orientadora, Prof.a Dr.a Célia de Fraga Malfatti, e ao meu coorientador, Joel da Silva Rodrigues, pelo apoio, orientação e incentivo durante a pesquisa.

Agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC), em especial ao Matheus e à Louise, pelo apoio, carinho, aprendizado e auxílio durante a pesquisa.

Agradeço à CAPES e ao CNPq pela oportunidade e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Este estudo investiga a funcionalização da superfície do titânio comercial puro (Ti-cp) por meio do processo de *Plasma Electrolytic Oxidation* (PEO), visando a incorporação de zinco no revestimento para melhorar a ação antibacteriana e promover adesão e viabilidade celular, especialmente para uso em Dispositivos de Assistência Ventricular (DAV). A técnica PEO se destaca por formar camadas de óxidos metálicos na superfície do material, utilizando eletrólitos ecologicamente conscientes, sob altas tensões elétricas, diferenciando-se da anodização por empregar maiores potenciais e densidades de corrente. Para a realização do processo PEO, foram utilizados eletrólitos compostos por glicerol fosfato sal dissódico, acetato de magnésio, e acetato de zinco, com parâmetros elétricos específicos (tensão de 500 V, corrente de 20 A, frequência de 400Hz, e *duty cycle* de 60%) e três tempos de duração do processo PEO: 50s, 120s e 180s. Os resultados obtidos mostraram que os revestimentos formados por PEO apresentaram poros e arcabouços. O tempo de 180s proporcionou melhor morfologia para processos de endotelização, isso devido à formação de poros dentro da faixa ideal de 5-20 μm . A superfície funcionalizada das amostras apresentou-se hidrofílica ($\theta < 30^\circ$), o que pode favorecer a resposta celular e a absorção de proteínas. A análise de rugosidade das amostras indicou que superfícies tratadas por tempos mais longos apresentam rugosidade mais próxima dos implantes comerciais ($R_a = 1,0\text{-}2,0 \mu\text{m}$), promovendo uma melhor interação célula-substrato. A incorporação de zinco no revestimento foi confirmada por Fluorescência de Raios X (FRX), que evidenciou aumento da concentração de zinco com o aumento do tempo de PEO. Os testes antibacterianos revelaram que o tratamento de 180s proporcionou efeito antibacteriano eficaz contra *S. aureus* e *E. Coli*. No entanto, os testes de viabilidade celular indicaram citotoxicidade, com apenas 44% de viabilidade celular, redução maior que 30% em relação ao controle. Portanto, esse estudo demonstrou a eficácia do processo PEO na incorporação de zinco em revestimentos de Ti-cp, resultando em propriedades antibacterianas melhoradas em relação ao substrato de titânio. Porém, a citotoxicidade observada sinaliza a necessidade de otimização dos parâmetros do processo para garantir a biocompatibilidade total dos revestimentos para aplicações biomédicas, destacando a relevância do PEO como uma técnica promissora para tratamentos eletroquímicos na área biomédica, permitindo ajustes finos nas características do revestimento para atender requisitos específicos.

Palavras-chave: Plasma Electrolytic Oxidation; PEO; MAO; ação antibacteriana; modificação de superfície; biomateriais; células HUVEC.

ABSTRACT

This study investigates the functionalization of the surface of commercial pure titanium (Ti-cp) through the Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) process, aiming at the incorporation of zinc into the coating to enhance antibacterial action and promote cell adhesion and viability, especially for use in Ventricular Assist Devices (VAD). The PEO technique stands out for forming layers of metallic oxides on the material's surface, using ecologically conscious electrolytes, under high electrical voltages, differentiating itself from anodization by employing higher potentials and current densities. For the PEO process, electrolytes composed of disodium phosphate glycerol salt, magnesium acetate, and zinc acetate were used, with specific electrical parameters (voltage of 500 V, current of 20 A, frequency of 400 Hz, and a duty cycle of 60%) and three PEO process durations: 50s, 120s, and 180s. The results showed that the coatings formed by PEO presented pores and scaffolds. The 180s time provided better morphology for endothelialization processes, due to the formation of pores within the ideal range of 5-20 μm . The functionalized surface of the samples was hydrophilic ($\theta < 30^\circ$), which may favor cellular response and protein absorption. The roughness analysis of the samples indicated that surfaces treated for longer times have roughness closer to commercial implants ($R_a = 1.0\text{-}2.0 \mu\text{m}$), promoting better cell-substrate interaction. The incorporation of zinc into the coating was confirmed by X-ray Fluorescence (XRF), which showed an increase in zinc concentration with the increase of PEO time. Antibacterial tests revealed that the 180s treatment provided an effective antibacterial effect against *S. aureus* and *E. coli*. However, the cell viability tests indicated cytotoxicity, with only 44% cell viability, a reduction of more than 30% compared to the control. Therefore, this study demonstrated the effectiveness of the PEO process in incorporating zinc into Ti-cp coatings, resulting in improved antibacterial properties relative to the titanium substrate. However, the observed cytotoxicity signals the need for optimization of process parameters to ensure the total biocompatibility of the coatings for biomedical applications, highlighting the relevance of PEO as a promising technique for electrochemical treatments in the biomedical area, allowing fine adjustments in the coating characteristics to meet specific requirements.

Keywords: Plasma Electrolytic Oxidation; PEO; MAO; antibacterial action; surface modification; biomaterials; HUVEC cells.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 - Principais aplicações biomédicas do titânio e ligas..... | 8 |
| Figura 2.2 - Esquema da evolução da microestrutura do revestimento durante o processo PEO, sendo: (a) crescimento colunar do filme anódico, (b) desprendimento e crescimento coexistente, (c) transformação de filmes anódicos, e (d) crescimento do revestimento PEO..... | 16 |
| Figura 2.3 - Dois tipos de comportamento no diagrama corrente-tensão para os processos PEO: fenômenos de descarga desenvolvidos: (a) na área próxima ao eletrodo; e (b) na película dielétrica na superfície do eletrodo..... | 17 |
| Figura 2.4 - Principais tipos de comportamento da densidade de corrente em relação ao potencial de um eletrodo polarizado anodicamente em um eletrólito: a/b - dissolução, c - passivação em uma faixa de potencial pequena, d - comportamento complexo, e/f - passivação..... | 20 |
| Figura 2.5 - Representação esquemática do processo PEO e seus parâmetros principais, considerando todas as etapas de operação do processo..... | 21 |
| Figura 2.6 - Ciclo de vida do biofilme, onde mostra a adesão reversível e irreversível, a proliferação (fundação de microcolônias), o biofilme maduro e em comunidades tridimensionais, e a morte celular e início de nova dispersão, que encerra o ciclo de vida de um biofilme e o começo de outro a partir da dispersão de células planctônicas livres para colonizar novos locais..... | 26 |
| Figura 3.1 - Fluxograma do desenvolvimento do experimento..... | 36 |
| Figura 3.2 - Aparato do processo PEO..... | 38 |
| Figura 4.1 - Fotografias das amostras com revestimento, para os tempos (a) 50s, (b) 120s e (c) 180s..... | 43 |
| Figura 4.2 - Microscopia óptica 200x do revestimento obtido em processo PEO com duração de 50s..... | 43 |
| Figura 4.3 - Microscopia óptica 200x do revestimento obtido em processo PEO com duração de 120s..... | 44 |
| Figura 4.4 -Microscopia óptica 200x do revestimento obtido em processo PEO com duração de 180s..... | 44 |
| Figura 4.5 - Comparação entre as densidades de corrente das amostras em (a) geral e para os tempos (b) 50s, (c) 120 e (d) 180s..... | 49 |
| Figura 4.6 - Comparação entre as temperaturas inicial e final do procedimento..... | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.7 - Comparação do comportamento da densidade de corrente pela tensão de cada amostra..... | 51 |
| Figura 4.8 - Unidades Formadoras de Colônias/mL em superfícies do substrato Ti-cp pré-tratado (branco) e com revestimento obtido por processo PEO, para <i>S. aureus</i> | 52 |
| Figura 4.9 - Unidades Formadoras de Colônias/mL em superfícies do substrato Ti-cp pré-tratado (branco) e com revestimento obtido por processo PEO, para <i>E. coli</i> | 53 |
| Figura 4.10 - Ensaio de adesão de células HUVEC fixadas e coradas com DAPI 4 horas após a semeadura. A) Dados expressos em média e EPM da quantificação de núcleos por campo do microscópio. * indica redução estatisticamente significativa da adesão em relação a placa e ao substrato ($p \leq 0,05$). B) Imagens de microscopia de fluorescência. Fotos representativas dos núcleos das células coradas com DAPI em azul. Aumento de 200x com barra de escala de 100 μm . Placa corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura..... | 56 |
| Figura 4.11 - Ensaio de viabilidade (MTT) de contato direto de células HUVEC com os materiais após 1 dia. As células foram semeadas diretamente nos materiais (substrato e PEO). Placa corresponde as células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura, “Controle de morte” representa o controle de morte (células cultivadas nas placas e tratadas com 1% de Triton X-100) e Branco corresponde ao branco (poços sem células). Dados expressos em média e EPM. ** indica resultados com $p < 0,001$ em relação ao controle (placa) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey..... | 57 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 – Considerações para seleção de Titânio e suas ligas em aplicações biomédicas..... | 9 |
| Tabela 2.2 - Visão geral dos métodos de modificação de superfície para implantes de titânio e suas ligas..... | 11 |
| Tabela 2.3 - Comparação das propriedades da anodização e do PEO..... | 14 |
| Tabela 4.1 - Ângulo de contato para cada duração do PEO..... | 46 |
| Tabela 4.2 - Valores de Rugosidade R_a , R_z , R_{sk} e R_{ku} | 46 |
| Tabela 4.3 - Incorporação de Zn nos revestimentos..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| AC | Corrente Alternada |
| ANOVA | Análise de Variância |
| CAPES | Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CMF | Livre de Cálcio (Ca^{2+}) e Magnésio (Mg^{2+}) |
| CP | Comercialmente Puro |
| Ti-cp | Titânio Comercial Puro |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol |
| DAV | Dispositivos de Assistência Ventricular |
| DC | Corrente Contínua |
| DCV | Doenças CardioVasculares |
| DLC | <i>Diamond-Like Carbon</i> |
| DMEM | Meio de Eagle Modificado por Dulbecco |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido-desoxirribonucleico |
| ECM | Matriz Extracelular |
| EPM | Erro Padrão Médio |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FRX | Fluorescência de Raios X |
| HA | Hidroxiapatita |
| HUVEC | Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana |
| IC | Insuficiência Cardíaca |
| ISO | Organização Internacional de Normalização |
| LACOR | Laboratório de Corrosão, Proteção e Reciclagem de Materiais |
| LAPEC | Laboratório de Pesquisa em Corrosão |
| LB | Luria Bertani |
| MAO | <i>Micro-Arc Oxidation</i> |
| MO | Microscopia Óptica |
| MTT | (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | Tampão Fosfato-Salino |
| PCO | <i>Plasma Chemical Oxidation</i> |
| PEO | <i>Plasma Electrolytic Oxidation</i> |
| pH | Potencial de Hidrogênio |

| | |
|---------|---|
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| Ti6Al4V | Liga titânio, Alumínio e Vanádio |
| UFC | Unidade Formadora de colônia |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|---------------------|
| ~ | Aproximadamente |
| # | Grana |
| % | Porcentagem |
| < | Menor que |
| = | Igual |
| > | Maior que |
| ° | Graus |
| °C | Grau Celsius |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrômetro |
| µs | Microsegundos |
| A | Ampère |
| Ag | Prata |
| Al | Alumínio |
| B | Boro |
| Ca | Cálcio |
| C | Carbono |
| Cl | Cloro |
| cm ² | Centímetro Quadrado |
| Co | Cobalto |
| Cr | Cromo |
| Cu | Cobre |
| dm ² | Decímetro Quadrado |
| g | Grama |
| H | Hidrogênio |
| h | Hora |
| Hz | Frequência, Hertz |
| L | Litro |
| Mg | Magnésio |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |

| | |
|----------|---------------------------------------|
| M | Molar |
| Mn | Manganês |
| Na | Sódio |
| nm | Nanômetro |
| N | Nitrogênio |
| O | Oxigênio |
| P | Fósforo |
| p | Valor-P |
| R_a | Rugosidade Média |
| R_{ku} | Rugosidade Curtose |
| R_q | Rugosidade do Desvio Médio Quadrático |
| R_{sk} | Rugosidade Assimétrica |
| R_z | Rugosidade de Profundidade Média |
| S | Enxofre |
| Si | Silício |
| Sr | Estrôncio |
| s | Segundos |
| Ta | Tântalo |
| Ti | Titânio |
| U | Tensão |
| U | Unidades |
| V | Vanádio |
| V | Volts |
| x | Veze |
| Zn | Zinco |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 OBJETIVOS | 4 |
| 1.1.1 Geral | 4 |
| 1.1.2 Específicos | 4 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA | 4 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 2.1 Biomateriais metálicos | 6 |
| 2.2 Titânio e suas ligas | 7 |
| 2.3 Anodização assistida por plasma (PEO) | 11 |
| 2.3.1 Fenômeno de crescimento e mecanismo de formação do revestimento | 15 |
| 2.3.2 Principais parâmetros do processo PEO | 20 |
| 2.4 Contaminação de superfícies por biofilme bacteriano | 25 |
| 2.4.1 Staphylococcus aureus | 27 |
| 2.4.2 Escherichia coli | 28 |
| 2.5 Propriedades físico-químicas de superfícies para aplicações biomédicas | 29 |
| 2.5.1 Molhabilidade | 29 |
| 2.5.2 Rugosidade | 30 |
| 2.5.3 Interação célula-substrato | 31 |
| 2.5.4 Adesão de células HUVEC e citotoxicidade | 33 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 3.1 Pré-tratamento do substrato metálico de Ti-cp | 37 |
| 3.2 Processo PEO | 37 |
| 3.3 Caracterizações | 39 |
| 3.3.1 Reprodutibilidade e Influências dos Parâmetros PEO | 40 |
| 3.4 Ensaio de adesão bacteriana | 40 |
| 3.5 Ensaios de adesão e viabilidade celular | 41 |
| 3.5.1 Cultura das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) | 41 |
| 3.5.2 Avaliação da adesão celular (DAPI e microscopia) | 41 |
| 3.5.3 Viabilidade celular por atividade mitocondrial (MTT) | 42 |
| 3.5.4 Análise estatística | 42 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 43 |
| 4.1 Caracterizações de superfície | 43 |
| 4.1.1 Reprodutibilidade e Influências dos Parâmetros PEO | 49 |
| 4.2 Análise da Atividade Antibacteriana do Revestimento | 52 |
| 4.3 Adesão e Viabilidade de Células HUVEC | 55 |
| 5. CONCLUSÕES | 58 |
| TRABALHOS FUTUROS | 60 |
| REFERÊNCIAS | 61 |
| ANEXO | 73 |

1. INTRODUÇÃO

O titânio e suas ligas têm várias propriedades desejáveis, tais como alta resistência, módulo de elasticidade suficiente para variadas aplicações, resistência à corrosão e capacidade de passivação, baixa densidade e biocompatibilidade. Consequentemente, esse metal vêm sendo amplamente empregado nas mais diversas indústrias, como: aeronáutica, automobilística, equipamentos esportivos e aplicações biomédicas (ASL *et al.*, 2023).

A demanda por implantes biomédicos duráveis está em constante crescimento no mundo todo. Materiais à base de titânio, como o comercialmente puro (Ti-cp), são amplamente explorados como biomateriais metálicos, especialmente nas áreas de implantologia dental e maxilofacial. O Ti-cp demonstra as características essenciais na indústria biomédica, como baixa rigidez, alta resistência à corrosão e biocompatibilidade (SOTNICZUK *et al.* 2023).

Revestimentos obtidos por "*Plasma Electrolytic Oxidation*" (PEO) - referido também como "*Micro-Arc Oxidation*" (MAO), "*Plasma Chemical Oxidation*" (PCO) e "*Anodic Oxidation by Spark Discharge*" - têm emergido como uma tecnologia promissora para a funcionalização superficial de materiais destinados às aplicações biomédicas. O PEO é um tratamento eletroquímico de conversão que permite a formação de uma camada de óxidos metálicos na superfície do material. Embora seja semelhante à anodização, o PEO emprega valores mais elevados de potencial e densidade de corrente, resultando na geração de plasma na superfície da amostra. Esses revestimentos oferecem diversas vantagens, tais como a capacidade de ajustar a composição a partir da incorporação de elementos na matriz metálica, o controle da microestrutura em termos de espessura e porosidade do revestimento, bem como a resistência ao desgaste e à corrosão (SANTOS, 2022; SUNIL; KIRAN; RAMAKRISHNA, 2022; SIKDAR *et al.*, 2021).

O processo PEO faz uso, geralmente, de eletrólitos alcalinos fracos ou ácidos fracos, que são ecologicamente corretos, e produzem revestimentos de óxidos que são formados sob aplicação de altas tensões elétricas. Durante o processo, a espessura do óxido formado na superfície do substrato cresce na faixa de dezenas a centenas de microns, o que pode elevar a resistência à corrosão, a resistência ao desgaste e as propriedades de barreira térmica. Dados os métodos de se produzir o PEO, ele tem sido considerado uma ótima abordagem para aplicações biomédicas, eletrônicas, aeroespaciais e automotivas do que outros tratamentos convencionais de modificação da superfície (SIKDAR *et al.*, 2021).

A incorporação de diferentes elementos e íons nos revestimentos tem demonstrado contribuições significativas em diversas propriedades para aplicações biomédicas (SUNIL; KIRAN; RAMAKRISHNA, 2022):

- O elemento boro (B) acelera a proliferação celular (GÜLTAN; YURTSEVER; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2020; CHUKWUIKE; SHTANSKY; SUBRAMANIAN, 2021), enquanto o cobre (Cu) introduz propriedades antimicrobianas (LIU *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020). O estrôncio (Sr) melhora a bioatividade e favorece a remodelação óssea (ULLAH *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020), enquanto o zinco (Zn) promove uma melhor osteogenicidade e propriedades antimicrobianas (YE *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2021). A prata (Ag) exhibe propriedades antimicrobianas excelentes (THUKKARAM *et al.*, 2020).
- O elemento cálcio (Ca) melhora a bioatividade, a osteointegração e a osteogenicidade (ZHANG *et al.*, 2020; CAI *et al.*, 2020). O tântalo (Ta) melhora as propriedades mecânicas e aumenta a osteointegração da superfície, além de estimular o crescimento ósseo (MCNAMARA *et al.*, 2021). O oxigênio (O) acelera a diferenciação celular e a osteointegração (CHEN *et al.*, 2020).
- O nitrogênio (N) melhora a resistência à corrosão, o crescimento de células ósseas e possui propriedades antibacterianas (CISTERNAS *et al.*, 2020; ZHENG; SHI; LIU, 2020). O manganês (Mn) promove propriedades osteogênicas e antimicrobianas (FADEEVA *et al.*, 2020), enquanto o magnésio (Mg) introduz propriedades antibacterianas (ALMEHMADI, 2021).

Essas contribuições demonstram a importância de escolher e combinar cuidadosamente os elementos e íons a serem incorporados nos revestimentos para obter as propriedades desejadas, como melhor proliferação celular, bioatividade, osteointegração, resistência à corrosão e propriedades antimicrobianas. A otimização dessas características é essencial para o desenvolvimento de materiais revestidos avançados e eficazes para aplicações biomédicas (SUNIL; KIRAN; RAMAKRISHNA, 2022).

Os Dispositivos de Assistência Ventricular (DAV) são comumente relacionados a corações artificiais e podem servir como bombas de sangue para ajudar na circulação sanguínea do ventrículo esquerdo, do ventrículo direito, ou de ambos. Essa forma de assistência circulatória mecânica envolve a implantação de uma bomba de sangue, seja paracorpórea ou intracorpórea, para estabilizar parcial ou totalmente as funções de bombeamento do coração. Enquanto o órgão enfraquecido ainda tenta desempenhar sua

função, o DAV pode fornecer suporte circulatório temporário ou permanente ao sistema cardiovascular (SÁ, 2017; BOCK, 2020).

O tecido endotelial é uma camada celular interna presente em todo o sistema circulatório, cardíaco e linfático, com cerca de 600 metros quadrados de superfície. Ele atua como uma membrana semipermeável que regula o tráfego de moléculas e as funções de síntese e metabolismo de substâncias vasoativas. Além disso, é composto por uma única camada de células achatadas com alta proporção de enzimas e receptores na superfície celular. Também, é capaz de estimular a formação de novos vasos sanguíneos através da produção de várias substâncias, incluindo a trombomodulina (SÁ, 2017).

Implantes médicos em contato com tecido endotelial devem atender a vários requisitos, tais como (MURPHY; BLACK; HASTINGS, 2016; WAGNER *et al.*, 2020; KING; FRIES; JOHNSON, 2014):

- Biocompatibilidade: a superfície do implante não deve causar toxicidade local ou sistêmica e nem provocar uma resposta imunológica inadequada que possa prejudicar a função celular normal do tecido endotelial.
- Baixa trombogenicidade: o implante deve minimizar a formação de coágulos sanguíneos que possam obstruir a circulação sanguínea local.
- Resistência mecânica adequada: o implante deve ter resistência suficiente para suportar as forças mecânicas exercidas no local da implantação sem deformação, fratura ou desgaste excessivo.
- Capacidade de promover a adesão celular: a superfície do implante deve ser projetada para permitir que as células endoteliais adiram e cresçam, promovendo a integração do implante com o tecido circundante.
- Capacidade de integração ao tecido circundante: o implante deve ser capaz de interagir com as células e os componentes do tecido circundante, incluindo as células endoteliais, para promover a integração do implante e a restauração da função tecidual normal.

Sá (2017) estudou a biocompatibilidade de revestimentos de óxido em Dispositivos de Assistência Ventricular (DAV) de Ti-cp e projetado para ser compatível com tecido endotelial. O eletrólito empregado foi a base de Glicerofosfato de Sódio e Acetato de Magnésio. Neste trabalho estudar-se-á a incorporação de zinco em revestimentos produzidos por meio de processo PEO conforme o estudo de Sá (2017), acrescentando-se Acetato de Zinco no eletrólito a fim de se obter e/ou melhorar as propriedades de ação antibacteriana e viabilidade celular.

Esta dissertação tem enfoque na incorporação de zinco em superfícies de Ti-cp funcionalizadas por PEO para aplicações biomédicas, especificamente visando a ação antibacteriana em revestimentos para Dispositivos de Assistência Ventricular (DAVs) em contato com tecido endotelial. A pesquisa busca explorar o processo PEO como um tratamento eletroquímico para criar camadas de óxido de metal em superfícies de Ti-cp, melhorar as propriedades antibacterianas do material e aumentar a viabilidade celular, características essas que são fundamentais para a biocompatibilidade de implantes biomédicos. O processo atende à crescente demanda por implantes biomédicos duráveis com melhor biocompatibilidade e resistência à contaminação bacteriana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Funcionalizar a superfície do titânio comercial (Ti-cp) por meio de processo de anodização assistida por plasma (PEO), incorporando zinco a partir do eletrólito, visando obter ação antibacteriana e adesão e viabilidade celular (empregando-se Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana - HUVEC) para uso em dispositivos DAV (Dispositivos de Assistência Ventricular).

1.1.2 Específicos

Visando atender o objetivo geral, seguem os seguintes objetivos específicos:

- Incorporar zinco na camada de revestimento superficial do Ti-cp por meio de processo PEO;
- Caracterizar a morfologia e composição química do revestimento de óxido formado;
- Avaliar a atividade antibacteriana do revestimento formado;
- Avaliar o comportamento celular sobre o Ti-cp funcionalizado pelo processo PEO por meio de ensaios de adesão e viabilidade com células endoteliais.

1.2 JUSTIFICATIVA

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no Brasil e na maior parte do mundo. De 1990 a 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê o aumento das doenças cardíacas de aproximadamente 120% para as mulheres e de 137% para

os homens; e ainda afirma que no Brasil, até 2040, o índice de doenças cardiovasculares aumentará em 250% (AVEZUM; MAIA; MARCELO, 2012).

No período entre 1999 e 2008, registrou-se uma redução na taxa anual de mortalidade de pacientes na lista de espera por transplantes cardíacos nos Estados Unidos da América (EUA). De acordo com o estudo conduzido por Johnson *et. al.* (2010), observou-se uma diminuição de 199/1000 pacientes em 1999 para 170/1000 em 2008. Essa queda pode ser atribuída ao aumento da utilização de dispositivos de assistência circulatória mecânica, como o Dispositivo de Assistência Ventricular (DAV), como uma terapia adicional no tratamento da insuficiência cardíaca. (JOHNSON *et al.*, 2010).

O uso de Dispositivos de Assistência Ventricular (DAV) específicos para cada caso clínico é indicado para pacientes com insuficiência cardíaca (IC) grave por baixo débito cardíaco, falência ventricular crônica ou "remodelamento ventricular", pois essa terapia ajuda a reverter as alterações estruturais do músculo cardíaco e melhora a função do órgão e do sistema circulatório (SÁ, 2017). Aprimorar os componentes de dispositivos de assistência ventricular (DAV) por meio de processos de modificação de superfície é necessário para melhorar sua biofuncionalidade (SÁ, 2017; SUNIL; KIRAN; RAMAKRISHNA, 2022).

Uma superfície endotelizada é desejável por apresentar excelente biocompatibilidade e resistência à trombose. Para obter uma camada neoíntima em dispositivos médicos implantáveis, é necessário conhecer a anatomia e fisiologia do órgão alvo, o tempo de implante e as propriedades mecânicas do implante e do biomaterial. Um revestimento neoíntimo pode ser obtido por meio do crescimento de células endoteliais ou da adsorção de células e proteínas constituintes do sangue circulante, como as hemácias e a albumina, sobre a superfície do implante (SÁ, 2017).

Com a aplicação de processo PEO é possível modificar a superfície do metal e incorporar/aprimorar as propriedades desejadas, sendo o zinco uma ótima opção por ele proporcionar propriedades antimicrobianas, o que indica sua habilidade em defender o revestimento contra bactérias, e outros micro-organismos que podem causar doenças (SUNIL; KIRAN; RAMAKRISHNA, 2022).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais metálicos

Um biomaterial é um material natural ou sintético que pode ser utilizado em diferentes aplicações, como engenharia de tecidos, bioeletrodos e biossensores, entrega de medicamentos, terapia genética, diagnóstico de doenças e melhoria dos cuidados de saúde. A principal característica de todos os biomateriais é a sua capacidade de interagir com sistemas vivos. No entanto, os efeitos tanto do biomaterial nos tecidos do hospedeiro quanto do sistema vivo podem levar a interações imunológicas (locais e sistêmicas) e, assim, causar falhas do dispositivo, desconforto ao paciente ou até mesmo fatalidade; portanto, os biomateriais devem ser biocompatíveis (OMIDI, 2017).

Os biomateriais são comumente definidos como materiais destinados a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Antes que um novo biomaterial seja introduzido no mercado, várias questões são consideradas, incluindo sua localização anatômica designada, estrutura de tecido funcional e patobiologia, requisitos mecânicos e outras propriedades, toxicologia, biocompatibilidade, processo de cicatrização, ética, padronização e regulamentação (ELIAZ, 2019; ZHANG, 2019).

A biocompatibilidade é o comportamento de um material que não causa reações adversas em um tecido vivo, como toxicidade, reatividade fisiológica ou resposta imunológica. Os biomateriais podem ser metais, cerâmicas, polímeros, hidrogéis ou materiais compostos, amplamente utilizados na literatura para engenharia de tecidos orais e dentários ou outras aplicações relevantes (OMIDI, 2017; BRUNETTE *et al.*, 2001).

Um material biocompatível atua com uma resposta adequada do hospedeiro (ou seja, mínima perturbação da função normal do corpo) em uma aplicação específica. Portanto, o material não causa resposta trombogênica, tóxica ou inflamatória alérgica quando colocado *in vivo*. Existem dois fatores-chave que determinam a biocompatibilidade de um material: as reações do hospedeiro induzidas pelo material e a degradação do material no ambiente corpóreo. Muitas vezes, ambos os fatores devem ser considerados (ELIAZ, 2019; ZHANG, 2019; KAUR; SINGH, 2019; BRUNETTE *et al.*, 2001).

Os biomateriais são extensivamente utilizados em diferentes campos médicos: como biomateriais cardiovasculares, para geração de substitutos de pele, em sistemas de entrega de medicamentos e no tratamento do câncer (KAUR; SINGH, 2019).

Os biomateriais metálicos são um dos grupos mais comumente usados para implantes. A utilidade desses materiais metálicos se baseia em grande parte na formação de uma camada de óxido fina, mas protetora. A camada de óxido se forma após a exposição ao oxigênio e se reconstitui em milissegundos após o dano. Essa camada reduz a corrosão *in vivo*, um dos principais requisitos de um biomaterial eficiente. Os outros requisitos incluem biotolerabilidade, bioadesão, biofuncionalidade (bioatividade após tratamento superficial) e processabilidade. Na prática, cada metal ou liga, ou seja, ligas de titânio, aço inoxidável e ligas Co-Cr, tem suas próprias vantagens para diferentes aplicações baseadas em propriedades mecânicas, químicas e biofuncionais. Geralmente, os biomateriais metálicos são usados para aplicações estruturais, como implantes, pinos e andaimes ósseos, devido às suas excelentes propriedades mecânicas, como módulo de Young, resistência à tração, ductilidade, fadiga e resistência ao desgaste. No entanto, eles podem ser usados para dispositivos puramente funcionais, como gaiolas para bombas, válvulas e marca-passos cardíacos (MURPHY; BLACK; HASTINGS, 2016).

2.2 Titânio e suas ligas

Materiais à base de titânio despertam crescente interesse como materiais estruturais biocompatíveis com propriedades mecânicas e biocompatibilidade aprimoradas em várias aplicações biomédicas. A indústria frequentemente utiliza titânio (Ti) e suas ligas devido à alta resistência do metal à corrosão, oxidação e fragilidade em altas temperaturas. Em comparação com outros materiais, ligas de titânio (Ti) apresentam resistência à tração, resistência ao calor e propriedades mecânicas superiores. O titânio e suas ligas têm sido utilizados em diversos campos, incluindo aeroespacial, construção e indústrias de saúde, devido à sua versatilidade (GUMMADI; ALANKA, 2023).

O titânio é um material altamente bem-sucedido para implantes médicos, sendo amplamente utilizado em próteses ortopédicas, implantes dentários e até próteses faciais personalizadas. Sua aplicação na medicina é abrangente, incluindo áreas cardiovasculares. O titânio CP (Comercialmente Puro) é preferido por cirurgiões dentistas devido às suas excelentes propriedades biomecânicas e biológicas, como resistência mecânica, baixo módulo de elasticidade e biocompatibilidade. A escolha do titânio e suas ligas nessas aplicações é baseada em sua resistência à corrosão, biocompatibilidade e capacidade de se integrar com o osso e tecidos. Apesar de suas vantagens, o titânio é inerte e resistente à corrosão devido à formação de um filme passivo de TiO₂ em condições fisiológicas. Estudos mostram que

algumas ligas de titânio não se integram tão bem com os ossos quanto o titânio comercialmente puro, devido a suas altas taxas de corrosão (SANTOS, 2022).

A liga Ti6Al4V é amplamente usada em implantes cirúrgicos devido às suas propriedades, como a passivação oxidativa, alta resistência à tração e limite de escoamento, e baixo módulo de elasticidade. No entanto, a liberação de elementos de liga pode causar respostas inflamatórias no corpo humano. Além disso, a superfície dos implantes favorece a adesão bacteriana e formação de biofilmes, prejudicando o biomaterial. Assim, modificações superficiais nos implantes de titânio são essenciais para melhorar seu desempenho em propriedades mecânicas, resistência à corrosão, biocompatibilidade e inibição da formação de biofilmes (BULLMANN, 2023).

A Figura 2.1 exemplifica as principais aplicações do titânio e ligas para implantes biomédicos.

Figura 2.1 - Principais aplicações biomédicas do titânio e ligas



Fonte: Sasikumar, Indira e Rajendran, 2019.

A Figura 2.1 exemplifica as principais aplicações biomédicas do titânio e ligas elencado por Sasikumar, Indira e Rajendran (2019), sendo elas:

- Placas cranianas;

- Implantes dentários;
- *Stents* cardíacos artificiais;
- Articulações artificiais do quadril;
- Articulações do joelho;
- Parafusos e placas ósseas.

Para se escolher o titânio e suas ligas deve ser observada uma série de requerimentos, que variam conforme a finalidade de uso. Ronoh *et al.* (2022) destacam que para aplicações biomédicas devem ser considerados os requerimentos apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Considerações para seleção de Titânio e suas ligas em aplicações biomédicas

| Requerimentos | |
|------------------------|---|
| Biocompatibilidade | <ul style="list-style-type: none"> ● Biocompatibilidade refere-se à capacidade de dispositivos biomédicos funcionarem sem efeitos adversos no local de implantação ou tecidos próximos. ● O material do implante deve ser quimicamente inerte, não tóxico e não alergênico para garantir biocompatibilidade. ● A avaliação inclui análise de compatibilidade tecidual, citotóxica e hemocompatível por meio de vários métodos. ● Desafios comuns são trombose e tecido fibroso ao redor dos implantes. ● A reação do corpo e a degradação pós-implantação afetam a biocompatibilidade. ● Existem quatro tipos de implantes: biotolerantes, bioinertes, bioativos e bioabsorvíveis. ● Titânio e suas ligas são exemplos de materiais biocompatíveis devido à sua inércia, resistência à corrosão e camada adesiva de TiO₂. |
| Propriedades Mecânicas | <ul style="list-style-type: none"> ● Os biomateriais requerem biocompatibilidade mecânica para uma implantação bem-sucedida a longo prazo. ● As propriedades mecânicas dos biomateriais devem ser adequadas para o correto funcionamento após o implante. ● Considerações importantes incluem resistência à tração, dureza, módulo de elasticidade (Young), resistência à fadiga e alongamento. ● As propriedades mecânicas dos biomateriais devem se assemelhar às do osso natural. ● A dureza afeta o desgaste e a adequação para uso clínico. ● Um baixo módulo de elasticidade (Young) ajuda a prevenir o efeito de blindagem de estresse, a reabsorção óssea e o afrouxamento do implante. ● Alta resistência mecânica é essencial para suportar cargas e evitar fraturas. ● Ligas de titânio demonstram comportamento mecânico favorável semelhante ao dos ossos humanos. ● Ligas de titânio são comumente usadas em aplicações biomédicas devido ao seu baixo módulo de elasticidade e resistência suficiente à fadiga. |
| Resistência à corrosão | <ul style="list-style-type: none"> ● Comportamento de corrosão de biomateriais metálicos é crucial devido à liberação de íons do implante, podendo causar problemas de biocompatibilidade, como trombose. ● A corrosão, resultante de reações químicas com o ambiente circundante, afeta significativamente a biocompatibilidade dos implantes. ● Taxas mais elevadas de corrosão levam a mais íons tóxicos, resultando em incompatibilidade com ossos e tecidos humanos. ● A corrosão também impacta a vida útil do implante e pode causar falha biomecânica. |

| | |
|-------------------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Diferentes tipos de corrosão, como uniforme, por pites e por trincas de estresse, podem ocorrer, liberando íons metálicos nocivos e causando reações adversas em seres humanos. • O titânio e suas ligas apresentam melhor resistência à corrosão devido à rápida formação de uma camada protetora de óxido. • Técnicas de modificação da superfície, como revestimento e processamento por feixe de íons, são promissoras para melhorar o desempenho do implante, aumentando sua resistência à corrosão através da formação de uma fina camada protetora. |
| Resistência ao desgaste | <ul style="list-style-type: none"> • O comportamento de desgaste de biomateriais é crucial devido à potencial resposta celular adversa causada pela liberação de partículas de desgaste dos implantes, levando à inflamação, dor, reabsorção óssea e liberação de enzimas prejudiciais. • O desgaste dos implantes é influenciado pela articulação das articulações artificiais e afeta significativamente a longevidade dos implantes metálicos. • A resistência ao desgaste de um implante é um fator crucial na seleção de biomateriais, pois afeta a biocompatibilidade, reduzindo a liberação de íons metálicos no corpo, o que pode causar reações alérgicas e toxicidade. • Para lidar com a baixa resistência ao desgaste do titânio e suas ligas, tratamentos de superfície como nitretação a plasma e revestimentos como o nitreto de titânio (TiN) têm sido utilizados para aumentar a resistência ao desgaste, resistência à corrosão, dureza da superfície e vida útil geral dos implantes. |
| Osseointegração | <ul style="list-style-type: none"> • A osseointegração é o processo crucial de integrar um implante com células e tecidos ósseos após sua colocação, garantindo uma fixação segura ao osso sem o desenvolvimento de tecido fibroso problemático. • A osseointegração bem-sucedida é essencial para a eficácia e segurança de longo prazo do implante. • A integridade da superfície do implante desempenha um papel significativo na osseointegração, com fatores como a rugosidade, química e topografia da superfície sendo essenciais para promover uma boa integração. • O revestimento da superfície dos implantes com materiais específicos melhora a osseointegração, estimulando a adesão de osteoblastos e facilitando o reconhecimento das células. • O titânio e suas ligas são conhecidos por sua alta taxa de osseointegração, embora eles formem uma conexão direta, em vez de uma ligação química, com o tecido ósseo, o que pode ser aprimorado por meio de métodos adequados de tratamento da superfície. • Alcançar a osseointegração ótima continua sendo uma área de pesquisa contínua, e manter a biocompatibilidade dos materiais do implante é crucial para o sucesso da regeneração e integração com as células do hospedeiro. |
| Processabilidade | <ul style="list-style-type: none"> • As características materiais dos biomateriais de titânio são influenciadas pela microestrutura, que pode ser controlada por processamento termo-mecânico e tratamento térmico. • Ligas de titânio alfa e beta têm microestruturas distintas e podem ser manipuladas para melhorar suas propriedades biomateriais para uso médico. • O titânio pode exibir diferentes microestruturas, como equiaxiais, transformadas, Widmanstätten ou beta metaestável, cada uma com propriedades mecânicas específicas. • Estruturas conformadas têm maior resistência à tração anisotrópica, mas menor ductilidade, enquanto estruturas equiaxiais recristalizadas são mais dúcteis, mas têm menor resistência. • A seleção de ligas de titânio para implantes visa criar dispositivos duráveis que melhorem a qualidade de vida do paciente, baseando-se nessas considerações. |

Fonte: O autor, baseado em Ronoh *et al.* (2022).

2.3 Anodização assistida por plasma (PEO)

A modificação de superfície é vital para superar esses problemas, cumprindo exigências clínicas específicas, como melhorar a aderência na interface implante-osso, resistência ao desgaste, corrosão e biocompatibilidade. A busca por propriedades superficiais específicas impulsiona a necessidade de adaptar dispositivos médicos de titânio, empregando diversas técnicas, como deposição atômica e implantação iônica, para otimizar a interação com substratos metálicos. A engenharia de superfície desempenha um papel crucial no desenvolvimento de dispositivos médicos aprimorados, considerando as interações entre materiais e sistemas biológicos, e métodos como a eletrólise convencional com plasma atmosférico emergem como opções promissoras para modificar superfícies sem afetar as propriedades volumétricas dos materiais (SASIKUMAR; INDIRA; RAJENDRAN, 2019; BRUNETTE *et al.*, 2001; SÁ, 2017; LIU; CHU; DING, 2004).

A tabela 2.2 exibe uma visão geral dos principais métodos de modificação superficial para implantes de titânio e liga.

Tabela 2.2 - Visão geral dos métodos de modificação de superfície para implantes de titânio e suas ligas

| Métodos de modificação superficial | Camada modificada | Objetivo |
|---------------------------------------|--|---|
| Métodos Mecânicos | | |
| Usinagem | Superfície rugosa ou lisa formada pelo processo de subtração | Produzir topografias de superfície específicas; superfície limpa e áspera; melhorar a adesão na colagem |
| Esmerilhamento | | |
| Polimento | | |
| Detonação | | |
| Métodos Químicos | | |
| Tratamento Químico | | |
| Tratamento ácido | <10 nm de camada de óxido de superfície | Remover as escamas de óxido e a contaminação |
| Tratamento alcalino | ~ 1 µm de gel de titanato de sódio | Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea |
| Tratamento com peróxido de hidrogênio | ~ 5 nm de óxido interno denso e camada externa porosa | Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea |

| | | |
|---|--|---|
| Sol-gel | ~10 µm de filme fino, como fosfato de cálcio, TiO ₂ e sílica | Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea |
| Oxidação anódica | ~10 nm a 40 µm de camada de TiO ₂ , adsorção e incorporação de ânions do eletrólito | Produzir topografias de superfície específicas; melhor resistência à corrosão; melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea |
| CVD | ~1 µm de filme fino de TiN, TiC, TiCN, diamante e <i>Diamond-Like Carbon</i> (DLC) | Melhorar a resistência ao desgaste, resistência à corrosão e compatibilidade com o sangue |
| Métodos bioquímicos | Modificação por titânia silanizada, fotoquímica, monocamadas automontadas, resistência a proteínas, etc. | Induzir resposta específica de células e tecidos por meio de peptídeos, proteínas ou fatores de crescimento immobilizados na superfície |
| Métodos Físicos | | |
| <i>Thermal Spray</i> | | |
| <i>Flame spray</i> | ~30 a ~200 µm de revestimentos, como titânio, HA, silicato de cálcio, Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ , TiO ₂ | Melhorar a resistência ao desgaste, resistência à corrosão e propriedades biológicas |
| <i>Plasma spray</i> | | |
| HVOF | | |
| DGUN | | |
| PVD | | |
| Evaporação | ~1 µm of TiN, TiC, TiCN, <i>diamond and diamond-like carbon thin film</i> | Melhorar a resistência ao desgaste, resistência à corrosão e compatibilidade com o sangue |
| Revestimento iônico | | |
| <i>Sputtering</i> | | |
| Implantação e deposição de íons | | |
| Implantação iônica <i>beam-line</i> | ~10 nm de camada superficial modificada e/ou ~µm de filme fino | Modificar a composição da superfície; melhorar o desgaste, resistência à corrosão e biocompatibilidade |
| PIII | | |
| Tratamento de plasma de descarga luminescente, ou plasma frio | ~1 nm a ~100 nm de camada de superfície modificada | Limpe, esterilize, óxido, superfície de nitreto; remover camada de óxido nativo |

Fonte: O autor, adaptado de Liu; Chu; Ding (2004).

A Anodização e a Oxidação por Micro-Arcos (MAO) são processos sofisticados de tratamento de superfície que desempenham papéis cruciais na melhoria das propriedades de

metais, especialmente titânio e suas ligas. É importante entender as diferenças entre anodização e MAO:

- A anodização, ou oxidação anódica (“*anodic oxidation*”), envolve reações eletroquímicas e a difusão de íons de metal e oxigênio, resultando na formação de um filme de óxido na superfície do ânodo. Diferentes ácidos diluídos, como ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4) e ácido acético, podem ser usados como eletrólitos. Este processo melhora a adesão e ligação do titânio, sendo fundamental na indústria aeroespacial. A espessura do filme de óxido é controlada pela voltagem aplicada, tornando-o versátil para produzir filmes protetores em metais (LIU; CHU; DING, 2004).
- A Oxidação por Micro-Arcos (“*Micro-Arc Oxidation*” - MAO, ou “*Plasma Electrolytic Oxidation*” - PEO) é uma técnica avançada derivada da anodização, usada para criar revestimentos cerâmicos em metais como titânio, alumínio, zircônio e magnésio. Durante o PEO, a amostra atua como ânodo em uma solução aquosa sob alta voltagem. Isso gera faíscas na superfície da amostra, resultando em revestimentos porosos com dureza, resistência ao desgaste e aderência superiores. Estes revestimentos porosos melhoram a biocompatibilidade do titânio, sendo valiosos em aplicações biomédicas. Parâmetros como escolha do substrato, eletrólito, temperatura e voltagem influenciam as propriedades dos revestimentos, com voltagens mais altas levando a diferentes morfologias superficiais e podendo influenciar nas atividades de culturas biológicas. Apesar do potencial, desafios como custos energéticos, uniformidade de revestimento em formas complexas e compreensão limitada dos mecanismos subjacentes requerem mais estudos (ZHANG; CHEN; WANG, 2020).

Nos processos eletrolíticos convencionais, uma diferença de potencial aplicada no sistema desencadeia reações governadas pela lei da eletroquímica. Em tensões relativamente baixas, a cinética dos processos nos eletrodos pode ser descrita pela lei de Faraday e pelas leis de Ohm, que relacionam a tensão e a corrente elétrica. Quando a tensão atinge um valor específico, as características do sistema mudam significativamente, e o processo assume características de um plasma eletrolítico, evidenciado pela formação de micro arcos (SÁ, 2017). A Tabela 2.3 mostra de forma comparativa as as propriedades decorrentes dos processos de anodização e de plasma eletrolítico.

Tabela 2.3 - Comparação das propriedades da anodização e do PEO.

| Propriedades | Anodização | PEO |
|-------------------------------|------------|--|
| Voltagem (V) | 20 - 80 | 120 - 300 |
| Corrente (A/dm ²) | < 10 | < 30 |
| Pré-tratamento | Crítico | Menos crítico |
| Eletrólito | Ácido | Neutro/Alcalino, pH variando de 7 a 12 |
| Espessura do filme | < 10 | < 200 |
| Dureza do filme | Moderada | Alta |
| Adesão ao substrato | Moderada | Muito alta |

Fonte: Adaptado de Walsh *et al.*, 2009.

Todavia, quanto à voltagem, o processo PEO em soluções aquosas necessita de uma voltagem elevada para superar as resistências dielétricas da camada de gás e óxido metálico. A voltagem necessária tipicamente ultrapassa os 400 V para ligas de Alumínio, 200 V para ligas de Magnésio e 250 V para ligas de Titânio (TSAI; CHOU, 2021)

O processo PEO é uma técnica inovadora e promissora para o tratamento eletroquímico de superfícies, capaz de criar revestimentos cerâmicos espessos e robustos em ligas leves, como titânio, alumínio e magnésio. Essa técnica está compreendida nos métodos químicos e utiliza eletrólitos ecologicamente corretos, como ácidos e bases fracos, juntamente com tensões elétricas elevadas para formar camadas de óxido que podem atingir dezenas a centenas de microns de espessura. Esse processo melhora substancialmente a resistência à corrosão, ao desgaste e as propriedades de isolamento térmico dos materiais, tornando-o uma escolha preferencial em aplicações biomédicas, eletrônicas, aeroespaciais e automotivas em comparação com técnicas convencionais de modificação de superfície (SIKDAR *et al.*, 2021).

Além disso, o PEO se caracteriza como uma técnica eletroquímica que induz a formação de camadas de óxido em metais e suas ligas por meio de faíscas e descargas de micro-arco. Esse método permite a criação de camadas de óxido protetoras e catalíticas, com a composição dos óxidos controlada pelo eletrólito utilizado. Durante o PEO, uma camada intermediária de óxidos do metal ou liga é formada entre o substrato e a camada de revestimento funcional externa, onde a fase ativa é localizada. Esse processo envolve a eletrólise de uma solução aquosa e liberação de hidrogênio gasoso na superfície catódica, enquanto a oxidação do metal ou liga ocorre na superfície anódica (TARKHANOVA, I. G. *et al.*, 2019; MORTAZAVI; JIANG; MELETIS, 2019).

A técnica de *Plasma Electrolytic Oxidation* (PEO) oferece vantagens notáveis, como resistência ao desgaste e à corrosão, enquanto mantém as propriedades do substrato e permite processar peças complexas de grande tamanho com equipamentos simples e ecológicos. O PEO utiliza, geralmente, eletrólitos alcalinos (pode-se usar eletrólitos ácidos), não gera exaustão prejudicial e produz revestimentos porosos cujas características podem ser controladas por variáveis como eletrólito, condutividade, tensão, tempo de exposição e estado da superfície do substrato. Essa versatilidade faz do PEO uma técnica eficiente para diversas aplicações de revestimento (SANTOS, 2022; NARAYANAN; KIM; PARK, 2020).

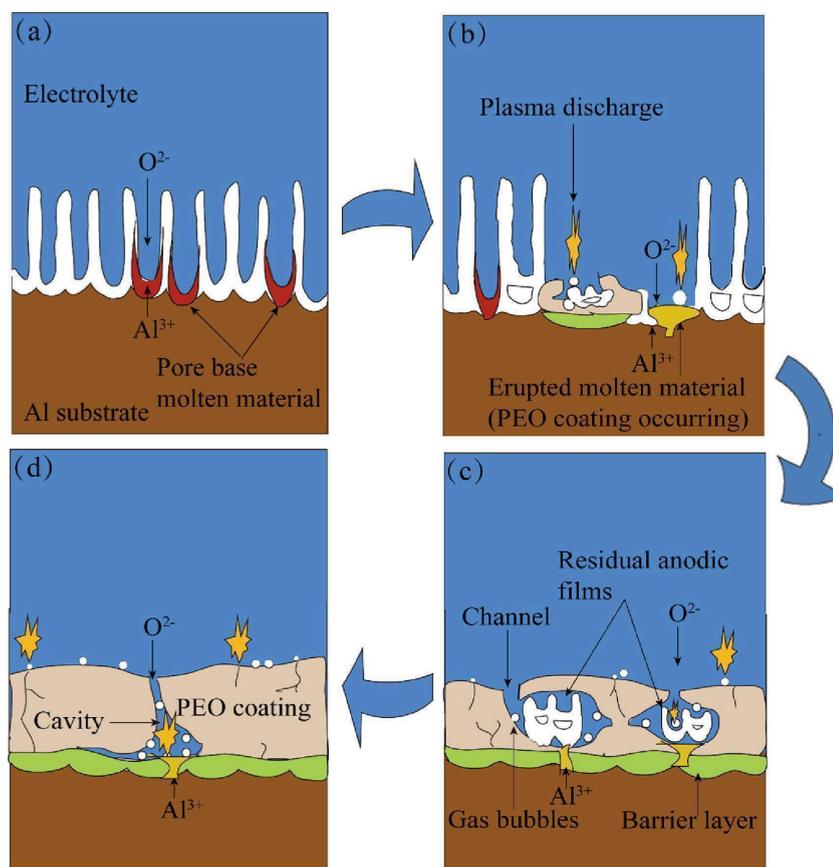
O processo de formação de revestimentos de PEO (Oxidação por Micro Descarga) segue um mecanismo básico semelhante, independentemente do tipo de controle de parâmetros elétricos (corrente constante ou tensão constante). Tem início com a formação de um filme passivo fino nas superfícies metálicas do substrato. À medida que a tensão aumenta, bolhas de gás são geradas, seguidas pela formação de um filme isolante poroso. Quando a tensão atinge um limiar, ocorre uma quebra dielétrica com faíscas, levando à formação de microporos uniformes. No modo de corrente constante, a tensão é ajustada para garantir a quebra eficaz do revestimento. A cor das faíscas muda de branco para vermelho-alaranjado, e a taxa de crescimento do revestimento aumenta na fase de micro arco. O aumento adicional da tensão causa uma forte descarga de arco, resultando em respingos e ablação local, que devem ser evitados para obter revestimentos de alta qualidade. O processo de formação do revestimento envolve a produção de canais de descarga, a movimentação de materiais do revestimento para dentro dos canais devido à alta temperatura e pressão, a solidificação dos produtos de óxido nas paredes dos canais e a expulsão dos gases, mantendo cavidades residuais semelhantes a 'vulcões'. Isso se repete em regiões fracas da superfície, promovendo uma espessura geral uniforme do revestimento (JIANG, B. L.; WANG, Y. M., 2010).

2.3.1 Fenômeno de crescimento e mecanismo de formação do revestimento

O mecanismo de crescimento da camada de óxido produzido pelo processo PEO pode ser observado na Figura 2.2, que representa o processo de crescimento do revestimento. Ao aplicar a corrente elétrica adequada à amostra de Al pré-tratada, um filme anódico começa a se desenvolver na superfície do substrato de Al, resultando em um rápido aumento da tensão. Isso ocorre devido ao fluxo de materiais das áreas da base dos poros em direção à parede celular, devido às tensões de crescimento e à plasticidade do material do filme, que interagem com ânions do eletrólito durante o processo, levando à formação de novos óxidos e,

consequentemente, a um filme anódico mais espesso. No entanto, à medida que os materiais diminuem durante o fluxo, observa-se uma expansão do diâmetro das células da camada de barreira em direção à superfície do filme em algumas áreas, como evidenciado na Figura 2.2(a). Desprendimentos e fissuras surgem devido à interação do crescimento do novo filme e às variações de volume resultantes da transição de fase, entre outros fatores (YANG *et al.*, 2019).

Figura 2.2 - Esquema da evolução da microestrutura do revestimento durante o processo PEO, sendo: (a) crescimento colunar do filme anódico, (b) desprendimento e crescimento coexistente, (c) transformação de filmes anódicos, e (d) crescimento do revestimento PEO.



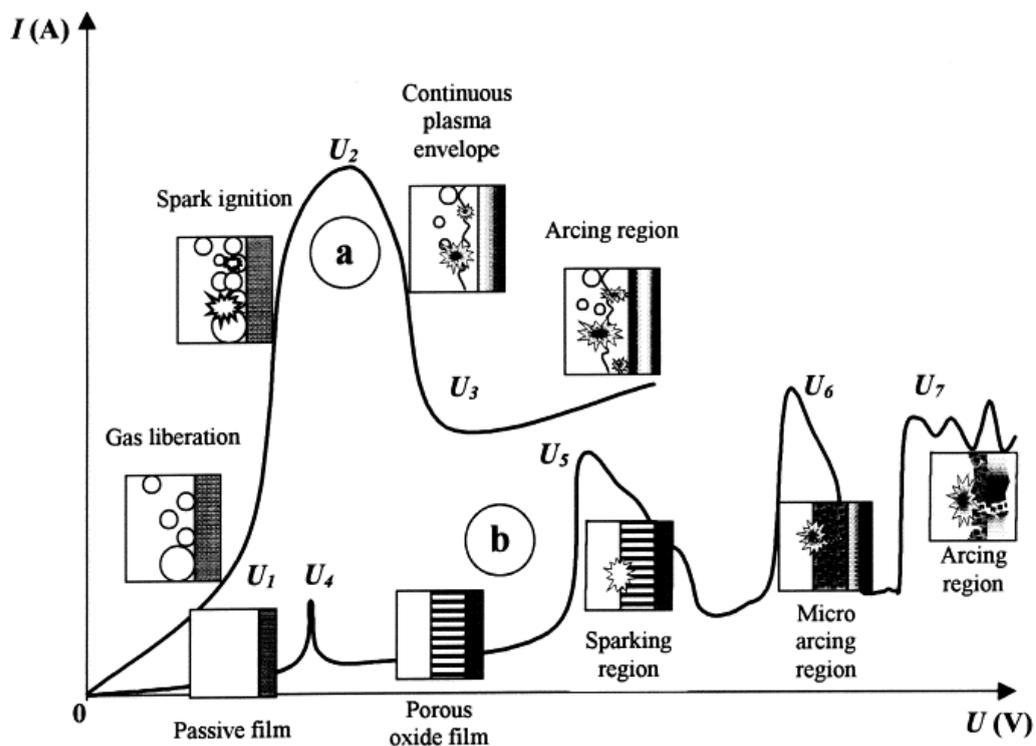
Fonte: Yang *et al.*, 2019.

Quando a tensão atinge um nível crítico, ocorrem descargas de plasma microscópicas nas áreas mais vulneráveis, devido à concentração de corrente elétrica nesses pontos. Isso resulta na criação de regiões de revestimento PEO localizadas. Simultaneamente, sob a influência da alta temperatura gerada pelas descargas de plasma, ocorre uma transformação estrutural complexa no filme anódico. Consequentemente, o filme anódico deixa de apresentar uma estrutura simples de tubos com furos cilíndricos que se estendem da superfície do filme

até a camada de barreira, como ilustrado na Figura 2.2(b). Conforme as áreas residuais de oxidação anódica dentro dos revestimentos PEO diminuem em frequência e tamanho devido às elevadas temperaturas e pressões geradas pelas descargas de plasma em grande escala, os revestimentos PEO compactos se tornam a estrutura predominante, como evidenciado nas Figuras 2.2(c) e (d) (YANG *et al.*, 2019).

O gráfico corrente-tensão em sistemas eletroquímicos representa as relações entre a corrente elétrica (corrente) e a tensão (potencial elétrico) aplicada a um sistema. Essas relações são influenciadas pelos processos eletroquímicos que ocorrem na interface entre o eletrodo e o eletrólito. Existem dois tipos principais de comportamento representados nesse gráfico para o processo PEO: "tipo-a" e "tipo-b" (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Dois tipos de comportamento no diagrama corrente-tensão para os processos PEO: fenômenos de descarga desenvolvidos: (a) na área próxima ao eletrodo; e (b) na película dielétrica na superfície do eletrodo.



Fonte: YEROKHIN, A. L. *et al.*, 1999.

A respeito da figura 2.3, Yerokhin, A. L. *et al.* (1999) e Xue (2019) consideram os seguintes pontos:

1. Sistema "Tipo-A":

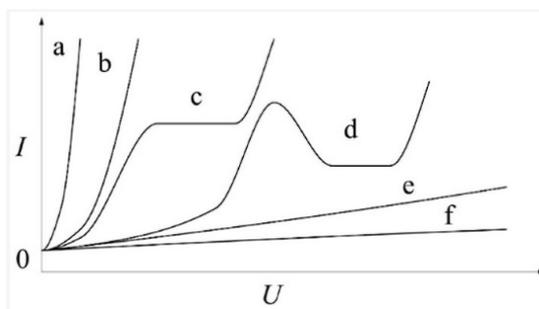
- a. Inicialmente segue as leis de Faraday e Ohm, com aumento proporcional na corrente com o aumento da tensão.

- b. Acima da tensão crítica (U_1), o comportamento muda significativamente.
 - c. Entre U_1 e U_2 :
 - i. Ocorre uma oscilação da corrente com luminescência devido à blindagem parcial dos produtos de reação gasosa no eletrodo.
 - d. Acima de U_2 :
 - i. Um envelope contínuo de vapor gasoso com baixa condutividade elétrica envolve o eletrodo.
 - ii. Ionização no envelope de vapor começa com centelhas em bolhas gasosas, transformando-se em luminescência uniforme.
 - e. U_2 - U_3 :
 - i. A corrente diminui devido à estabilização hidrodinâmica do envelope de vapor.
 - f. Após U_3 :
 - i. Descargas de luminescência se transformam em arcos intensivos com emissão acústica de baixa frequência.
2. Sistema "Tipo-B":
- a. Mais complexo.
 - b. U_4 :
 - i. Dissolução de um filme passivo, correspondendo ao potencial de corrosão do material.
 - c. U_4 - U_5 :
 - i. Crescimento de um filme poroso de óxido com a maior queda de tensão.
 - ii. O campo elétrico no filme de óxido atinge um valor crítico, levando à sua perfuração com centelhas luminescentes em sua superfície.
 - d. U_6 :
 - i. Ionização térmica e descargas de arco maiores ocorrem.
 - e. U_6 - U_7 :
 - i. Ionização térmica parcialmente bloqueada devido ao acúmulo de carga negativa no filme de óxido.
 - ii. Micro descargas de arco com potência e duração limitadas, conhecidas como "microarcos".
 - f. Acima de U_7 :

- i. Micro descargas de arco penetram até o substrato e se transformam em arcos poderosos com potencial de causar efeitos destrutivos, como fissuração térmica do filme.
3. Importante notar:
 - a. Em prática, processos podem ocorrer simultaneamente em diferentes áreas da superfície do eletrodo.
 - b. Comportamento dos sistemas eletroquímicos é mais complexo do que a distinção entre "Tipo-A" e "Tipo-B".
 - c. Sistema é descrito como um sistema de quatro fases (metal-dielétrico-gás-eletrólito) com múltiplas possíveis fronteiras de fase, especialmente em tensões críticas de U1 e U5.
 - d. Resistência dessas fases varia continuamente, tornando difícil discernir onde os fenômenos de ionização começam.
 - e. A distinção entre os sistemas eletroquímicos em "Tipo-A" e "Tipo-B" não é clara.

O processo PEO é um processo que envolve uma descarga sob um intenso campo elétrico em um sistema que inclui o substrato, uma camada de óxido, um envelope de gás e um eletrólito, determinando assim a morfologia e composição dos revestimentos produzidos. Essa descarga elétrica cria um estado de plasma quando o substrato se converte, sob polarização anódica, em um composto por seu próprio material, incluindo elementos de liga, oxigênio e componentes do eletrólito. A formação de uma película passiva tecnologicamente relevante é essencial e requer que essa película não conduza eletricidade, mas sim íons. Esse comportamento depende da interação entre o metal do eletrodo e o eletrólito. A Figura 2.4 resume o possível comportamento de densidade de corrente em relação ao potencial de um eletrodo polarizado anodicamente em um eletrólito (SIMCHEN *et al.*, 2020).

Figura 2.4 - Principais tipos de comportamento da densidade de corrente em relação ao potencial de um eletrodo polarizado anodicamente em um eletrólito: a/b - dissolução, c - passivação em uma faixa de potencial pequena, d - comportamento complexo, e/f - passivação.



Fonte: SIMCHEN *et al.*, 2020.

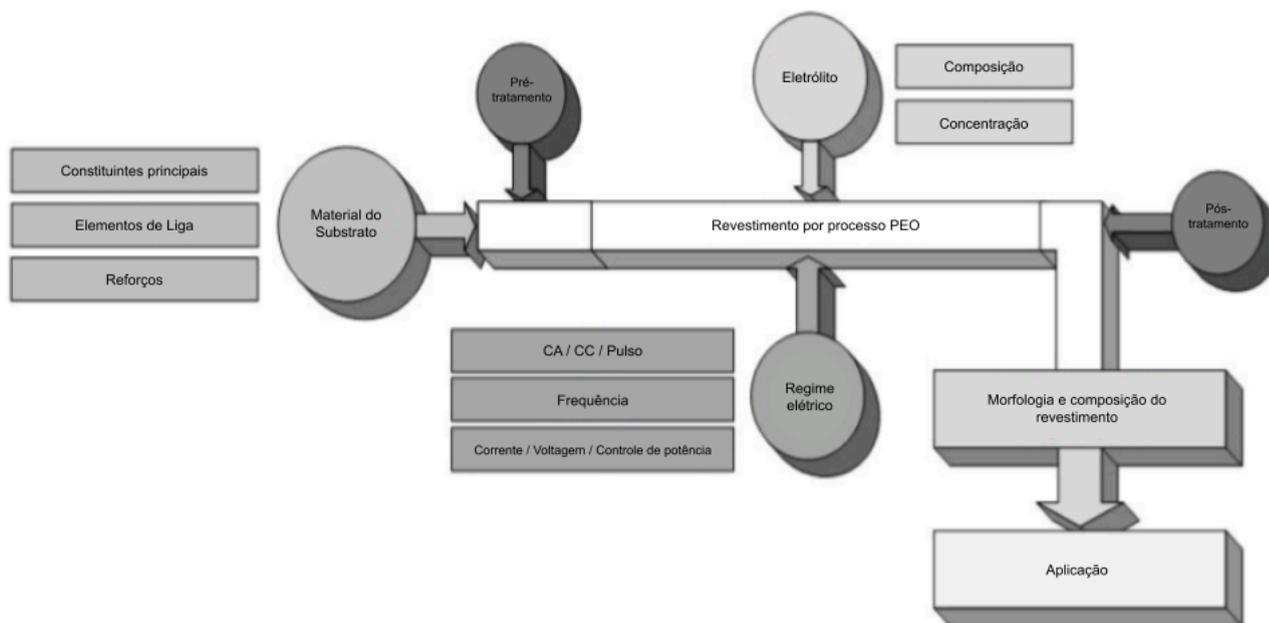
Apenas o comportamento de passivação, e em certos casos um comportamento complexo com uma região passiva e uma região transpassiva, são adequados para a formação das camadas reativas necessárias para iniciar o processo de PEO (SIMCHEN *et al.*, 2020).

2.3.2 Principais parâmetros do processo PEO

Tanto os fatores intrínsecos - composição e pH do eletrólito - quanto os extrínsecos - tipos de fonte de energia, parâmetros elétricos e temperatura do eletrólito - afetam a formação e a microestrutura dos revestimentos produzidos pelo processo PEO. A composição e concentração do eletrólito e o regime elétrico empregados durante o processo desempenham papéis cruciais para a obtenção do revestimento desejado com componentes de fase e microestrutura específicos (JIANG; WANG, 2010).

O processo PEO se desdobra em três parâmetros principais, que podem ser observados na Figura 2.5, sendo eles: composição do substrato, eletrólito empregado e regime elétrico aplicado, além da interação entre eles.

Figura 2.5 - Representação esquemática do processo PEO e seus parâmetros principais, considerando todas as etapas de operação do processo.



Fonte: Adaptado de Simchen *et al.*, 2020.

Uma descrição de cada parâmetro pode ser observada nos pontos a seguir:

- Composição do substrato:

O substrato determina as características básicas do objeto revestido. Sua composição química e estrutura microscópica têm um impacto direto na aderência, resistência à corrosão e durabilidade do revestimento. A escolha cuidadosa do substrato é essencial, adaptando-o às propriedades necessárias para a aplicação específica. O pré-tratamento do substrato é um passo crucial que prepara a superfície para receber o revestimento de forma eficaz. Técnicas como jateamento abrasivo, decapagem química e anodização são empregadas para limpar a superfície do substrato, eliminando impurezas, óxidos e contaminantes. Esse processo cria uma superfície limpa e rugosa, proporcionando uma base ideal para a aplicação do revestimento. Uma superfície preparada adequadamente resulta em uma aderência mais forte, contribuindo significativamente para a qualidade e a durabilidade do revestimento final. Além das técnicas tradicionais, avanços tecnológicos introduziram métodos mais sofisticados, como o uso de plasma e laser para o pré-tratamento do substrato. Essas técnicas oferecem maior precisão e controle sobre as características da

superfície, levando a revestimentos mais eficientes e duráveis (LI *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2015; SIMCHEN *et al.*, 2020; ALIOFKHAZRAEI *et al.*, 2021).

- Eletrólito empregado:

Eletrólito é o meio que permite a passagem de corrente elétrica e a formação de uma camada de óxido na superfície de metais e suas ligas. Os componentes eletrolíticos podem ser classificados conforme seu comportamento passivante ou de dissolução em relação ao substrato, no entanto outras classificações também são possíveis, como em relação à incorporação de compostos na camada de óxido. Nessa classificação os eletrólitos podem ser: a) eletrólitos que levam apenas à incorporação de oxigênio; b) eletrólitos que levam incorporações de compostos estranhos por ânions; c) eletrólitos que levam à incorporação de compostos estranhos por cátions; e d) eletrólitos contendo partículas macroscópicas que são incorporadas ao óxido por processos cataforéticos. Os sais comuns para processos de PEO em substratos de alumínio, magnésio, titânio e suas ligas em meio alcalino são, principalmente, silicatos, fosfatos, aluminatos, fluoretos, boratos e estanatos. Alguns parâmetros que devem também ser observados são a composição e a temperatura de utilização (SIMCHEN *et al.*, 2020; YEROKHIN *et al.*, 1999; SOLEYMANI NAEINI; GHORBANI; CHAMBARI, 2019).

Os efeitos intrínsecos do eletrólito podem ser resumidos da seguinte forma (JIANG; WANG, 2010):

- a. Promove a passivação do metal para formar um filme isolante fino, o que é um pré-requisito necessário para a quebra dielétrica induzir a descarga de *spark* (plasma);
- b. Serve como meio para condução de corrente, transmitindo a energia essencial necessária para que ocorra a oxidação do ânodo na interface metal/eletrólito;
- c. Funciona como fonte de oxigênio na forma de oxissal necessário para a oxidação;
- d. Permite que os componentes presentes no eletrólito sejam incorporados nos revestimentos, modificando ou melhorando ainda mais as propriedades dos revestimentos produzidos pelo processo PEO.

Os revestimentos de óxido criados por meio do processo PEO são influenciados por vários fatores, incluindo composição do eletrólito, concentração,

aditivos e valor de pH. Titânio e suas ligas geralmente utilizam eletrólitos de fosfato, silicato e aluminato. Pesquisas revelaram que os revestimentos em soluções de silicato apresentaram poros circulares, enquanto soluções de fosfato resultavam em poros circulares e anulares. Eletrólitos híbridos exibiram propriedades superiores, com soluções de silicato produzindo as estruturas mais densas. Revestimentos modificados por flúor promovem a formação de hidroxiapatita fluoretada, melhorando a resposta óssea. Diferentes soluções eletrolíticas, incluindo fosfato, borato, citrato e silicato, afetam a estabilidade do revestimento. Pesquisadores exploraram a biocompatibilidade do titânio revestido com MAO, com eletrólitos de NaOH e Na₂SiO₃, melhorando a adesão e proliferação celular. Ácido cítrico, etilenodiamina e fosfato de amônio como eletrólitos influenciaram a força de ligação da camada de TiO₂, com força mais fraca observada ao adicionar certas substâncias. A incorporação de íons como estrôncio, manganês, cobre e prata nos eletrólitos melhorou as propriedades dos revestimentos, impactando a resposta celular e as propriedades antibacterianas (LI *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2015; SHOKOUHFAR *et al.*, 2012; PESODE; BARVE, 2021).

Revestimentos de TiO₂ com cobre e zinco são estudados por seu potencial antibacteriano. Além disso, a temperatura do eletrólito desempenha um papel crucial no processo de PEO. Durante as descargas de plasma, a temperatura da superfície do revestimento aumenta significativamente, promovendo a formação de fases que normalmente requerem altas temperaturas. No entanto, é vital manter os substratos metálicos a temperaturas mais baixas para evitar a degradação de suas propriedades mecânicas durante o processo. A uniformidade do revestimento também está diretamente relacionada à temperatura do eletrólito. Temperaturas mais baixas do eletrólito resultam em revestimentos mais uniformes, enquanto temperaturas mais altas podem levar a revestimentos não uniformes com maior porosidade. Além disso, eletrólitos a temperaturas mais baixas demonstraram excelente resistência ao desgaste, tornando-os ideais para aplicações em que a durabilidade é uma preocupação (LI *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2015; SHOKOUHFAR; DEGHANIAN; BARADARAN, 2011; SHOKOUHFAR *et al.*, 2012; PESODE; BARVE, 2021).

- Regime elétrico aplicado:

No contexto da oxidação eletrolítica por plasma (PEO), o regime elétrico desempenha um papel fundamental na determinação das propriedades dos

revestimentos formados (LI *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2015; SIMCHEN *et al.*, 2020; ALIOFKHAZRAEI *et al.*, 2021; PESODE; BARVE, 2021):

- i. A voltagem aplicada é um parâmetro crucial, pois níveis mais elevados podem induzir descargas intensas, resultando em poros maiores, enquanto voltagens muito baixas podem comprometer o início do processo de oxidação desejado.
- ii. A densidade de corrente é outro fator de grande importância. Sob uma densidade de corrente constante, observa-se um aumento na intensidade das descargas com o tempo de processo, o que se traduz em uma microestrutura mais porosa. No entanto, permitir uma redução gradual da densidade de corrente durante as fases posteriores do processo pode levar a descargas menos intensas, resultando em um revestimento mais homogêneo e menos poroso.
- iii. O ciclo de trabalho, que representa a proporção entre o tempo ativo e o período total, juntamente com o uso de pulsos no regime elétrico, são estratégias cruciais para otimização do processo. Durante os pulsos, a corrente ou voltagem é ajustada regularmente para valores baixos, reduzindo assim a intensidade das descargas. Esse fenômeno facilita a formação de revestimentos mais espessos com menor incidência de defeitos. Ciclos de trabalho apropriados também desempenham um papel significativo na melhoria da aderência do revestimento ao substrato.
- iv. Além disso, o tempo total de processo e a frequência das descargas desempenham papéis essenciais. Um aumento no tempo de processo geralmente resulta em um revestimento mais espesso, porém mais poroso. Frequências mais elevadas podem produzir revestimentos mais uniformes, embora frequências excessivamente altas possam levar a um crescimento excessivo de grãos e à formação de trincas nos revestimentos.

A escolha e a combinação desses parâmetros exercem uma influência sobre a porosidade, a aderência, a espessura e a homogeneidade do revestimento, sendo aspectos cruciais para o sucesso do processo e para a obtenção de revestimentos de alta qualidade e desempenho.

2. 4 Contaminação de superfícies por biofilme bacteriano

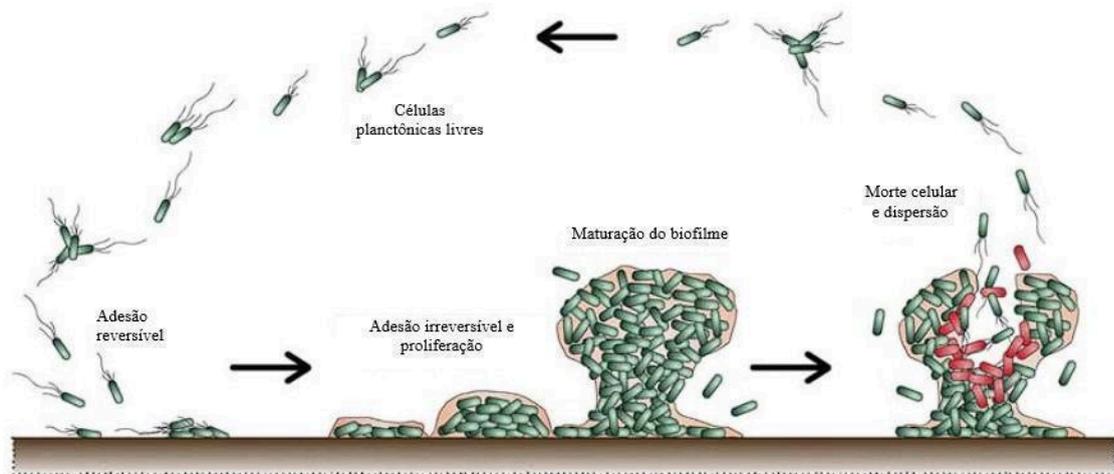
Na natureza, as bactérias geralmente não existem em sua forma planctônica individual, mas se organizam em sistemas biológicos coordenados conhecidos como biofilmes. Essas células bacterianas têm a capacidade de aderir a uma ampla variedade de superfícies naturais e artificiais, sendo atraídas para essas superfícies por forças físicas, como a atração de van der Waals, forças gravitacionais, efeitos da carga eletrostática da superfície e interações hidrofóbicas. Os biofilmes são complexos depósitos onde os micro-organismos estão fortemente aderidos a uma superfície através de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, conhecidos como glicocálix. A formação de biofilmes está relacionada a vários fatores, incluindo as características físico-químicas do material em que estão aderidos e a expressão de fatores de virulência pelos micro-organismos, como a produção de cápsula exopolimérica e fímbrias. Alguns estafilococos coagulase negativo produzem um muco ou *slime* (polissacarídeo extracelular) que permite sua aderência às superfícies, desempenhando um papel importante na colonização. A produção de *slime* é considerada um fator de virulência, facilitando a aderência e a formação do biofilme. A adesão microbiana ocorre quando os micro-organismos se depositam em uma superfície de contato, fixando-se e iniciando seu desenvolvimento. A multiplicação celular resulta na formação de colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, o biofilme é estabelecido (BULLMANN, 2023; MENDES, 2015).

Após a adesão em superfícies sólidas, ocorre a fixação e o crescimento do biofilme através de um processo que consiste em 5 estágios, sendo eles (BULLMANN, 2023; MENDES, 2015; REHM, 2008):

1. Adesão reversível das bactérias planctônicas;
2. Adesão irreversível delas;
3. Início da fundação de microcolônias;
4. Maturação das microcolônias e crescimento do biofilme em comunidades bacterianas tridimensionais;
5. Nova dispersão, ocasionada pelo desprendimento das células, que, por sua vez, retornam para uma fase planctônica, completando o ciclo de vida do biofilme e ficando livre para a colonização de novos locais.

Esse crescimento revela a engenhosidade das bactérias em criar biofilmes. Esse processo que compreende o ciclo de vida de um biofilme em 5 estágios pode ser observado na Figura 2.6.

Figura 2.6 - Ciclo de vida do biofilme, onde mostra a adesão reversível e irreversível, a proliferação (fundação de microcolônias), o biofilme maduro e em comunidades tridimensionais, e a morte celular e início de nova dispersão, que encerra o ciclo de vida de um biofilme e o começo de outro a partir da dispersão de células planctônicas livres para colonizar novos locais.



Fonte: Rehm, 2008.

Os biofilmes se destacam por sustentar a comunidade bacteriana e protegê-la contra estresses ambientais. Ao formar um biofilme, as células bacterianas fortalecem sua defesa contra agentes invasores, como bacteriófagos e amebas, além de adquirir resistência a diversos biocidas e antibióticos. Sob a perspectiva das comunidades bacterianas, a formação de biofilmes é benéfica, pois preserva as membranas internas das células contra microrganismos prejudiciais. No entanto, a formação de biofilmes também pode acarretar problemas em atividades humanas e na saúde humana, como obstruções em canos de água e crescimento indesejado sobre implantes médicos, como próteses articulares e cateteres. A resistência do biofilme é principalmente atribuída à sua propriedade viscoelástica, permitindo-lhe se adaptar a condições de alto cisalhamento, tornando-se mais compacto e resistente. A densidade populacional exerce um papel crucial no crescimento do biofilme, pois o aumento dessa densidade promove alterações na sua estrutura, resultando em maior complexidade e resistência microbiológica contra agressões externas (XAVIER, 2022).

As condições hidrodinâmicas, fisiológicas e ecológicas influenciam a estrutura do biofilme, incluindo sua espessura média. A aderência eficaz dos micro-organismos a uma superfície metálica depende de múltiplos fatores, como a forma e tamanho da célula, a topografia do substrato e o ângulo de contato da superfície. Superfícies mais rugosas são preferidas devido à maior área de contato disponível, proteção contra forças de cisalhamento e interações físico-químicas fortes. Por outro lado, superfícies super lisas não favorecem a adesão bacteriana e formação de biofilme. A interação entre microorganismos e superfície é influenciada pela topografia, especialmente estruturas de pico e vale em escalas micrométricas e nanométricas. Parâmetros de rugosidade, como R_a , R_q e R_z , são importantes para determinar a atividade antibacteriana. Diferentes arquiteturas e rugosidades de superfície podem levar a comportamentos distintos de adesão celular, mesmo com a mesma composição química das superfícies (BULLMANN, 2023).

As bactérias podem ser classificadas em dois grupos principais com base na coloração de Gram. As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular composta por uma camada espessa de peptidoglicano, que retém a coloração violeta do corante de Gram. Exemplos de bactérias Gram-positivas incluem *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Já as bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa, composta por uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa lipídica. Essas bactérias são coradas de rosa quando submetidas ao corante de Gram. Exemplos de bactérias Gram-negativas incluem *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (LANDINI *et al.*, 2010).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que apresenta uma série de características e propriedades distintas. Ele é classificado na família *Micrococcaceae* e é relacionado de perto com outros gêneros bacterianos, como *Enterococcus*, *Bacillus* e *Listeria*. Suas células formam aglomerados irregulares semelhantes a cachos de uva. Essa bactéria pode causar uma ampla variedade de doenças, incluindo infecções de pele e tecidos moles, infecções endovasculares e infecções de órgãos internos. Ela pode se disseminar a partir de um local superficial para órgãos internos, estabelecendo focos metastáticos de infecção. A *S. aureus* é um importante patógeno tanto na comunidade como em hospitais, causando alta morbidade e mortalidade. Em termos de comportamento em superfícies metálicas, estudos

têm mostrado que a rugosidade e a molhabilidade das superfícies podem influenciar o crescimento e a proliferação da *S. aureus*. Superfícies metálicas mais rugosas e hidrofóbicas tendem a facilitar a adesão e a formação de biofilmes por parte dessa bactéria. Além disso, a *S. aureus* tem um ambiente ideal de crescimento e proliferação na pele e nasofaringe humana, onde é considerado parte da microbiota normal (BERGDOLL, 1991; ONDUSKO; NOLT, 2018; SANTOS *et al.*, 2007; FOSTER, 2002).

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria conhecida por causar infecções persistentes em implantes, como próteses mamárias. Estudos mostram que tanto a *S. aureus* quanto a *Staphylococcus epidermidis* são importantes patógenos em infecções hospitalares associadas ao uso de cateteres e outros dispositivos médicos. No entanto, devido a essas espécies fazerem parte da flora bacteriana normal da pele e das mucosas humanas, é difícil determinar se um isolado microbiano é a causa da infecção ou se é resultado de contaminação. A capacidade dessas bactérias de formar biofilmes nas superfícies dos implantes é um fator crucial para sua persistência e resistência aos tratamentos antibióticos. A compreensão dos fatores de virulência e mecanismos patogênicos dessas bactérias é essencial para o diagnóstico preciso e o desenvolvimento de estratégias de tratamento eficazes para as infecções relacionadas a implantes (OLIVEIRA *et al.*, 2018; PIETROCOLA *et al.*, 2022; SALVI *et al.*, 2008; MONTANARO *et al.*, 2011; CHESSA *et al.*, 2016).

2.4.2 *Escherichia coli*

A espécie bacteriana *Escherichia coli*, também conhecida como *E. coli*, faz parte da classe Gram-negativa, comumente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente. Ela exibe uma notável versatilidade e resistência, o que a torna um organismo modelo importante para estudos científicos. Embora muitas cepas de *E. coli* sejam inofensivas e desempenhem um papel benéfico como comensais, algumas cepas patogênicas podem causar uma variedade de doenças, incluindo gastroenterite, infecção do trato urinário, sepse e meningite neonatal. Além disso, a *E. coli* pode estar associada a diarreias em animais de estimação e animais de fazenda. Em relação à interação com implantes, a presença de *E. coli* pode representar um risco de infecção para pacientes que tenham dispositivos médicos implantados, como próteses, cateteres ou *stents*. A resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* também é uma preocupação crescente, o que enfatiza a importância de estratégias de prevenção e controle de infecções (NATARO; KAPER, 1998; GOMES *et al.*, 2016;

NATARO, 2004; LUKJANCENKO; WASSENAAR; USSERY, 2010; BLOUNT, 2015; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; ALLOCATI et al., 2013).

2.5 Propriedades físico-químicas de superfícies para aplicações biomédicas

2.5.1 Molhabilidade

A molhabilidade é a capacidade de um líquido se espalhar e entrar em contato com a superfície de um sólido. Esse fenômeno ocorre quando um líquido é depositado sobre um sólido e, sob a influência da gravidade, se espalha até que as forças de coesão interna do líquido, as forças de gravidade e as forças de tensão superficial estejam equilibradas. Nesse estado de equilíbrio, pode-se medir o ângulo de contato, θ , entre a superfície sólida e o líquido. A molhabilidade é uma propriedade físico-química que envolve a substituição de uma área da interface sólido-ar por uma área equivalente da interface sólido-líquido, resultando em uma diminuição ou aumento da interface líquido-ar. A energia livre envolvida nesse processo determina a capacidade de um líquido de molhar uma superfície sólida. A molhabilidade é uma propriedade importante em diversas áreas, especialmente implantes biomédicos, onde a interação eficiente entre a superfície do implante e fluidos biológicos pode afetar a resposta celular e a cicatrização. Além disso, o estudo da molhabilidade também tem aplicações em áreas como impermeabilização de materiais e modificação de propriedades de superfície (SANTOS, 2022; NIKOOMANZARI et al., 2020; WENZEL, 1936).

Uma forma de quantificar a molhabilidade de uma superfície é por meio de um goniômetro, instrumento que mede o ângulo de contato estático da gota de um líquido com uma superfície em estudo. Esse ângulo pode ser associado a parâmetros termodinâmicos relacionados à adesão superficial. Quanto maior o valor desse ângulo, menos suscetível ou favorável é a interação da água com a superfície. Em outras palavras, quanto maior o ângulo de contato estático de um material, menos “molhável” ele é. O valor do ângulo de contato de uma gota de água aderida a uma superfície revela a natureza hidrofílica ou hidrofóbica do material que a compõe. São consideradas as seguintes classificações de molhabilidade (TOMA; DA SILVA; CONDOMITTI, 2016):

- superfície super-hidrofílica: ângulos de contato muito baixos ($\sim 0^\circ$);
- superfície hidrofílica: ângulos de contato estático que variam desde baixos valores até 30° ;
- superfície intermediária: ângulos variam entre 30° e 90° ;

- superfície hidrofóbica: ângulos assumem valores maiores que 90° e menores que 140° ;
- superfície super-hidrofóbica: ângulos de contato estático superiores a 140° .

2.5.2 Rugosidade

A rugosidade da superfície pode ser entendida como a textura ou aspereza de uma superfície. Ela é quantificada por parâmetros como R_a , que mede a rugosidade média, e R_z , que mede a altura das saliências e reentrâncias na superfície. A rugosidade da superfície tem um impacto significativo em várias aplicações, como adesão celular inicial, colonização de placa bacteriana, osseointegração de implantes e resistência à fadiga. Estudos demonstraram que níveis intermediários de rugosidade podem promover uma melhor adesão celular, enquanto superfícies mais lisas dificultam a formação de biofilmes e reduzem os riscos de infecção. Tratamentos de superfície, como jateamento, anodização e revestimentos de fosfato de cálcio, são utilizados para controlar e padronizar a topografia da superfície, a fim de melhorar as propriedades biológicas e mecânicas dos implantes. Além disso, a presença de micro riscos e trincas na superfície podem funcionar como um fator de concentração de tensão e afetar a resistência à fadiga dos materiais metálicos (HUANG *et al.*, 2004; RIMONDINI *et al.*, 1997; SWAIN; RAUTRAY, 2021; JINLONG *et al.*, 2021; IVANOVA *et al.*, 2010).

A rugosidade também pode afetar a resistência à corrosão de materiais. Superfícies com alta rugosidade podem apresentar maior propensão à corrosão devido à maior exposição de áreas irregulares, aumentando as chances de corrosão localizada. Por outro lado, superfícies mais lisas e com menor rugosidade tendem a ter uma melhor resistência à corrosão, pois apresentam uma área de contato mais homogênea e menor suscetibilidade a processos corrosivos. Portanto, o controle da rugosidade de superfície é um aspecto importante a ser considerado no desenvolvimento de materiais com propriedades antimicrobianas e alta resistência à corrosão (IVANOVA *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2017).

A rugosidade da superfície pode ser quantificada por meio de parâmetros como R_a , R_z , R_{sk} e R_{ku} (BULLMANN *et al.*, 2023):

- R_a : é a rugosidade média aritmética, que representa a média das alturas absolutas dos pontos da superfície em relação a uma linha média imaginária;

- R_z : é a rugosidade máxima (profundidade média) e mede a diferença de altura entre os pontos mais altos e mais baixos da superfície, calculada a partir das alturas absolutas dos cinco picos mais altos e das cinco depressões mais profundas;
- R_{sk} : é a assimetria da distribuição de altura, indicando se há mais picos altos e "afiados" com vales mais rasos e amplos (valor positivo), ou se há pequenos picos com vales profundos e estreitos (valor negativo);
- R_{ku} : é a curtose, que é uma medida da função de densidade e probabilidade do perfil de altura dos picos. Valores maiores que 3 indicam uma distribuição mais ordenada dos picos, enquanto valores menores que 3 indicam uma distribuição mais espalhada.

Esses parâmetros de rugosidade fornecem informações importantes sobre a textura da superfície e sua influência na adesão celular, e podem ser utilizados para melhor compreensão e controle de processos relacionados a biomateriais e interações celular-implantes (BULLMANN *et al.*, 2023). Os atuais sistemas de implantes comerciais possuem, em sua maioria, uma variação de “altura” (R_a) que varia de 1 a 2 μm . As características microtopográficas da superfície do implante (picos, vales e saliências) são parâmetros de superfície importantes na resposta biológica e na configuração da interface osso-implante, por exemplo. A topografia da superfície do implante pode ser classificada como lisa quando $R_a < 0,5 \mu\text{m}$, minimamente rugosa com $R_a = 0,5-1,0 \mu\text{m}$, moderadamente rugosa com $R_a = 1,0-2,0 \mu\text{m}$ e altamente rugosa quando $R_a > 2,0 \mu\text{m}$. Como já mencionado, as propriedades de superfície são fatores críticos para alcançar o sucesso clínico (NICOLAS-SILVENTE *et al.*, 2020).

2.5.3 Interação célula-substrato

As interações célula-substrato são importantes na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa. O capítulo apresentado neste item discute a importância dessas interações e como elas influenciam o comportamento celular. A matriz extracelular (ECM) desempenha um papel essencial na organização espacial, ancoragem e resistência mecânica das células nos tecidos. Proteínas como colágeno, elastina, fibronectina e laminina estão envolvidas na adesão celular e na ativação de vias de sinalização. Os receptores de adesão celular da família integrina são responsáveis por mediar a ligação entre as células e a ECM, formando contatos focais. Além disso, as propriedades físicas e químicas do substrato, como topografia de superfície, propriedades mecânicas e cristalinidade dos polímeros, também afetam as

interações célula-substrato. Compreender essas interações é crucial para o desenvolvimento de biomateriais que possam imitar o ambiente natural e promover a adesão, proliferação e diferenciação celular de acordo com as necessidades específicas do tecido (RIZWAN *et al.*, 2019).

Alguns pontos importantes a serem observados sobre a interação célula-substrato são (SANTOS, 2022):

- As interações entre célula e substrato dependem das interações entre proteínas e a superfície, seguidas da interação entre células e proteínas;
- As proteínas do sangue são adsorvidas na superfície do implante, fornecendo pontos de ligação para as integrinas presentes nas células;
- Os macrófagos e neutrófilos tentam fagocitar o implante, mas, caso falhem, se fundem formando células gigantes de corpo estranho, que secretam citocinas para recrutar fibroblastos;
- Fibroblastos secretam colágeno e outras proteínas, formando uma cápsula fibrosa ao redor do implante, em um processo conhecido como resposta de corpo estranho;
- A resposta fisiológica das células em contato com a superfície do material está diretamente relacionada à sua biocompatibilidade;
- A primeira fase da interação célula/material compreende os fenômenos de adsorção, adesão e espraiamento;
- A qualidade dessa primeira fase influencia diretamente a capacidade das células de se diferenciarem e proliferarem na superfície do biomaterial;
- A interação inicial entre as células e a superfície do implante é crucial para determinar sua biocompatibilidade e durabilidade;
- Os principais fenômenos de interação entre células e substrato são adesão, proliferação e diferenciação;
- É importante compreender os mecanismos de interação entre implantes e células;
- As propriedades físico-químicas da superfície do implante, como rugosidade, molhabilidade e porosidade, afetam o contato com proteínas e células;
- A diferenciação celular e a formação de tecidos em contato com implantes dependem da natureza química do material e das propriedades superficiais do biomaterial;
- Microestrutura, topografia, rugosidade, molhabilidade e energia de superfície são características importantes na interação entre células e substrato.

EISENBARTH *et al.* (2002), investigaram as interações entre células e superfícies de titânio, com foco na formação de camadas de óxido de titânio e sua influência na biocompatibilidade. Foram produzidas camadas de óxido de titânio de 100 nm de espessura em titânio comercial e em uma liga experimental de titânio com alto teor de vanádio. As camadas foram obtidas por oxidação térmica, anódica e pelo processo sol-gel. Verificou-se que a camada de óxido de titânio produzida pelo processo sol-gel foi capaz de proteger as células contra elementos tóxicos da liga, resultando em uma reação celular influenciada apenas pela fina camada de óxido de titânio na superfície, e não pela composição do material em massa. Esses resultados indicam que a formação controlada de camadas de óxido de titânio pode contribuir para a melhoria da biocompatibilidade de implantes de titânio.

2.5.4 Adesão de células HUVEC e citotoxicidade

O titânio e suas ligas desempenham um papel importante como material para aplicações biomédicas, tornando-se necessário que as células do organismo sejam capazes de aderir à superfície do material e espalhar-se para realizar suas atividades metabólicas sem comprometer sua funcionalidade. Os diferentes tecidos naturais, como osso, cartilagem, nervos e vasos sanguíneos, possuem padrões topográficos que variam em escalas micro e nano, tornando a topografia da superfície fundamental para a adesão, migração e diferenciação celular. Ao considerar a rugosidade da superfície, é importante não apenas analisar a amplitude dos picos e vales, mas também a organização e distribuição. Superfícies com topografias desordenadas tendem a promover baixa adesão celular devido à dificuldade das irregularidades superficiais em estabelecer uma área de contato adequada (BULLMANN, 2023).

A fixação biológica, ou biofixação, ocorre gradualmente por meio de interações físicas e químicas entre a superfície do implante e as células locais e adjacentes. A microestrutura e as características de superfície de um biomaterial determinam sua bioatividade ou inércia, afetando o comportamento celular. A estabilidade ou reatividade das células em relação ao implante depende da composição química da superfície e da bioquímica celular, resultando em uma resposta biológica positiva ou negativa. Em implantes bioativos, ocorrem ligações bioquímicas entre as células e as partículas do implante, com as células proliferando internamente em uma matriz porosa e hidrofílica. Em contraste, em implantes não ativos e hidrofóbicos pode ocorrer a formação de um revestimento tecidual ou cápsula fibrosa sobre o implante. A superfície lisa e inerte desses implantes favorece o desenvolvimento de biofilmes

nas irregularidades. Para evitar ligações biológicas heterogêneas ou inibidas, a superfície de implantes metálicos, como o titânio, deve ser composta exclusivamente por óxido. A biofixação em implantes de titânio ocorre por meio de uma complexa interação entre a matriz extracelular dos tecidos e a camada de óxido de titânio (SÁ, 2017; SANTOS, 2022).

A adesão celular à superfície do biomaterial é fundamental para diversos comportamentos celulares, como proliferação, migração e diferenciação. A composição química da superfície, a rugosidade, a topografia e a molhabilidade são fatores-chave que influenciam a adesão celular. A adesão celular adequada pode promover a biocompatibilidade do material, evitando inflamações e acelerando a regeneração de tecidos e órgãos. A adesão envolve eventos de curto prazo, como ligações físico-químicas entre células e materiais, que são influenciados por forças iônicas e de van der Waals (SÁ, 2017; SANTOS, 2022).

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) são células isoladas a partir do cordão umbilical humano e são amplamente utilizadas como um modelo experimental para estudar doenças cardiovasculares. Essas células desempenham um papel essencial no desenvolvimento dessas doenças, uma vez que atuam como interface entre os componentes do fluxo sanguíneo, como monócitos e plaquetas, e os demais componentes da parede arterial. A cultura de HUVEC tem sido utilizada com sucesso devido à alta taxa de sucesso no isolamento dessas células, e elas representam um excelente modelo para estudar uma ampla variedade de doenças, incluindo doenças cardiovasculares e metabólicas. Essas células são cultivadas *in vitro* em superfícies de implantes para avaliar a adesão, proliferação e função endotelial, além de investigar a resposta inflamatória e a formação de coágulos sanguíneos. A utilização das HUVEC como modelo de interação com implantes contribui para o desenvolvimento de materiais mais compatíveis e eficientes, o que beneficia diretamente os pacientes que necessitam de intervenções médicas (CAO *et al.*, 2017; MEDINA-LEYTE *et al.*, 2020).

Tu *et al.* (2010) indicam a existência de uma interação significativa entre as células HUVEC e implantes de titânio. O estudo sugere que a matriz extracelular secretada pelas células desempenha um papel fundamental na melhora da endotelização dos implantes vasculares de titânio. Isso indica que as células HUVEC têm a capacidade de aderir e se proliferar na superfície do titânio, auxiliando na formação de um revestimento endotelial funcional. Essa interação é de grande importância para a aplicação bem-sucedida de implantes vasculares de titânio, pois uma boa endotelização é essencial para prevenir complicações, como a trombose e a rejeição do implante (TU *et al.*, 2010).

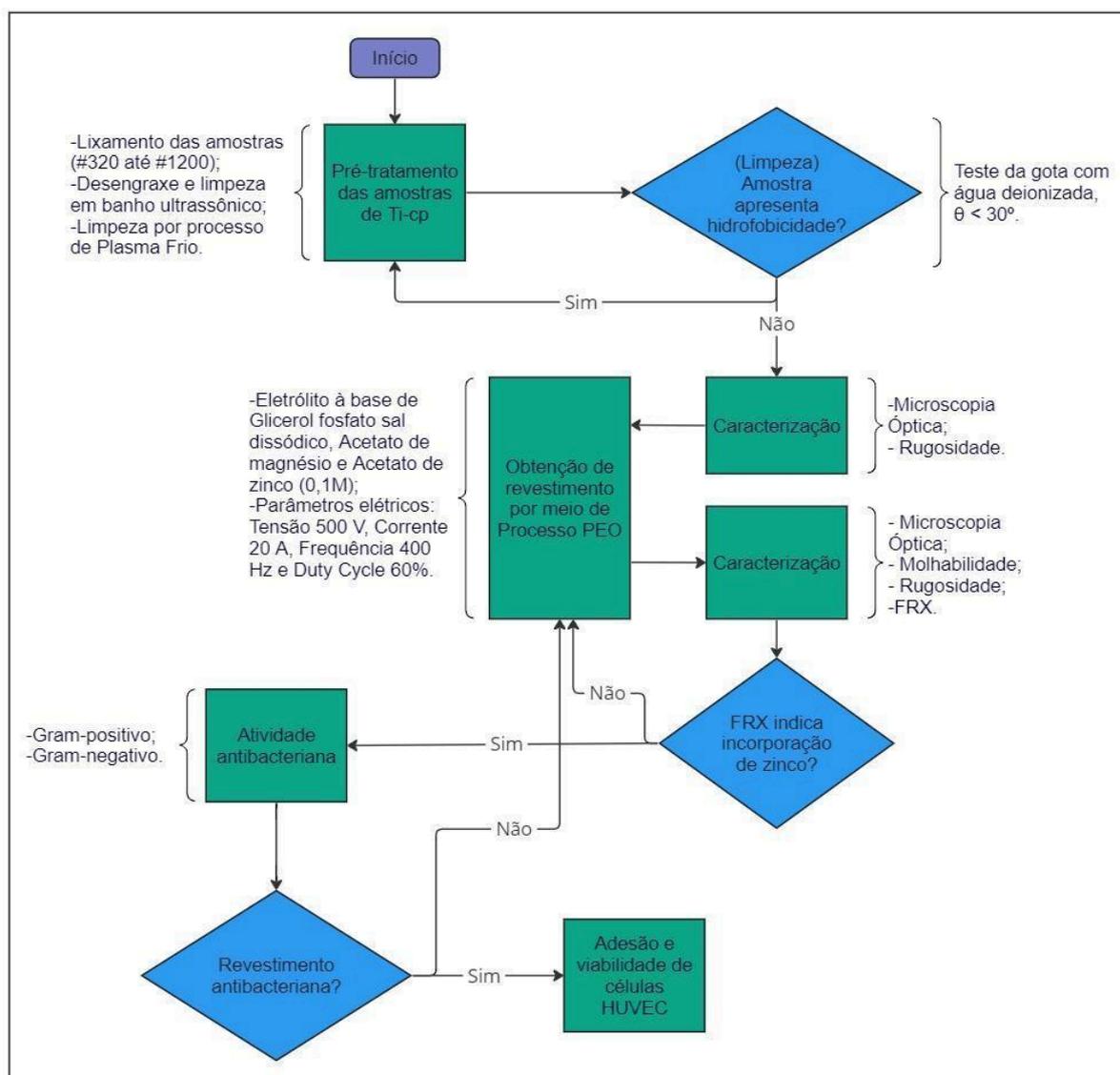
A biofuncionalidade de um dispositivo médico totalmente implantável, como um Dispositivo de Assistência Ventricular (DAV), depende da compatibilidade dos biomateriais utilizados com as condições físicas, químicas e biológicas às quais o implante será exposto. A presença de uma superfície endotelizada é desejável para evitar a ativação da coagulação sanguínea e a formação de trombos. Para alcançar isso, é necessário aprimorar os componentes do dispositivo por meio de processos de modificação da superfície. Além disso, a formação de uma camada neointima sobre a superfície do implante pode ser promovida pelo crescimento de células endoteliais ou pela adsorção de células e proteínas presentes no sangue circulante. A interação entre o implante e o tecido biológico durante o processo de cicatrização é determinada pelas características de ambas as superfícies (SÁ, 2017).

A viabilidade celular refere-se à capacidade de uma célula manter sua função e sobreviver em determinadas condições. Ela é fundamental também ao se realizar manipulações experimentais, pois é necessário garantir que a maioria das células estejam vivas para que os dados obtidos sejam confiáveis. Já a citotoxicidade refere-se à capacidade de uma substância ou composto causar danos ou morte celular. A citotoxicidade é frequentemente avaliada em experimentos *in vitro* para determinar a segurança de produtos farmacêuticos, cosméticos e agentes anticancerígenos. Essas avaliações são realizadas por meio de testes que medem os efeitos tóxicos em nível celular, como alterações na sobrevivência celular ou metabolismo. No entanto, é importante ressaltar que a citotoxicidade *in vitro* nem sempre reflete completamente os efeitos tóxicos complexos que ocorrem no organismo vivo (FRESHNEY, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A caracterização morfológica, química e biológica de revestimentos obtidos pelo processo PEO em amostras de Ti-cp, provenientes de metalurgia convencional, e com uso de eletrólitos à base de glicerofosfato de sódio, acetato de magnésio e acetato de zinco, pode ser observada no fluxograma da Figura 3.1.

Figura 3.1 - Fluxograma do desenvolvimento do experimento.



Fonte: O autor.

Sendo os critérios para cada etapa de decisão mostrados nos subcapítulos adiante.

3.1 Pré-tratamento do substrato metálico de Ti-cp

As amostras de Ti-cp foram obtidas por processos convencionais de laminação e o corte da chapa de titânio puro foi efetuado com jato d'água, entregando amostras circulares de 9,4 mm de diâmetro e 1,7 mm de espessura. O pré-tratamento do substrato consistiu em:

- Lixamento das superfícies das amostras, sendo um lado para ter contato elétrico e o outro para produção de revestimento por meio de processo PEO. As gramaturas utilizadas foram #320, #400, #600, #800 e #1200, fazendo-se uso de água e detergente neutro no lixamento;
- Desengraxe e limpeza das amostras em banho ultrassônico em 4 ciclos de 10 minutos, sendo eles: a) água deionizada e detergente neutro; b) acetona; c) álcool etílico; e d) água deionizada. Após isso foram secas com jato de ar frio;
- Limpeza por meio de Plasma Frio, em aparato e condições similares ao utilizado por Bullmann (2023) em seu trabalho.

Após todas as etapas, as amostras foram submetidas ao teste da gota d'água para verificação de existência de hidrofobicidade e, caso houvesse, as mesmas foram submetidas novamente aos ciclos de limpeza.

3.2 Processo PEO

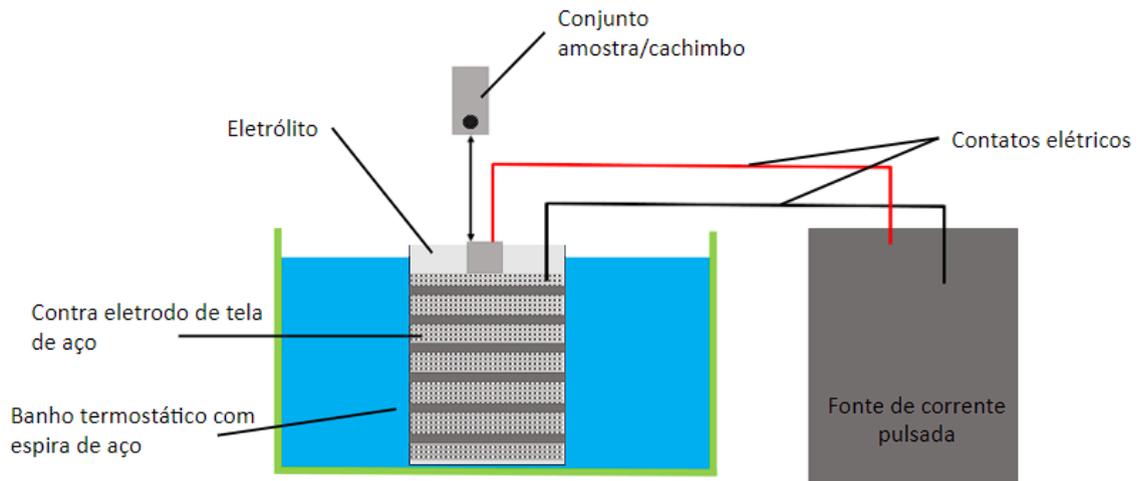
O eletrólito utilizado no processo PEO foi preparado a partir do eletrólito usado por Sá (2017) em seu estudo, sendo apenas acrescentado zinco à solução, ficando definido como:

- 15 g/L Glicerol fosfato sal dissódico hidratado ($C_3H_7Na_2O_6P.XH_2O$);
- 5 g/L Acetato de magnésio tetrahidratado ($C_4H_6MgO_4.4H_2O$);
- 22 g/L Acetato de zinco ($C_4H_6O_4Zn.2H_2O$).
- 1 L água.

A adição de zinco foi realizada para se obter um melhor desempenho na atividade antibacteriana. Para a execução do PEO foram utilizados 3 L de eletrólito, de modo a acomodar bem a amostra no béquer utilizado e mantendo uma distância segura entre os eletrodos. A medição do pH indica que o eletrólito é levemente ácido ($pH = 6$), estando próximo de neutro. Foi utilizada a fonte de alimentação CC Pulsada Supplier CA Trifásica Modelo FCCE 2400-80-i55451, programada via comunicação serial RS232C. A configuração do aparato utilizado pode ser observada na Figura 3.2, onde apresenta a disposição da fonte de corrente, dos eletrodos e do banho termostático.

Durante a execução do processo PEO, a temperatura foi controlada por meio de sistema de resfriamento em banho termostático em temperatura entre 20-21°C. Após a obtenção do revestimento, o eletrólito é deixado em descanso enquanto retorna à temperatura inicial mínima.

Figura 3.2 - Aparato do processo PEO.



Fonte: LAPEC-UFRGS

Os revestimentos foram obtidos por método potenciostático, utilizando-se como contra eletrodo uma tela de aço inoxidável e como eletrodo de trabalho a própria amostra com uma área superficial de 0,69 cm² aproximadamente.

O regime elétrico ficou definido como:

- Tensão PosP = 500 V;
- Tensão NegP = 0 V;
- Corrente PosP = 20 A;
- Corrente NegP = 0 A;
- TpOn = 1500 μs;
- TnOn = 0 μs;
- TpOff = 1000 μs;
- TnOff = 0 μs;
- Período = 2500 μs;
- Frequência = 400 Hz;
- Duty = 60%;
- CR = Inf.

Não foi utilizado rampa de crescimento para a tensão. Os tempos de duração do processo PEO foram 50s, 120s e 180s.

A nomenclatura das amostras empregadas nos ensaios foi elaborada para indicar o ensaio que cada uma passou, podendo ser observada nos exemplos: Zn0,1_30s e Zn0,1_120s1, onde:

- Zn0,1 - Adição de 0,1M de Acetato de Zn no eletrólito usado no processo PEO;
- 30s - Tempo de duração do processo seguido da unidade de tempo, variando entre 50, 120 e 180s;
- 120s1 - O número 1 após a unidade de tempo informa que essa amostra é a primeira repetição dessa configuração de amostra ensaiada. A primeira amostra de cada configuração não possui numeração de repetição.

Os ensaios foram realizados com no mínimo 3 repetições.

3.3 Caracterizações

As imagens da superfície das amostras com revestimento PEO e substrato foram obtidas por meio de microscopia óptica (MO), utilizando-se um microscópio óptico Carl Zeiss Axio Lab.A1 com Axiocam 105 color.

O ângulo de contato das amostras para determinação da molhabilidade foi obtido a partir do método da gota séssil, por meio de um aparato desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esse método consiste em depositar, por meio de uma micropipeta, uma gota de um líquido sobre a superfície da amostra. Neste estudo foi utilizado água destilada. A gota depositada foi observada por meio de uma lente de baixo aumento, e o ângulo de contato foi medido no *software* SurfTens. As medições foram registradas com no mínimo 3 gotas em regiões distintas das amostras.

Para a caracterização morfológica do substrato e dos revestimentos obtidos, foi-se medido os parâmetros de rugosidade R_a , R_z , R_{sk} e R_{ku} por meio do rugosímetro SURFTEST SJ-410 Surface Roughness Tester SJ-410 MITUTOYO.

Para a avaliação da composição química do revestimento formado, as amostras foram caracterizadas por meio de ensaio de Fluorescência de Raios X (FRX) no Departamento de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo Laboratório de Corrosão, Proteção e Reciclagem de Materiais (LACOR). O equipamento utilizado foi o

Espectrômetro de Fluorescência de Raios X da Thermo Scientific, modelo Niton XL3t Gold+ Portátil.

3.3.1 Reprodutibilidade e Influências dos Parâmetros PEO

O processo PEO engloba fenômenos considerados desconhecidos e relativos às condições impostas, portanto, durante a produção dos revestimentos pelo processo PEO, foi registrado os valores de tensão e densidade de corrente (por meio de programa próprio da fonte de alimentação), temperatura inicial e final (por meio de termômetro digital infravermelho com mira laser) e microscopia óptica (Carl Zeiss Axio Lab.A1 com AxioCam 105 color) para comprovar a capacidade de reprodução do processo PEO empregado para produzir um revestimento texturizado em Ti-cp.

Gráficos para o comportamento da tensão x tempo, da densidade de corrente x tempo e densidade de corrente x tensão foram elaborados, a fim de se evidenciar a similaridade e a reprodutibilidade do experimento, enquanto se observa o comportamento do processo PEO.

3.4 Ensaio de adesão bacteriana

O ensaio de adesão foi conduzido conforme Akmak *et. al.* (2019), feito algumas modificações. O inóculo da bactéria *Escherichia Coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus Aureus* ATCC 25904 (Newman) foi feito de acordo com o descrito por Martinelli *et. al.* (2017).

O ensaio consiste das etapas:

- As bactérias foram cultivadas *overnight* em ágar Luria Bertani (LB), a 37 °C. As colônias foram emulsionadas em solução salina (NaCl 0,9 %) até 0,5 na escala McFarland, e a partir disso foram diluídas mais 10 vezes para obter o inóculo de 10⁷ UFC/mL;
- As bactérias foram espalhadas na placa de petri com um *swab* e, após isso, as amostras testes foram colocadas na superfície da placa de petri com a parte do filme em contato com o inóculo bacteriano;
- As amostras foram previamente esterilizadas em fluxo luminar sob luz ultravioleta, 15 minutos cada lado. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h (AKMAK *et. al.*, 2019);

- Após o término da incubação, as amostras foram retiradas do LB com auxílio de pinça esterilizada e imersas em água peptonada 0,1%, por 1 min sob agitação de um vórtex, para a remoção das células aderidas;
- As soluções de lavagem foram diluídas seriadamente em água peptonada e plaqueadas pelo método de *drop plate* em placas de ágar LB. As placas foram incubadas a 37 °C/24 h em estufa bacteriológica;
- As células viáveis foram calculadas de acordo com as Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

3.5 Ensaios de adesão e viabilidade celular

3.5.1 Cultura das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC)

Neste estudo foram utilizadas células endoteliais da veia umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* - HUVEC). Essas células foram cultivadas nas condições de cultivo com 5% de dióxido de carbono (CO₂) a uma temperatura de 37°C, utilizando como meio de cultura o Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) de baixa glicose, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Laborclin), 2,5 g/L de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES, Sigma-Aldrich), 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Neon), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (1% P/S, Sigma-Aldrich), e o pH ajustado para 7,2.

Os materiais em formato cilíndrico foram expostos a luz ultravioleta (UV) por um período de 15 minutos, em ambas as superfícies inferior e superior, dentro de uma capela de fluxo laminar. Em seguida, foram adicionados em placas de cultura de 48 poços (TCP-48 Kasvi).

3.5.2 Avaliação da adesão celular (DAPI e microscopia)

Para a avaliação da adesão, foram adicionadas 50.000 HUVECs em cada amostra. Após 4 horas da adição das células, o teste de adesão foi conduzido utilizando dicloridrato de 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI). Inicialmente, o meio de cultura dos poços foi descartado e as amostras foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS - *Phosphate-Buffered Saline*).

As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas com PBS, e os núcleos das células aderidas

foram corados com 5 µg/mL de DAPI dissolvidos em tampão fosfato, seguido por uma nova lavagem com PBS (BULLMANN *et al.*, 2023; MAURMANN *et al.*, 2017).

Cinco fotografias foram capturadas em cada uma das cinco amostras por grupo utilizando um microscópio de fluorescência (Leica Dmi8, Leica Microsystems) com uma ampliação de 200x. Os núcleos celulares marcados foram contados, e os resultados foram expressos como o número de células por campo.

3.5.3 Viabilidade celular por atividade mitocondrial (MTT)

A avaliação da viabilidade celular foi conduzida por meio do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium]) de contato direto, com um total de cinco replicatas (n = 5). As células, na densidade de 50.000 por poço, foram cultivadas em 1 mL de meio de cultivo em placas de 48 poços. Após um período de 24 horas, a viabilidade celular foi examinada.

Para estabelecer um controle de morte celular, foi utilizado Triton X-100 a 1% em água por 10 minutos, aplicado imediatamente antes do ensaio de MTT, sobre as células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura.

O ensaio de MTT empregou uma solução de 1 mL por poço, com uma concentração de 0,25 mg/mL, em tampão sem cálcio e magnésio (CMF), com um tempo de incubação de 3 horas a 37°C. Após as 3 horas, os sobrenadantes dos poços foram removidos, e os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) em um volume de 400 µL. Em seguida, 300 µL foram lidos em um espectrofotômetro Multiskan™ FC (Thermo Scientific – Thermo Fisher Scientific®) em uma placa de 96 poços, e os resultados foram calculados pela diferença de absorbâncias nos comprimentos de onda de 630 e 570 nm (BULLMANN *et al.*, 2023; MAURMANN *et al.*, 2017).

3.5.4 Análise estatística

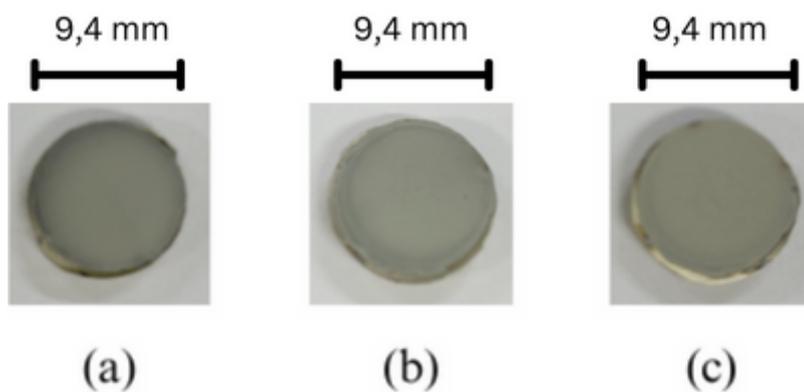
Os resultados de adesão e viabilidade foram expressos como média e erro padrão da média (EPM). Para a avaliação estatística, foi empregado o teste de análise de variância ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey utilizando o programa estatístico PASW *Statistics 18 software* (SPSS) em comparação com o controle (placa de cultivo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterizações de superfície

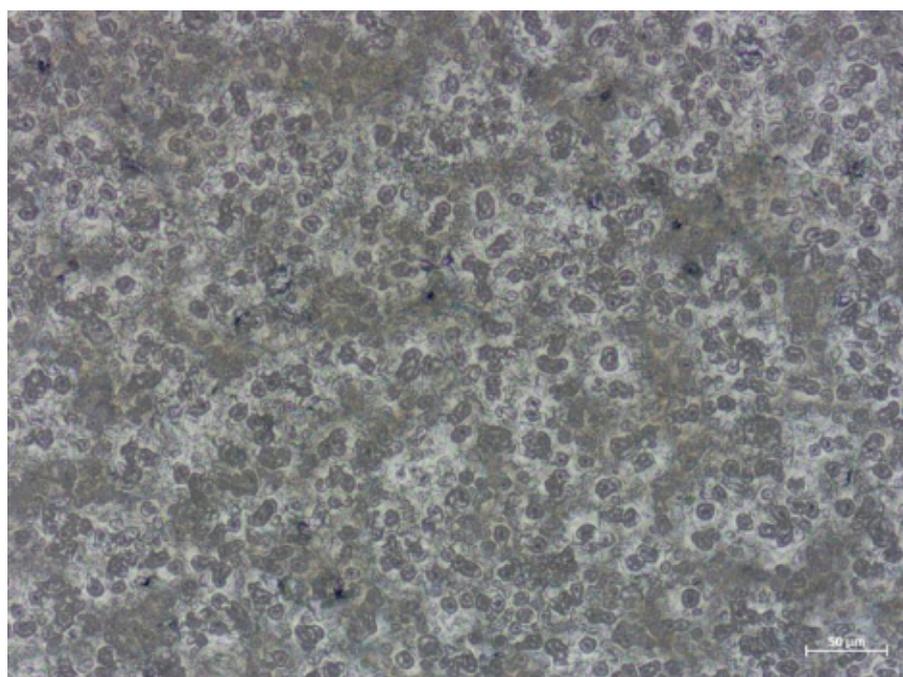
Qualitativamente foi avaliado o aspecto visual das amostras, por meio de fotografia da amostra, como mostrado na Figura 4.1, e microscopia óptica, mostrado nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4, tendo como critério de uniformidade a coloração e a presença de poros e arcabouços (texturização).

Figura 4.1 - Fotografias das amostras com revestimento, para os tempos (a) 50s, (b) 120s e (c) 180s.



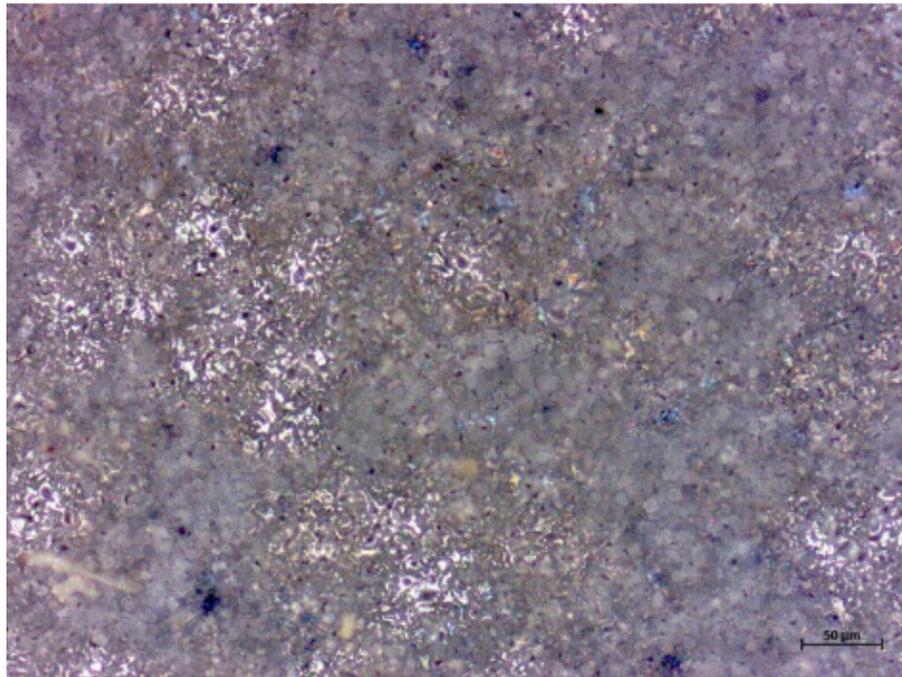
Fonte: O autor.

Figura 4.2 - Microscopia óptica 200x do revestimento obtido em processo PEO com duração de 50s.



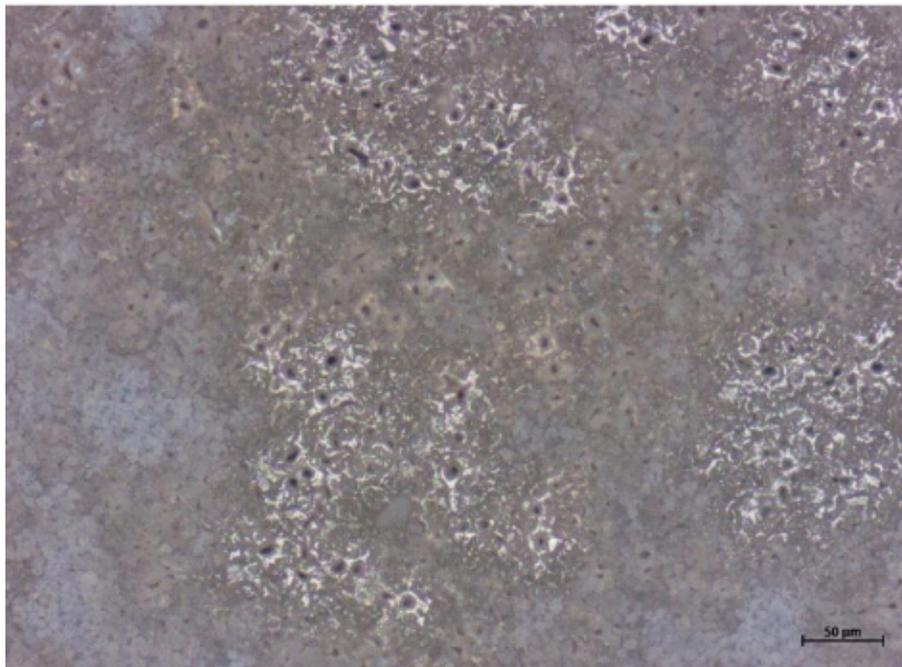
Fonte: O autor.

Figura 4.3 - Microscopia óptica 200x do revestimento obtido em processo PEO com duração de 120s.



Fonte: O autor.

Figura 4.4 -Microscopia óptica 200x do revestimento obtido em processo PEO com duração de 180s.



Fonte: O autor.

A Figura 4.1 evidencia uma leve diferença na coloração das amostras, em função do tempo de PEO, sendo:

- a) 50s: Apresentou um tom de cinza claro, bastante homogêneo em toda a superfície;
- b) 120s: Possui um tom de cinza ligeiramente mais escuro que a amostra de 50s e parece ter uma textura levemente mais granulada;
- c) 180s: Apresenta um tom de cinza ainda mais escuro do que as amostras de 50s e 120s.

As microscopias ópticas, Figuras 4.2, 4.3 e 4.4, revelaram que os revestimentos obtidos por meio de processo PEO demonstraram a formação de poros e arcabouços, sendo observado que:

- 50s: disposição uniforme de poros e arcabouços com diâmetro até 6 μm ;
- 120s: presença uniforme de poros e arcabouços com diâmetro até 7 μm ;
- 180s: apresenta disposição uniforme, com poros e arcabouços com diâmetros variando na faixa de 5 a 12 μm .

As medições foram feitas no *ImageJ.JS*, versão online do *software ImageJ*, em escala micrométrica.

É importante a formação de poros e arcabouços com diâmetro de 5 a 20 μm na superfície do titânio, pois essas dimensões são proporcionais às das células circulantes e/ou endoteliais. Por se tratar de um revestimento produzido por meio de processo PEO, essa formação de poros e arcabouços já é esperada, devido ao método empregado, sendo os microporos criados no momento em que as bolhas de gás e óxido são expelidas durante a fundição, nas áreas afetadas pela ação dos micro-arcos (SÁ, 2017).

Com base nas medições, temos que os revestimentos atingem o diâmetro necessário para a endotelização, todavia os óxidos produzidos com 50s e 120s de processo PEO apresentam muitos poros abaixo de 5 μm , em contrapartida o tempo de 180s produziu poros e arcabouços dentro da faixa ideal para o tecido estudado. Sá (2017), em seu trabalho, opta por trabalhar com 50s de processo PEO, em vista que essa duração proporciona poros e arcabouços com diâmetros de 5 a 15 μm , condizente com as dimensões das células circulantes e endoteliais.

Nessa pesquisa, infere-se que, neste aspecto, o revestimento com 180s de duração de anodização caracteriza-se como mais propício à processos de endotelização, e a diferença deve-se à adição de acetato de zinco na composição do eletrólito usado por Sá (2017). Também foi observado nos experimentos que quanto maior o tempo de exposição das amostras ao plasma, maior foi o diâmetro dos poros produzidos.

A molhabilidade é uma propriedade fundamental para os implantes, visto que a interação eficaz entre fluidos biológicos e uma superfície hidrofílica pode potencializar a resposta celular e a absorção de proteínas. Adicionalmente, a molhabilidade aprimorada

favorece a integração do implante com tecidos moles e duros, e promove a cicatrização de feridas adjacentes, evidenciando seu papel essencial na otimização da funcionalidade dos implantes (SANTOS, 2022). A medição do ângulo de contato pelo Surfens pode ser observada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Ângulo de contato para cada duração do PEO.

| Molhabilidade | |
|---------------|-------------------|
| Duração PEO | Ângulo de contato |
| 50s | 14° ± 7° |
| 120s | 23° ± 8° |
| 180s | 17° ± 10° |

Fonte: O autor.

O ângulo de contato da amostra de 120s (23°) demonstrou ser 9° maior que o de 50s (14°) e 6° maior que o de 180s (17°), entretanto, para os três tempos, as superfícies são classificadas como hidrofílicas, pois seus valores de ângulo de contato estão situados abaixo de 30° e acima de 0° ($0^\circ < \theta < 30^\circ$).

Estudos experimentais sobre a molhabilidade de diversos materiais de engenharia revelaram que a rugosidade superficial afeta significativamente suas propriedades de molhamento, analisadas por medições do ângulo de contato. Esses estudos evidenciaram que superfícies lisas, com rugosidade R_z entre 5 e 10 μm , exibem melhor molhabilidade (KUBIAK *et al.*, 2011).

As amostras passaram por rugosímetro para coleta dos valores dos parâmetros de rugosidade - R_a , R_z , R_{sk} e R_{ku} . A Tabela 4.1 apresenta esses valores.

Tabela 4.2 - Valores de Rugosidade R_a , R_z , R_{sk} e R_{ku} .

| Duração do processo PEO | Antes do processo PEO - Médias | | | |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|
| | R_a (μm) | R_z (μm) | R_{sk} | R_{ku} |
| 50s | 0,17 ± 0,03 | 1,40 ± 0,29 | 0,66 ± 0,13 | 3,73 ± 0,54 |
| 120s | 0,18 ± 0,08 | 1,26 ± 0,52 | 0,27 ± 0,23 | 3,57 ± 0,39 |
| 180s | 0,15 ± 0,02 | 1,13 ± 0,31 | 0,49 ± 0,38 | 4,38 ± 1,29 |
| Após processo PEO - Médias | | | | |
| 50s | 0,51 ± 0,03 | 3,82 ± 0,22 | 1,13 ± 0,04 | 4,23 ± 0,09 |
| 120s | 1,07 ± 0,09 | 6,39 ± 0,31 | 0,16 ± 0,14 | 2,58 ± 0,11 |
| 180s | 0,96 ± 0,04 | 6,84 ± 0,25 | 0,07 ± 0,14 | 3,28 ± 0,61 |

Fonte: O autor.

Os valores de rugosidade média (R_a) após o processo PEO aumentou em 3x para o tempo de 50s, e em torno de 6x para o tempo de 120s e 6,5x para 180s. Para a rugosidade de profundidade média (R_z), o aumento dos valores de rugosidade foi semelhante ao aumento do R_a , ficando em 2,7x para o tempo de 50s, 5,1x para o tempo de 120s e 6,1x para o tempo de 180s. Os valores de rugosidade média para 120s e 180s estão bem próximos, assim como o ângulo de contato apresentado por eles.

Tais indicadores de rugosidade revelam dados importantes sobre a textura superficial e seu efeito na aderência de células, servindo como ferramentas para aprimorar o entendimento e a gestão de procedimentos associados a biomateriais e à interação entre células e implantes (BULLMANN *et al.*, 2023; NICOLAS-SILVENTE *et al.*, 2020).

Os valores de R_a das amostras com revestimentos produzidos nos tempos de 120s e 180s de PEO se aproximam mais dos valores de rugosidade encontrados nos implantes comerciais, que variam de 1 a 2 μm . A rugosidade para o tempo de 50s pode ser classificada como minimamente rugosa ($R_a = 0,5-1,0 \mu\text{m}$), tendendo a ser uma superfície lisa. Para o tempo de 120s temos uma superfície moderadamente rugosa ($R_a = 1,0-2,0 \mu\text{m}$), já para o tempo de 180s temos uma superfície minimamente rugosa ($R_a = 0,5-1,0 \mu\text{m}$) próxima de uma configuração moderadamente rugosa, que é a mais encontrada nos implantes comerciais, pois apresenta melhor interação célula-substrato (NICOLAS-SILVENTE *et al.*, 2020). Superfícies com maior rugosidade proporcionam uma área de contato ampliada para ancoragem, defesa contra forças de cisalhamento e mudanças químicas que resultam em interações físico-químicas intensas com a superfície (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Os valores de R_z dos revestimentos foram 3,824 μm (50s), 6,395 μm (120s) e 6,836 μm (180s), o que nos mostra que os tempos de 120s e 180s são mais rugosos que o de 50s e, em contrapartida, menos uniformes, o que pode diminuir o desempenho antimicrobiano (BULLMANN, 2023). Vale ressaltar que R_z é um parâmetro de rugosidade linear que é influenciado por arranhões, danos e contaminação (ROSENTRITT; SCHNEIDER-FEYRER; KURZENDORFER, 2024).

O R_{sk} mede a simetria da distribuição de altura, indicando se há mais picos altos e "afiados" com vales mais rasos e amplos (valor positivo), ou se há pequenos picos com vales profundos e estreitos (valor negativo). Os valores de rugosidade R_{sk} das amostras deste estudo indicam a existência de uma assimetria positiva, ou seja, esses óxidos apresentam picos altos e aguçados com vales mais rasos e amplos. O óxido formado pelo processo PEO com duração de 50s apresentou valor mais alto dentre os revestimentos produzidos, enquanto os tempos de 120s e 180s, apesar de positivos, se aproximam do zero, o que indica uma distribuição de

altura mais uniforme, com um número parecido de picos e vales (BA *et. al.*, 2024; THOMAS, 1998; BULLMANN, 2023)

Os valores de curtose das amostras (R_{ku}), nos mostra que, dentre os revestimentos formados, o de 120s apresenta distribuição dos picos mais espalhada ($R_{ku} < 3$), enquanto os de 50s e 180s apresentam a distribuição dos picos mais central e mais ordenada ($R_{ku} > 3$). O R_{ku} descreve a probabilidade de achatamento do perfil em relação à distribuição Gaussiana, representada pelo valor 3 ($R_{ku} = 3$). Superfícies com picos e vales relativamente planos são refletidas em uma curtose menor que 3, enquanto um valor de curtose acima de 3 indica picos e vales mais agudos (BA *et. al.*, 2024; THOMAS, 1998).

As amostras foram analisadas por espectrometria de Fluorescência de Raios X (FRX) para obtenção da composição química, em prol de avaliar se houve a incorporação de zinco no revestimento produzido. A Tabela 4.2 apresenta esses valores.

Tabela 4.3 - Incorporação de Zn nos revestimentos.

| Tempo de duração do PEO | Zn (% em peso) |
|-------------------------|----------------|
| 50s | 0,63 ± 0,05 |
| 120s | 2,86 ± 0,65 |
| 180s | 4,65 ± 0,80 |

Fonte: O autor.

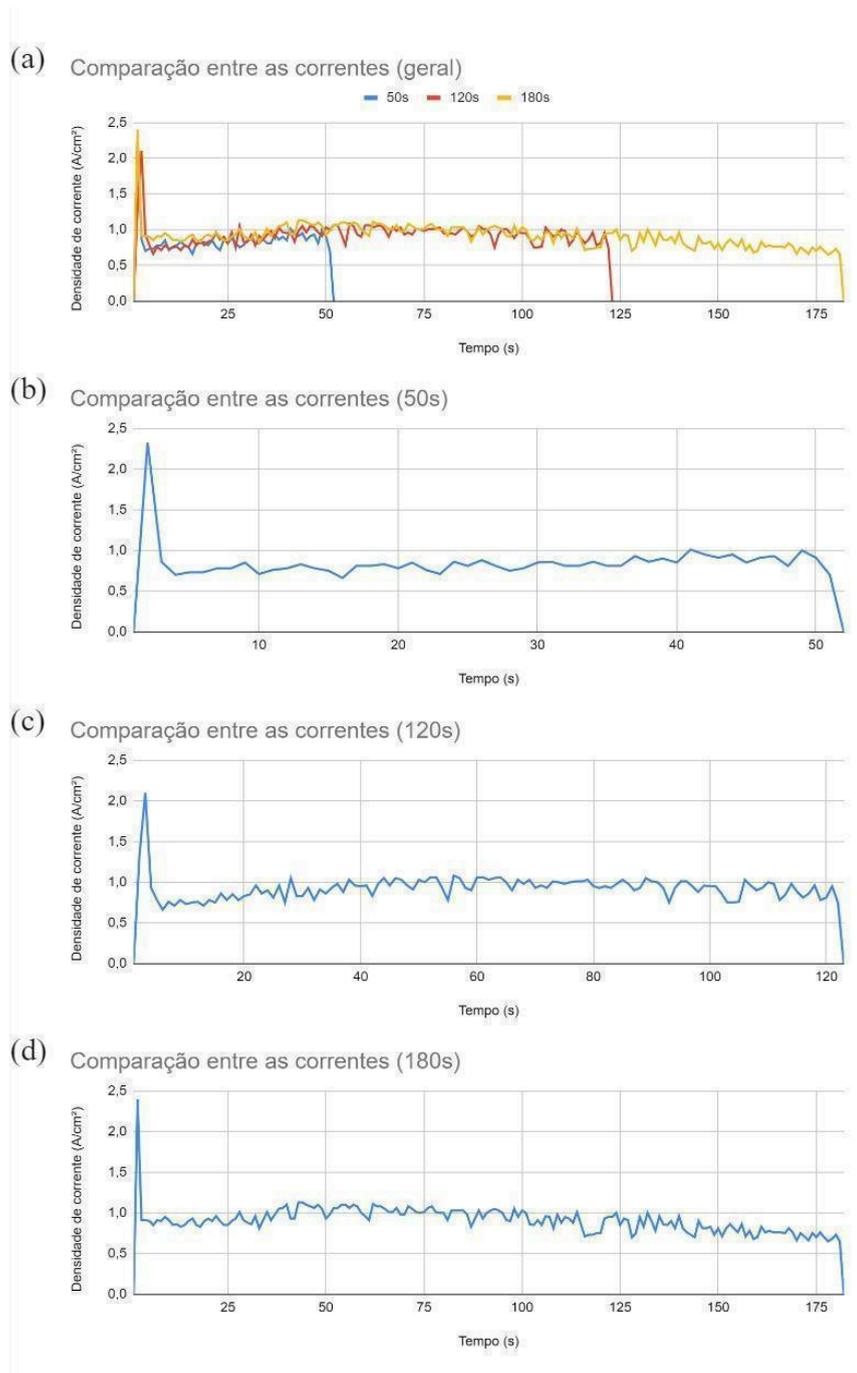
Por meio da Tabela 4.2, podemos observar que cada duração apresentou Zn incorporado em sua composição química (% em peso), sendo, em média, 0,63% para 50s, 2,86% para 120s e 4,65% para 180s. Portanto, a incorporação de Zn aumentou com o tempo de processo PEO. O revestimento é formado em sua maioria por titânio e zinco (ANEXO).

Outros elementos presentes no eletrólito (como o fósforo e o magnésio) não foram incorporados ao revestimento, conforme apontado pelo FRX, todavia pode haver pequenas incorporações desses elementos que não foram lidos pelo equipamento, devido à sua sensibilidade (limite de detecção). Um exemplo de elemento que é conhecido por estar no revestimento é o oxigênio (revestimento de óxido), todavia o FRX não possui capacidade de identificar e quantificar esse elemento.

4.1.1 Reprodutibilidade e Influências dos Parâmetros PEO

Gráficos para o comportamento da densidade de corrente x tempo do experimento foram plotados, Figura 4.5, onde pode-se observar o pico inicial que ocorre devido ao início da passagem de corrente pela amostra de Ti-cp.

Figura 4.5 - Comparação entre as densidades de corrente das amostras em (a) geral e para os tempos (b) 50s, (c) 120 e (d) 180s.

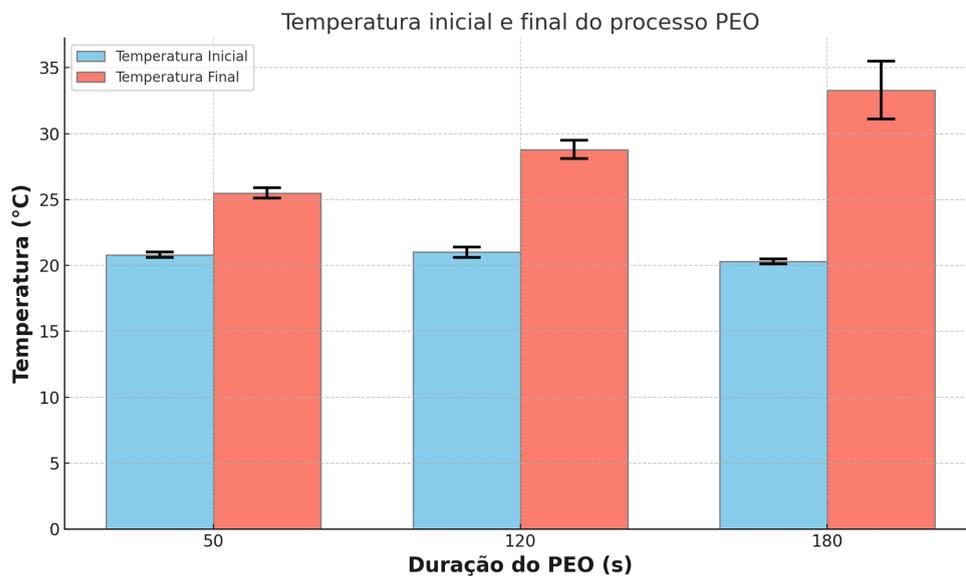


Fonte: O autor.

Analisando a Figura 4.5 observamos que, independentemente do tempo de duração do processo PEO, o revestimento é formado, majoritariamente, na faixa de 0,5-1,5 A/cm², com a estabilização da formação do óxido no entorno de 1,0 A/cm². Em uma de 120s e outra de 180s a densidade de corrente sobe para valores próximos ao do pico inicial em momentos distintos, todavia esse salto não gerou influência na incorporação de zinco pela amostra, em contrapartida pode-se notar uma tendência em aumentar a assimetria da rugosidade (R_{sk}) para picos mais altos e vales mais rasos.

A temperatura inicial e final foi observada, Figura 4.6, a fim de se analisar a influência dela no processo PEO.

Figura 4.6 - Comparação entre as temperaturas inicial e final do procedimento.



Fonte: O autor.

Observa-se na Figura 4.6 que a diferença de temperatura aumenta conforme se estende o processo PEO. A temperatura inicial foi estabelecida na faixa de 20,0-22,0°C, pois abaixo dessa faixa ou muito acima dela notava-se diferença na coloração da amostra (aspecto visual) e sua microscopia revelava uma morfologia menos uniforme, além de atraso para quebra da barreira dielétrica e início da formação do óxido com interação dos elementos do eletrólito. Portanto, a temperatura de início foi mantida nessa faixa para assim evitar diferenças de energia no sistema e que afetasse também a densidade de corrente ao longo do processo. Durante toda a duração do processo PEO houve a presença de bolhas de gases, emissão luminosa e ruídos característicos das micro descargas de plasma que formam o óxido. O

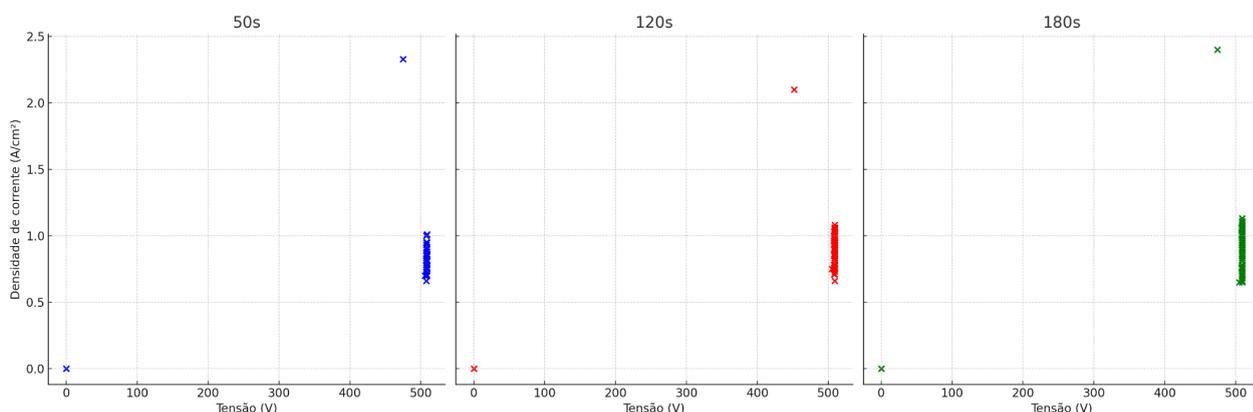
procedimento realizado neste trabalho foi otimizado justamente para que houvesse micro descargas durante todo o processo, aparecendo desde o primeiro segundo de execução.

A influência da temperatura pode ser observada anteriormente em outro experimento, com adição de 0,023 M de Zn em vez de 0,1 M, onde para temperatura inicial acima de 26,0°C ocorreu a leitura de valores baixos de corrente nos primeiros segundos, atrasando o pico inicial que marca a quebra do revestimento formado na passivação do titânio e começa a se formar o revestimento que incorpora elementos do eletrólito. Isso pode estar relacionado com a resistividade da amostra de titânio puro e do eletrólito no momento em que se inicia o processo, pois apesar de o aumento da temperatura aumentar a condutividade do meio aquoso, essa relação ocorre de modo inverso para o material metálico, no caso o titânio, que percebe uma aumenta de sua resistividade à passagem de elétrons devido à redução de sua mobilidade.

Foi utilizado sistema de resfriamento para se acelerar a diminuição de temperatura do eletrólito entre os usos, tendo em mente que a temperatura ao final do processo varia entre 26-36°C.

Foi plotado o gráfico do comportamento da densidade de corrente pela tensão de cada amostra, Figura 4.7, para assim entender melhor o comportamento do procedimento de formação dos revestimentos de óxido.

Figura 4.7 - Comparação do comportamento da densidade de corrente pela tensão de cada amostra



Fonte: O autor.

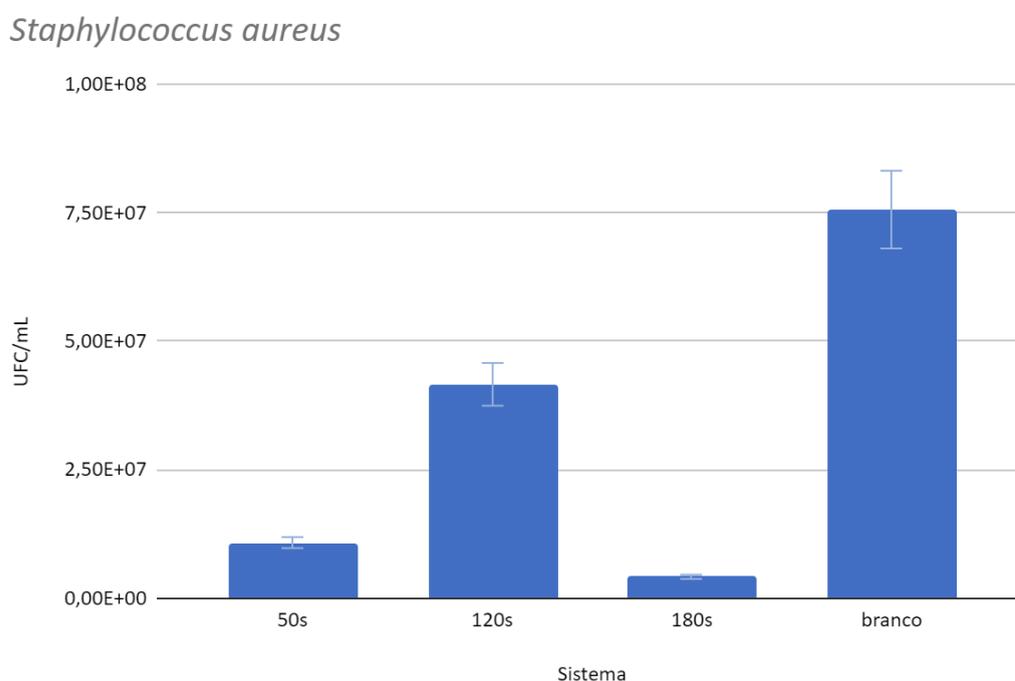
A Figura 4.7 nos exhibe os pontos que não se assemelham aos gráficos plotados em Yerokhin, A. L. et al. (1999), Figura 2.3, e Simchen *et al.* (2020), Figura 2.4, pois o processo aplicado nessa pesquisa se atém apenas a etapa em que ocorre os micro arcos, além de que a tensão é fixada em 500 V, sendo esse o valor lido durante quase todo o processo PEO, todavia pode-se observar que, conforme estabelecido pelos autores, o comportamento do processo

PEO desta pesquisa pode ser classificado como complexo, onde o sistema é descrito por quatro fases (metal-dielétrico-gás-eletrólito) com múltiplas possíveis fronteiras de fase, especialmente em tensões críticas (500 V), todavia vale ressaltar que para melhor exatidão seria necessário estudar o processo com ambos tensão e corrente livres, para se analisar o comportamento da curva que seria gerado nesse cenário.

4.2 Análise da Atividade Antibacteriana do Revestimento

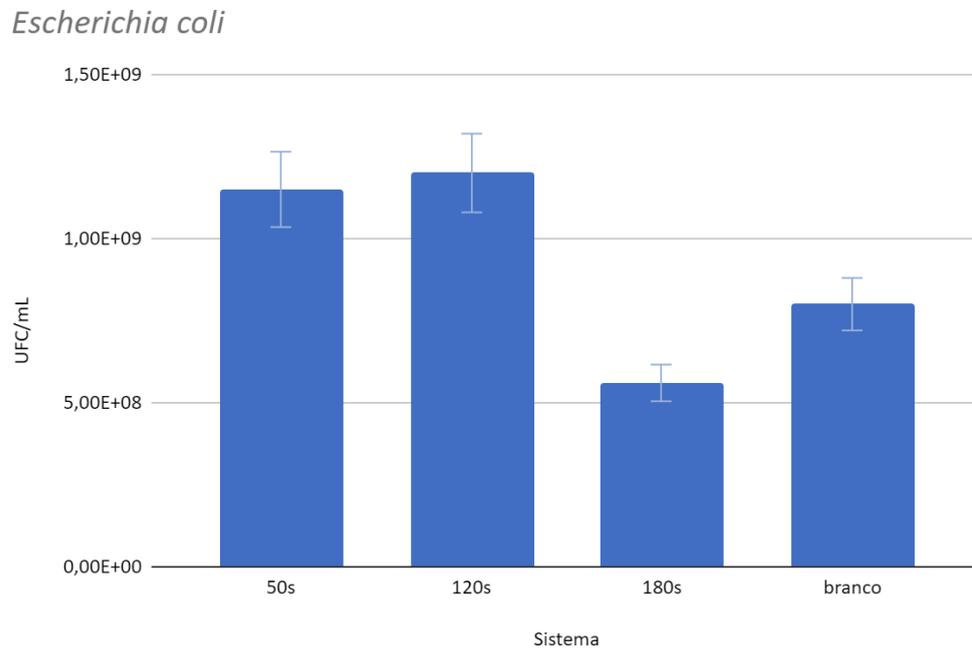
A atividade antibacteriana foi avaliada por meio das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) para espécies Gram-positivas e Gram-negativas, sendo neste caso empregados a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*, respectivamente. A contagem das UFC por mL de cada sistema e para tipo de bactéria pode ser observado nas Figuras 4.8 e 4.9.

Figura 4.8 - Unidades Formadoras de Colônias/mL em superfícies do substrato Ti-cp pré-tratado (branco) e com revestimento obtido por processo PEO, para *S. aureus*.



Fonte: O autor.

Figura 4.9 - Unidades Formadoras de Colônias/mL em superfícies do substrato Ti-cp pré-tratado (branco) e com revestimento obtido por processo PEO, para *E. coli*.



Fonte: O autor.

A Figura 4.8 nos mostra que a presença de UFC/mL nos sistemas de 50s, 120s e branco foi 2,60, 10,02 e 18,22 vezes maior que no sistema de 180s de processo PEO. Já na Figura 4.9 temos que, para os sistemas de 50s, 120s e branco, os valores de UFC/mL foram 2,05, 2,14 e 1,43 vezes maior que no sistema de 180s.

As Figuras 4.8 e 4.9 nos revelam que, para ambas espécies de bactéria, o resultado foi satisfatório no sistema de 180s, que apresentou ação antibacteriana ao inibir a formação dos biofilmes, visto que seus valores de UFC/mL foram menos que do sistema sem revestimento formado por PEO (branco).

Os sistemas de 50s e 120s apresentaram bom desempenho contra a formação de biofilme contra a espécie *S. aureus*, todavia ambos os tempos falharam na inibição do crescimento do biofilme contra a espécie *E. coli*. Portanto, o sistema de 180s demonstrou ter melhores capacidades de ação antibacteriana dentre os sistemas testados.

O efeito antibacteriano apresentado pode estar relacionado com a incorporação de zinco no revestimento formado por PEO, visto que o metal tem sua eficácia comprovada em outros estudos contra espécies do tipo Gram-positivo e Gram-negativo (KUMAR *et al.*, 2017; S; N; P.P, 2020;).

Os mecanismos de ação antibacteriana do zinco ainda são discutidos na literatura, dentre eles, se destacam: a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) através do efeito fotocatalítico característico de partículas de óxidos de zinco e a lixiviação de íons metálicos advindos de nanopartículas e/ou íons implantados na superfície do material. Ambos os mecanismos agem através da interação desses agentes com a membrana celular das bactérias, causando seu rompimento e consequente morte dos micro-organismos (QI et al., 2017, JIANG; LIN; CAI, 2020).

Os ROS são produtos de redução de um único elétron do oxigênio, que dependendo do meio que está inserido, pode formar ânions de superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio H_2O_2 . Essas espécies reativas de oxigênio reagem com as ligações químicas de matéria orgânica, a degradando (BAYR, 2005, AL-JUMAILI *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2020). Esse processo ocorre preferencialmente quando há a excitação do óxido de zinco por uma fonte de radiação visível/ultravioleta, através de reações fotocatalíticas (Leung *et al.*, 2016).

Outro mecanismo de atividade antibacteriana do zinco é descrito pela lixiviação de íons do metal para o meio aquoso. Nesse caso, o cátion pode ser atraído eletrostaticamente até a superfície da membrana celular carregada negativamente, interferindo no equilíbrio de carga, causando uma deformação celular e posterior rompimento da mesma, resultando na desnaturação de proteínas, destruição do DNA e consequente queda na proliferação celular do biofilme (Jiang; Lin; Cai, 2020).

Visto que o processo de PEO pode incorporar íons do metal presente no eletrólito ao revestimento, é possível que o mecanismo de lixiviação de cátions de zinco adicionados ao óxido de titânio possa estar atuando no comportamento antibacteriano das amostras. Além disso, as amostras com maior tempo de síntese (180s), que apresentaram a maior concentração de zinco (Tabela 4.2), obtiveram a melhor atividade antibacteriana contra ambas as espécies estudadas. Enquanto as amostras com menor concentração de zinco (50s e 120s), apresentaram menor contagem de UFC/mL que o branco, porém maior do que o sistema de 180s.

Na atividade antibacteriana para a espécie *S. aureus* (Gram-positiva) a quantidade de zinco incorporada por PEO não está diretamente relacionada à atividade antibacteriana do revestimento (crescimento para amostra de 120s maior que para a amostra 180s, que ficou próxima da amostra de 50s) (Figura 4.8). No entanto, tanto para *S. aureus* (Gram-positiva (Figura 4.8) como para a espécie *E. coli* (Gram-negativa) (Figura 4.9), há um desfavorecimento do crescimento do biofilme nas amostras com maiores concentrações de

zinco, demonstrando que a concentração incorporada através da síntese por PEO é crucial na ação antibacteriana do biomaterial.

Além disso, outro fator que colabora com essa hipótese é que os revestimentos formados por PEO apresentaram uma morfologia superficial com elevados valores de rugosidade (Tabela 4.1). Superfícies rugosas são características por favorecerem o crescimento de biofilmes bacterianos, devido a presença de uma maior área de contato disponível para fixação dos micro-organismos, proteção contra forças de cisalhamento e alterações químicas, que nesse caso podem resultar em fortes interações com a superfície e poros do biomaterial. (Bullmann; Malfatti, 2023)

Os resultados obtidos indicam que a análise da eficácia antibacteriana de revestimentos em biomateriais requer a consideração conjunta dos múltiplos parâmetros, incluindo as propriedades tanto do revestimento quanto do substrato. A interação entre a complexidade topográfica do substrato metálico, em níveis micro e nanométricos, e a incorporação de espécies reativas afeta significativamente a composição e a atividade biológica do revestimento. As topografias dos filmes resultantes podem alterar a eficácia antibacteriana através da liberação de agentes bioativos (BULLMANN, 2023).

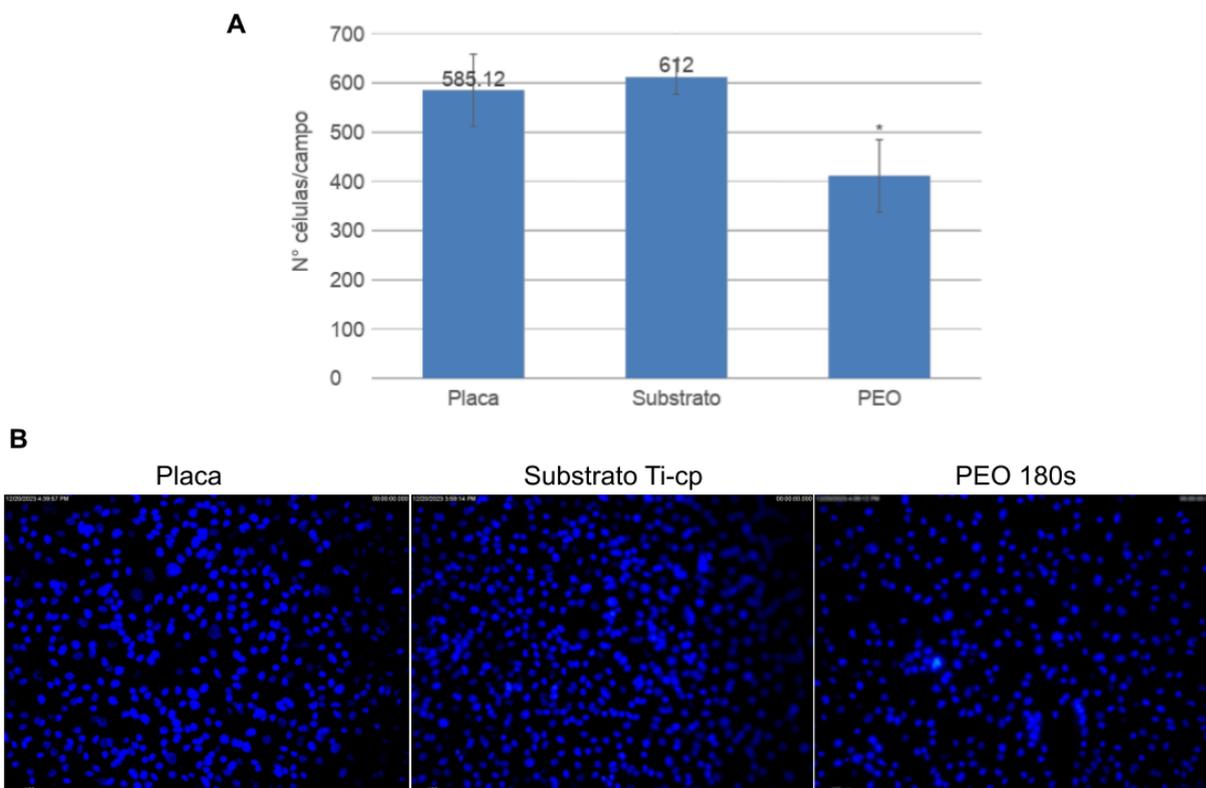
4.3 Adesão e Viabilidade de Células HUVEC

Para esses testes com células HUVEC foram utilizadas amostras correspondentes apenas ao sistema de 180s, que demonstrou melhor desempenho antibacteriano, sendo esse um dos critérios mais importante quando se avalia a biocompatibilidade de implantes e dispositivos biomédicos.

Os resultados da avaliação de células fixadas após 4 horas e aderidas aos materiais estão demonstrados na Figura 4.10.

Figura 4.10 - Ensaio de adesão de células HUVEC fixadas e coradas com DAPI 4 horas após a semeadura. A)

Dados expressos em média e EPM da quantificação de núcleos por campo do microscópio. * indica redução estatisticamente significativa da adesão em relação a placa e ao substrato ($p \leq 0,05$). B) Imagens de microscopia de fluorescência. Fotos representativas dos núcleos das células coradas com DAPI em azul. Aumento de 200x com barra de escala de 100 μm . Placa corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura.

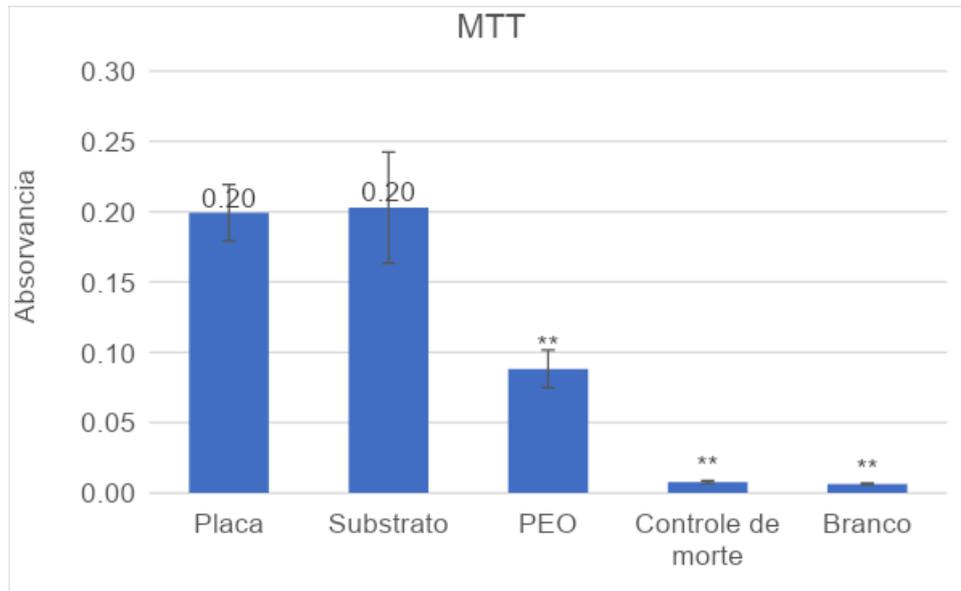


Fonte: O autor.

A quantificação dos núcleos em cada campo do microscópio revelou um menor número de células aderidas no grupo PEO em comparação com o grupo de células cultivadas diretamente na placa de cultivo ($p = 0,032$) bem como o grupo de células cultivadas no substrato ($p = 0,011$). A Figura 4.10B demonstra em coloração azul os núcleos das células aderidas nos grupos placa de cultivo, substrato e PEO.

Os resultados da avaliação da viabilidade das células cultivadas por 1 dia diretamente nos materiais (MTT direto) indicou citotoxicidade das amostras PEO (Figura 4.11).

Figura 4.11 - Ensaio de viabilidade (MTT) de contato direto de células HUVEC com os materiais após 1 dia. As células foram semeadas diretamente nos materiais (substrato e PEO). Placa corresponde as células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura, “Controle de morte” representa o controle de morte (células cultivadas nas placas e tratadas com 1% de Triton X-100) e Branco corresponde ao branco (poços sem células). Dados expressos em média e EPM. ** indica resultados com $p < 0,001$ em relação ao controle (placa) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.



Fonte: O autor.

Os resultados de absorvância média, desvio padrão e significância estatística em comparação com o controle foram: $0,20 \pm 0,02$ das células cultivadas na placa de cultura; $0,20 \pm 0,04$ ($p = 1,000$) no substrato; $0,09 \pm 0,01$ ($p = 0,009$) no PEO; $0,01 \pm 0,00$ ($p = 0,000$) no controle de morte com Triton e $0,01 \pm 0,00$ ($p = 0,000$) no branco. Além do controle de morte que apresentou 4% de viabilidade, o grupo PEO resultou em 44% de viabilidade, indicando citotoxicidade, uma vez que a redução da absorvância foi maior do que 30% (ISO 10993-5: 2009).

5. CONCLUSÕES

O processo PEO, empregado na produção dos revestimentos, pode ser classificado como complexo, onde o sistema é descrito como de quatro fases (metal-dielétrico-gás-eletrólito) com múltiplas possíveis fronteiras de fase, especialmente em tensões críticas. Independente do tempo de duração do processo PEO, o revestimento é formado na faixa de 0,5-1,5 A/cm², com a estabilização da formação do óxido na densidade de corrente de aproximadamente 1,0 A/cm². A temperatura inicial do processo se mostrou relevante, uma vez que, para temperaturas mais elevadas, demonstrou capacidade de dificultar a quebra do dielétrico, atrasando o início da formação de óxido (aparecimento de micro arcos e emissão luminescente e de ruídos).

Os revestimentos obtidos por meio de processo PEO foram constituídos principalmente por zinco e titânio, sendo o Zn proveniente do eletrólito e o Ti do substrato das amostras. Observou-se, para os parâmetros de PEO empregados, que a concentração de Zn incorporado nos óxidos aumentam com o tempo de processo.

Para os três tempos de duração do processo PEO a superfície funcionalizada é classificada como hidrofílica (ângulo de contato entre 0° e 30°), o que é bom, pois a interação eficaz entre fluidos biológicos e superfícies hidrofílicas pode potencializar a resposta celular e a absorção de proteínas.

A topografia das superfícies dos sistemas medidos nos revelou superfícies minimamente rugosas (Ra = 0,5-1,0 µm) a moderadamente rugosas (Ra = 1,0-2,0 µm), sendo esta última a mais encontrada em implantes comerciais, pois apresentam melhor interação célula-substrato.

Os resultados obtidos mostraram que os revestimentos formados por PEO apresentaram poros e arcações o que é importante na morfologia de um revestimento para a interação com células circulantes e/ou endoteliais. Os melhores resultados de endotelização foram obtidos com tempos de processo PEO de 180s, que promoveu a formação de poros dentro da faixa ideal de 5-20 µm.

Para as amostras anodizadas por PEO e testadas contra bactérias Gram-positivas, especificamente a *S. Aureus*, as amostras obtidas com tempo de PEO de 180s foram as que apresentaram resposta antibacteriana mais eficiente. Para as bactérias Gram-negativas, especificamente a *E. coli*, as amostras obtidas com tempo de PEO de 50s e 120s demonstraram presença elevada de UFC/mL (maiores até mesmo que o substrato de Ti-cp), e apenas as amostras obtidas com tempo de PEO de 180s foi capaz de inibir a formação de

biofilme. Portanto, frente a *S. aureus* todos os sistemas obtiveram ação antibacteriana, todavia contra *E. coli* apenas o sistema de 180s apresentou foi eficaz. Esse efeito pode estar diretamente relacionado à concentração de zinco incorporado no revestimento obtido por PEO.

Os ensaios de adesão e viabilidade celular aplicados ao sistema de 180s (melhor efeito antibacteriano) resultaram em uma adesão significativamente baixa - em relação aos grupos de células cultivadas diretamente na placa de cultivo e no substrato, e em 44% de viabilidade, indicando citotoxicidade, uma vez que a redução da absorbância em relação ao controle foi maior que 30%.

Logo, a incorporação de zinco se mostrou capaz de melhorar a ação antibacteriana de amostras de Ti-cp, no entanto, a citotoxicidade observada sinaliza a necessidade de otimização dos parâmetros do processo para garantir a biocompatibilidade total dos revestimentos para aplicações biomédica

O processo PEO demonstrou ser capaz de alterar a superfície metálica para incorporar e realçar características específicas desejadas, aliado ao fato de usar eletrólitos aquosos levemente ácidos (pH = 6), e a capacidade de incorporar elementos do meio, se mostra uma técnica bastante relevante e promissora para tratamentos eletroquímicos na área biomédica, uma vez que é possível alterar seus parâmetros de controle para modificar as características do óxido formado, e sua execução é simples, se comparado a outros tratamentos químicos ou eletroquímicos.

TRABALHOS FUTUROS

- Ensaios eletroquímicos nas amostras funcionalizadas por processo PEO;
- Investigar efeitos antibacterianos com outros metais e combinação de elementos, podendo formar óxidos complexos;
- Estudo dos parâmetros do processo PEO, em especial o regime elétrico, para alteração e texturização de superfícies de Ti e ligas;
- Estudo da variação de concentração de zinco e incorporação de outros elementos do eletrólito.

REFERÊNCIAS

AKMAK, K. C. et al. “Plasma polymerized linalool (ppLin): an antimicrobial and biocompatible coating”. Em: Turkish Journal of Chemistry 43.1 (fev. de 2019), pp. 323– 334.

AL-JUMAILI, Ahmed et al. Eco-friendly nanocomposites derived from geranium oil and zinc oxide in one step approach. Scientific Reports, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 5973, 2019.

ALIOFKHAZRAEI, M. et al. Review of plasma electrolytic oxidation of titanium substrates: Mechanism, properties, applications and limitations. Applied Surface Science Advances, v. 5, p. 100121, 2021.

ALLOCATI, Nerino et al. Escherichia coli in Europe: an overview. International journal of environmental research and public health, v. 10, n. 12, p. 6235-6254, 2013.

ALMEHMADI, Ahmad H. Effect of Magnesium-Based Coatings on Titanium or Zirconia Substrates on Bone Regeneration and Implant Osseointegration-A Systematic Review. Frontiers in Materials, v. 8, p. 754697, 2021.

ARAÚJO, Emiliane Andrade et al. Control of microbial adhesion as a strategy for food and bioprocess technology. Food and Bioprocess Technology, v. 3, p. 321-332, 2010.

ASL, Hojjat Ghahramanzadeh et al. The Comparison of wear performances of CP-Ti, Ti6Al4V, Ti45Nb alloys oxidized by anodic oxidation under ambient air and vacuum conditions. Materials Today Communications, p. 105466, 2023.

AVEZUM, Álvaro; MAIA, Lilia Nigro; MARCELO, Nakazone. Cenário das doenças cardiovasculares no mundo moderno. In: Manual de cardiologia. 2012. p. 1-5.

BA, Elhadji Cheikh Talibouya et al. Study of the behavior of skewness (Rsk) and kurtosis (Rku) parameters in the dry drilling process of Al-Mg-Si alloy 6351 T6 using a Diamond-Like Carbon coated high-speed steel tool. Tribology International, v. 191, p. 109149, 2024.

BAYR, Hülya. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 33, n. 12, p. S498, 2005.

BERGDOLL, Merlin S. *Staphylococcus aureus*. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 74, n. 4, p. 706-710, 1991.

BLOUNT, Zachary D. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, v. 4, p. e05826, 2015.

Bock, Eduardo Guy Perpétuo. *Engenharia, Materiais e Dispositivos de Assistência Ventricular*. São Paulo, SP: 2020.

BRUNETTE, Donald M. et al. *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*. Berlin: Springer, 2001.

BULLMANN, Matheus da Silva. *Funcionalização da Liga Ti6Al4V via Polimerização por Plasma Frio Empregando Óleo Essencial de Eucalyptus globulus como Precursor: Atividade Antibacteriana, Adesão e Viabilidade de Células-tronco Mesenquimais*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 115p. 2023.

BULLMANN, Matheus Silva et al. Eucalyptus globulus essential oil thin film polymerized by cold plasma on Ti6Al4V: Sterilization effect, antibacterial activity, adhesion, and viability of mesenchymal stem cells. *Plasma Processes and Polymers*, v. 11, n. 20, 2023.

BULLMANN, Matheus da Silva; MALFATTI, Celia. *Funcionalização de superfícies visando efeito bactericida a partir de filmes produzidos por polimerização à plasma frio e precursores de origem natural*. in: *Ciência e Tecnologia dos Biomateriais*, 2023. Anais [...]. [S. l.: s. n.], 2023. p. 1. Disponível em: <https://www.even3.com.br//anais/biomat22/596280-funcionalizacao-de-superficies-visando-efeito-bactericida-a-partir-de-filmes-produzidos-por-polimerizacao-a-plasm>. Acesso em: 17 jul. 2023.

CAI, Bianyun et al. Bioinspired fabrication of calcium-doped TiP coating with nanofibrous microstructure to accelerate osseointegration. *Bioconjugate Chemistry*, v. 31, n. 6, p. 1641-1650, 2020.

CAO, Yi et al. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, n. 12, p. 1359-1369, 2017.

CHEN, Chiang-Sang et al. Improving the in vitro cell differentiation and in vivo osseointegration of titanium dental implant through oxygen plasma immersion ion implantation treatment. *Surface and Coatings Technology*, v. 399, p. 126125, 2020.

CHESSA, Daniela et al. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis virulence strains as causative agents of persistent infections in breast implants. *PLoS One*, v. 11, n. 1, p. e0146668, 2016.

CHUKWUIKE, V. I.; SHTANSKY, Dmitry V.; SUBRAMANIAN, B. Biocompatibility study of nanocomposite titanium boron nitride (TiBN) thin films for orthopedic implant applications. *Surface and Coatings Technology*, v. 410, p. 126968, 2021.

CISTERNAS, M. et al. Study of nitrogen implantation in Ti surface using plasma immersion ion implantation & deposition technique as biocompatible substrate for artificial membranes. *Materials Science and Engineering: C*, v. 113, p. 111002, 2020.

EISENBARTH, E. et al. Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomolecular engineering*, v. 19, n. 2-6, p. 243-249, 2002.

ELIAZ, Noam. Corrosion of metallic biomaterials: a review. *Materials*, v. 12, n. 3, p. 407, 2019.

FADEEVA, Inna V. et al. In vitro properties of manganese-substituted tricalcium phosphate coatings for titanium biomedical implants deposited by arc plasma. *Materials*, v. 13, n. 19, p. 4411, 2020.

FOSTER, Timothy J. Staphylococcus aureus. *Molecular Medical Microbiology*, p. 839-888, 2002.

FRESHNEY, R. Ian. Cytotoxicity. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 2005.

GOMES, Tânia AT et al. Diarrheagenic escherichia coli. *brazilian journal of microbiology*, v. 47, p. 3-30, 2016.

GÜLTAN, Tuğçe; YURTSEVER, Merve Çapkın; GÜMÜŞDERELİOĞLU, Menemşe. NaOH-etched/boron-doped nanohydroxyapatite-coated PEEK implants enhance the proliferation and differentiation of osteogenic cells. *Biomedical Materials*, v. 15, n. 3, p. 035019, 2020.

GUMMADI, Jitendra; ALANKA, Sandeep. A review on titanium and titanium alloys with other metals for biomedical applications prepared by powder metallurgy techniques. *Materials Today: Proceedings*, 2023.

HUANG, Her-Hsiung et al. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular engineering*, v. 21, n. 3-5, p. 93-97, 2004.

ISO, I. 10993–5: 2009 Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva, p. 34, 2009.

IVANOVA, Elena P. et al. Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention. *Langmuir*, v. 26, n. 3, p. 1973-1982, 2010.

JIANG, Shengjie; LIN, Kaili; CAI, Ming. ZnO Nanomaterials: Current Advancements in Antibacterial Mechanisms and Applications. *Frontiers in Chemistry*, [s. l.], v. 8, p. 580, 2020.

JIANG, B. L.; WANG, Y. M. Plasma electrolytic oxidation treatment of aluminium and titanium alloys. In: *Surface engineering of light alloys*. Woodhead Publishing, 2010. p. 110-154.

JINLONG, Wang et al. Effect of surface roughness on the fatigue failure and evaluation of TC17 titanium alloy. *Materials Science and Technology*, v. 37, n. 3, p. 301-313, 2021.

JOHNSON, M. R. et al. Heart transplantation in the United States, 1999-2008. *American Journal of Transplantation*, v. 10, n. 4, p. 1035-1046, 2010.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry LT. Pathogenic escherichia coli. *Nature reviews microbiology*, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KAUR, Manmeet; SINGH, K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Materials Science and Engineering: C*, v. 102, p. 844-862, 2019.

KING, Paul H.; FRIES, Richard C.; JOHNSON, Arthur T. *Design of biomedical devices and systems*. Crc Press, 2014.

KUBIAK, K. J. et al. Wettability versus roughness of engineering surfaces. *Wear*, v. 271, n. 3-4, p. 523-528, 2011.

KUMAR, Rajesh et al. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceramics International*, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 3940–3961, 2017.

KUMAR, Avishek et al. In-Situ Surface Modification of Terpinen-4-ol Plasma Polymers for Increased Antibacterial Activity. *Materials*, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 586, 2020.

LANDINI, Paolo et al. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 86, p. 813-823, 2010.

LEUNG, Yu Hang et al. Toxicity of ZnO and TiO₂ to Escherichia coli cells. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 35243, 2016.

LI, Gangqiang et al. Review of micro-arc oxidation of titanium alloys: Mechanism, properties and applications. *Journal of Alloys and Compounds*, p. 169773, 2023.

LI, Yada et al. Characterization and cytocompatibility of hierarchical porous TiO₂ coatings incorporated with calcium and strontium by one-step micro-arc oxidation. *Materials Science and Engineering: C*, v. 109, p. 110610, 2020.

LIU, Shuo et al. Construction of a TiO₂/Cu₂O multifunctional coating on Ti-Cu alloy and its influence on the cell compatibility and antibacterial properties. *Surface and Coatings Technology*, v. 421, p. 127438, 2021.

LIU, Xuanyong; CHU, Paul K.; DING, Chuanxian. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v. 47, n. 3-4, p. 49-121, 2004.

LUKJANCENKO, Oksana; WASSENAAR, Trudy M.; USSERY, David W. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial ecology*, v. 60, p. 708-720, 2010.

MARTINELLI, A.H.M. et al. "Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox". *Em: Process Biochemistry* 53 (fev. de 2017), pp. 245–258.

MAURMANN, Natasha et al. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. *Biomedical Physics & Engineering Express*, v. 3, n. 4, p. 045005, 2017.

MCNAMARA, K. et al. Tantalum coating inhibits Ni-migration from titanium out-diffusion in NiTi shape memory biomedical alloy. *Applied Surface Science*, v. 535, p. 147621, 2021.

MEDINA-LEYTE, Diana J. et al. Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review. *Applied Sciences*, v. 10, n. 3, p. 938, 2020.

MENDES, Natália Helena. Desenvolvimento do biofilme bacteriano em superfícies de metais puros. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MONTANARO, Lucio et al. Emerging pathogenetic mechanisms of the implant-related osteomyelitis by *Staphylococcus aureus*. *The International journal of artificial organs*, v. 34, n. 9, p. 781-788, 2011.

MORTAZAVI, Golsa; JIANG, Jiechao; MELETIS, Efstathios I. Investigation of the plasma electrolytic oxidation mechanism of titanium. *Applied Surface Science*, v. 488, p. 370-382, 2019.

MURPHY, William; BLACK, Jonathan; HASTINGS, Garth W. (Ed.). Handbook of biomaterial properties. New York: Springer, 2016.

NARAYANAN, TSN Sankara; KIM, Jisoo; PARK, Hyung Wook. High performance corrosion and wear resistant Ti-6Al-4V alloy by the hybrid treatment method. Applied Surface Science, v. 504, p. 144388, 2020.

NATARO, James P.; KAPER, James B. Diarrheagenic escherichia coli. Clinical microbiology reviews, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATARO, James P. Enteroaggregative Escherichia coli. Emerging infections 6, p. 101-110, 2004.

NICOLAS-SILVENTE, Ana Isabel et al. Influence of the titanium implant surface treatment on the surface roughness and chemical composition. Materials, v. 13, n. 2, p. 314, 2020.

NIKOOMANZARI, Elham et al. Effect of ZrO₂ nanoparticles addition to PEO coatings on Ti-6Al-4V substrate: Microstructural analysis, corrosion behavior and antibacterial effect of coatings in Hank's physiological solution. Ceramics International, v. 46, n. 9, p. 13114-13124, 2020.

OLIVEIRA, W. F. et al. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. Journal of hospital infection, v. 98, n. 2, p. 111-117, 2018.

OMIDI, Meisam et al. Characterization of biomaterials. In: Biomaterials for oral and dental tissue engineering. Woodhead Publishing, 2017. p. 97-115.

ONDUSKO, Devlynne S.; NOLT, Dawn. Staphylococcus aureus. Pediatrics in review, v. 39, n. 6, p. 287-298, 2018.

PESODE, Pralhad; BARVE, Shivprakash. Surface modification of titanium and titanium alloy by plasma electrolytic oxidation process for biomedical applications: A review. Materials Today: Proceedings, v. 46, p. 594-602, 2021.

PIETROCOLA, Giampiero et al. Colonization and infection of indwelling medical devices by *Staphylococcus aureus* with an emphasis on orthopedic implants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 11, p. 5958, 2022.

QI, Kezhen et al. Review on the improvement of the photocatalytic and antibacterial activities of ZnO. *Journal of Alloys and Compounds*, [s. l.], v. 727, p. 792–820, 2017.

REHM, Bernd HA (Ed.). *Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory*. John Wiley & Sons, 2008.

RIMONDINI, Lia et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *Journal of periodontology*, v. 68, n. 6, p. 556-562, 1997.

RIZWAN, Muhammad et al. Cell–substrate interactions. *Principles of regenerative medicine*, p. 437-468, 2019.

RONOH, Kipkurui et al. Advances in sustainable grinding of different types of the titanium biomaterials for medical applications: A review. *Biomedical Engineering Advances*, p. 100047, 2022.

ROSENTRITT, Martin; SCHNEIDER-FEYRER, Sibylle; KURZENDORFER, Laura. Comparison of surface roughness parameters Ra/Sa and Rz/Sz with different measuring devices. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 150, p. 106349, 2024.

S, Mahalakshmi; N, Hema; P.P, Vijaya. In Vitro Biocompatibility and Antimicrobial activities of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) Prepared by Chemical and Green Synthetic Route— A Comparative Study. *BioNanoScience*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 112–121, 2020.

SÁ, Rosa Corrêa Leoncio de. *Modificação Superficial por Plasma Eletrolítico em Titânio para Biofuncionalizar Dispositivos de Assistência Ventricular*; São Paulo: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus São Paulo, 2017. nº 153 p. Dissertação (Mestrado).

SALVI, Giovanni E. et al. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clinical oral implants research*, v. 19, n. 3, p. 242-248, 2008.

SANTOS, André Luis dos et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, p. 413-423, 2007.

SANTOS, Pedro Bell. Anodização assistida por plasma (PEO) em liga de Ti6Al4V obtida por manufatura convencional e manufatura aditiva (DMLS), para aplicação biomédica. 2022.

SASIKUMAR, Y.; INDIRA, K.; RAJENDRAN, N. Surface modification methods for titanium and its alloys and their corrosion behavior in biological environment: a review. *Journal of Bio-and Tribo-Corrosion*, v. 5, p. 1-25, 2019.

SHOKOUHFAR, M.; DEHGHANIAN, C.; BARADARAN, A. Preparation of ceramic coating on Ti substrate by Plasma electrolytic oxidation in different electrolytes and evaluation of its corrosion resistance. *Applied Surface Science*, v. 257, n. 7, p. 2617-2624, 2011.

SHOKOUHFAR, M. et al. Preparation of ceramic coating on Ti substrate by plasma electrolytic oxidation in different electrolytes and evaluation of its corrosion resistance: Part II. *Applied Surface Science*, v. 258, n. 7, p. 2416-2423, 2012.

SIKDAR, Soumya et al. Plasma electrolytic oxidation (PEO) process—processing, properties, and applications. *Nanomaterials*, v. 11, n. 6, p. 1375, 2021.

SIMCHEN, Frank et al. Introduction to plasma electrolytic oxidation—An overview of the process and applications. *Coatings*, v. 10, n. 7, p. 628, 2020.

SOLEYMANI NAEINI, M.; GHORBANI, M.; CHAMBARI, E. Synthesis of composite coating containing TiO₂ and HA nanoparticles on titanium substrate by AC plasma electrolytic oxidation. *Metallurgical and Materials Transactions A*, v. 50, n. 7, p. 3310-3319, 2019.

SOTNICZUK, Agata et al. Tailoring mechanical and surface properties of UFG CP-Ti by the low-temperature annealing. *Applied Surface Science*, v. 607, p. 155038, 2023.

SUN, Luzhao et al. Chemical vapour deposition. *Nature Reviews Methods Primers*, v. 1, n. 1, p. 5, 2021.

SUNIL, B. Ratna; KIRAN, A. Sandeep Kranthi; RAMAKRISHNA, Seeram. Surface functionalized titanium with enhanced bioactivity and antimicrobial properties through surface engineering strategies for bone implant applications. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, p. 100398, 2022.

SWAIN, Subhasmita; RAUTRAY, Tapash Ranjan. Effect of surface roughness on titanium medical implants. *Nanostructured Materials and Their Applications*, p. 55-80, 2021.

TARKHANOVA, I. G. et al. Ce-, Zr-containing oxide layers formed by plasma electrolytic oxidation on titanium as catalysts for oxidative desulfurization. *Surface and Coatings Technology*, v. 362, p. 132-140, 2019.

THOMAS, Tom R. *Rough surfaces*. World Scientific, 1998.

THUKKARAM, Monica et al. Antibacterial activity of a porous silver doped TiO₂ coating on titanium substrates synthesized by plasma electrolytic oxidation. *Applied Surface Science*, v. 500, p. 144235, 2020.

TOMA, Henrique Eisi; DA SILVA, Delmárcio Gomes; CONDOMITTI, Ulisses. *Nanotecnologia experimental*. Editora Blucher, 2016.

TSAI, Dah-Shyang; CHOU, Chen-Chia. Influences of growth species and inclusions on the current–voltage behavior of plasma electrolytic oxidation: A review. *Coatings*, v. 11, n. 3, p. 270, 2021.

TU, Qiufen et al. Improved endothelialization of titanium vascular implants by extracellular matrix secreted from endothelial cells. *Tissue Engineering Part A*, v. 16, n. 12, p. 3635-3645, 2010.

ULLAH, Ihsan et al. Mechanical, biological, and antibacterial characteristics of plasma-sprayed (Sr, Zn) substituted hydroxyapatite coating. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 6, n. 3, p. 1355-1366, 2020.

WAGNER, William R. et al. (Ed.). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic Press, 2020.

WANG, Yi et al. Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys. *Materials & design*, v. 85, p. 640-652, 2015.

WENZEL, Robert N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & engineering chemistry*, v. 28, n. 8, p. 988-994, 1936.

XAVIER, Thaís de Souza da Silva Hauradou. *Estudo da Biorremediação de Metais com Biofilmes Bacteriano Marinho utilizando a Microfluorescência de raios X*. Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Nuclear, 2022. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2022.

XUE, Huize. *An electrical matlab model of plasma electrolytic oxidation*. 2019.

YANG, Zhong et al. An interesting anodic oxidation behavior of plasma electrolytic oxidation coatings fabricated on aluminum in alkaline phosphate electrolyte. *Surfaces and Interfaces*, v. 16, p. 199-205, 2019.

YE, Jing et al. ROS induced bactericidal activity of amorphous Zn-doped titanium oxide coatings and enhanced osseointegration in bacteria-infected rat tibias. *Acta Biomaterialia*, v. 107, p. 313-324, 2020.

YEROKHIN, A. L. et al. Plasma electrolysis for surface engineering. *Surface and coatings technology*, v. 122, n. 2-3, p. 73-93, 1999.

ZHANG, Lai-Chang; CHEN, Liang-Yu; WANG, Liqiang. Surface modification of titanium and titanium alloys: technologies, developments, and future interests. *Advanced Engineering Materials*, v. 22, n. 5, p. 1901258, 2020.

ZHANG, Lei et al. Biological and antibacterial properties of TiO₂ coatings containing Ca/P/Ag by one-step and two-step methods. *Biomedical Microdevices*, v. 22, p. 1-8, 2020.

ZHANG, Xingdong; WILLIAMS, David (Ed.). *Definitions of biomaterials for the twenty-first century*. Elsevier, 2019.

ZHANG, Xinxin et al. Microstructural evolution and biological performance of Cu-incorporated TiO₂ coating fabricated through one-step micro-arc oxidation. *Applied Surface Science*, v. 508, p. 144766, 2020.

ZHANG, Yanni et al. Ca substitution of Sr in Sr-doped TiO₂ nanotube film on Ti surface for enhanced osteogenic activity. *Applied Surface Science*, v. 528, p. 147055, 2020.

ZHENG, Li; SHI, Q. I. A. N.; LIU, Xuan-yong. Induced antibacterial capability of TiO₂ coatings in visible light via nitrogen ion implantation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, v. 30, n. 1, p. 171-180, 2020.

ZHU, Linxin et al. The effect of surface roughness on PEO-treated Ti-6Al-4V alloy and corrosion resistance. *Surface and Coatings Technology*, v. 325, p. 22-29, 2017.

ANEXO

Quadro de composição das amostras, analisadas por FRX pelo Lacor-UFRGS.

| Units | SAMPLE | Zr | Zr Error | Pb | Pb Error | Cu | Cu Error | Fe | Fe Error | V | V Error | Si | Si Error | Zn | Zn Error | Ti | Ti Error | P | P Error | Mg | Mg Error |
|-------|------------------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|---------|-------|----------|-------|----------|--------|----------|-------|---------|-------|----------|
| % | Teste Zn0,1_50s | 0,039 | 0,001 | 0,008 | 0,001 | 0,016 | 0,004 | 0,111 | 0,013 | 0,404 | 0,046 | 0,226 | 0,069 | 0,681 | 0,011 | 98,497 | 0,395 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Zn0,1_50s | 0,039 | 0,001 | 0,008 | 0,002 | < LOD | 0,013 | 0,141 | 0,021 | 0,342 | 0,055 | 0,4 | 0,078 | 0,566 | 0,015 | 98,491 | 0,334 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Zn0,1_50s1 | 0,038 | 0,001 | 0,009 | 0,001 | 0,011 | 0,005 | 0,134 | 0,017 | 0,383 | 0,055 | 0,293 | 0,072 | 0,645 | 0,013 | 98,481 | 0,318 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Zn0,1_50s2 | 0,039 | 0,001 | 0,007 | 0,002 | < LOD | 0,013 | 0,144 | 0,021 | 0,318 | 0,053 | 0,374 | 0,078 | 0,633 | 0,015 | 98,474 | 0,331 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Teste Zn0,1_120s | 0,043 | 0,001 | 0,115 | 0,004 | 0,055 | 0,008 | 0,137 | 0,02 | 0,519 | 0,054 | 0,323 | 0,076 | 2,313 | 0,03 | 96,477 | 0,32 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Zn0,1_120s | 0,045 | 0,002 | 0,153 | 0,006 | 0,063 | 0,01 | 0,152 | 0,025 | 0,535 | 0,055 | 0,465 | 0,088 | 2,401 | 0,035 | 96,15 | 0,357 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Zn0,1_120s1 | 0,044 | 0,001 | 0,11 | 0,003 | 0,055 | 0,006 | 0,175 | 0,015 | 0,621 | 0,054 | 0,281 | 0,075 | 3,041 | 0,027 | 95,65 | 0,309 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Zn0,1_120s2 | 0,046 | 0,001 | 0,12 | 0,005 | 0,086 | 0,009 | 0,158 | 0,021 | 0,694 | 0,054 | 0,284 | 0,074 | 3,701 | 0,039 | 94,924 | 0,316 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Teste Zn0,1_180s | 0,043 | 0,001 | 0,114 | 0,004 | 0,05 | 0,008 | 0,129 | 0,019 | 0,706 | 0,055 | 0,25 | 0,077 | 4,499 | 0,043 | 94,173 | 0,314 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Zn0,1_180s | 0,043 | 0,001 | 0,117 | 0,004 | 0,052 | 0,006 | 0,155 | 0,016 | 0,676 | 0,054 | 0,329 | 0,079 | 3,929 | 0,035 | 94,655 | 0,31 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |
| % | Zn0,1_180s1 | 0,044 | 0,001 | 0,116 | 0,005 | 0,084 | 0,009 | 0,159 | 0,021 | 0,727 | 0,054 | 0,279 | 0,079 | 5,51 | 0,051 | 93,047 | 0,315 | < LOD | 0,002 | < LOD | 0,002 |