

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

**FUNCIONALIZAÇÃO POR POLIMERIZAÇÃO POR PLASMA FRIO EM
Ti6Al4V PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Mireli Pandolfo Pereira

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia

Porto Alegre – RS

2021

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

**FUNCIONALIZAÇÃO POR POLIMERIZAÇÃO POR PLASMA FRIO EM
Ti6Al4V PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Mireli Pandolfo Pereira

Química Industrial

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Corrosão –
LAPEC, da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de 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

2021

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do grau de Mestre em Engenharia, área de concentração Ciência e Tecnologia dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

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

Coorientador: Dr. Leonardo Marasca Antonini

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Denis Jardim Villarinho, Universidade FEEVALE.

Prof. Dr. Matias de Angelis Korb, CH-CTMECAT, IFSul.

Dr.^a. Natasha Maurmann, Faculdade de Farmácia, UFRGS

Prof. Dr. Afonso Reguly

Coordenador do PPGE3M/UFRGS

*“A ciência não é somente um discípulo da razão.
Também é romance e paixão.”*
Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar concluindo mais essa etapa da minha vida e pelas oportunidades que me concedeu.

Aos meus pais Luiz Fernando dos Santos Pereira e Silvana Floriano Pandolfo que acreditaram e me incentivaram em toda a minha formação pessoal e acadêmica. Aos meus irmãos Marília Pandolfo Pereira e Luiz Gustavo Pandolfo Pereira por contribuir com seus exemplos de perseverança e superação de desafios e todo amor.

Ao meu marido Joel Sarmiento pela compreensão, incentivo e amor, mesmo nos momentos de ausência com nossa filha Cecília, que nasceu junto com este mestrado.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a. Célia de Fraga Malfatti pela confiança, pela oportunidade de trabalho e orientação em cada etapa do desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Leonardo Marasca Antonini pelo apoio e disponibilidade de conduzir os experimentos, e os ensinamentos durante a discussão dos resultados. Além disso, agradeço a Estela Knopp Kerstner por toda ajuda na realização dos testes com células sobre os biomateriais, e a Alessandra Belmonte Silva pela ajuda no tratamento eletroquímico das amostras. Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Pereira pela ajuda na análise de elipsometria e por sua contribuição na discussão dos resultados de espessura.

Agradeço aos meus chefes da TDK Electronics do Brasil Ltda. Rogério Pitombo, Igor Becker e Tatiana Rheinheimer, em permitir adaptar meu horário de trabalho às aulas na UFRGS.

Ao Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC), ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar o mestrado.

O meu reconhecimento a todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivo.....	4
3. Revisão bibliográfica	5
3.1 Biomaterial	5
3.2 Composição da Liga de Ti6Al4V	9
3.3 Superfície do Implante	10
3.3.1 Molhabilidade – Teoria do Ângulo de Contato	12
3.3.2 Obtenção de Superfícies Nanoestruturadas	13
3.3.2.1 Ataque ácido (decapagem)	14
3.3.2.2 Anodização	14
3.3.2.3 Eletropolimento	16
3.4 Polimerização por plasma	18
3.4.1 Mecanismos de formação do polímero	24
3.4.2 Processo de Ablação	27
3.5 Crescimento Celular sobre superfícies metálicas	27
4. Procedimento experimental	30
4.1 Materiais empregados.....	31
4.1.1 Preparação da superfície	31
4.1.2 Limpeza.....	31
4.1.3 Eletropolimento	31
4.1.4 Polimerização por plasma frio	33
4.2 Caracterização	34
4.2.1 Elipsometria Espectral.....	34
4.2.2 Microscopia Óptica.....	35

4.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV/EDS)	35
4.2.4	Microscopia de Força Atômica (AFM)	35
4.2.5	Rugosidade Micrométrica.....	36
4.2.6	Espectroscopia de raio-X (XPS).....	36
4.2.7	Curvas de Polarização e monitoramento de potencial de circuito aberto (OCP)	37
4.2.8	Molhabilidade	37
4.2.9	Ensaio biológico	38
5.	Resultados e discussão	40
6.	Conclusão	62
7.	Trabalhos Publicados.....	64
8.	Trabalhos futuros	65
9.	Referências Bibliográficas.....	66

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema da reação normal do organismo da implantação de um biomaterial. Adaptado de Castner et al. (2002).	8
Figura 2. Esquema da interação entre a célula e a superfície do implante fortemente hidrofóbica, de hidrofobicidade ótima e fortemente hidrofílica. Adaptado: Harvey et al. (2013).	13
Figura 3. Esquema do processo de polimento eletroquímico. Adaptado de Han et al. (2019).	16
Figura 4. Esquema da teoria da viscosidade do filme do eletrólito. Adaptado de Han et al. (2019).	17
Figura 5. Diferença estrutural entre polímeros depositados através métodos convencionais e por plasma. Adaptado Anand et al. (2019).	19
Figura 6. Estrutura molecular de TEOS.....	22
Figura 7. Esquema do mecanismo da polimerização por descarga de brilho proposto por Yasuda (1985).	25
Figura 8. Processo de deposição de filme polimerizado por plasma sobre superfície sólida. Adaptado de Anand et al. (2019) e Yasuda (1985).	26
Figura 9. Fluxograma na metodologia utilizada na pesquisa.....	30
Figura 10. Suporte com a amostra a ser nanotexturizada.....	32
Figura 11. Sistema de tratamento eletroquímico utilizado nesse estudo.....	32
Figura 12. Sistema experimental de polimerização por plasma frio do LAPEC.....	33
Figura 13. Diferenças no ângulo formado na superfície hidrofóbica (esquerda) e hidrofílica (direita).	38
Figura 14. Transiente de densidade de corrente da amostra nanotexturizada.....	40
Figura 15. Amostras de Ti6Al4V (a) antes e (b) após o eletropolimento.	41
Figura 16. Imagens por microscopia óptica dos sistemas: (a) L#5000; (b) L#5000-EP; (c) L#5000-PP; e (d) L#5000-EP-PP.	42
Figura 17. Imagens obtidas por AFM. Em (a) L#5000; em (b) L#5000-EP; em (c) L#5000-PP; em (d) L#5000-EP-PP.	44
Figura 18. Imagens por AFM 3D. Em (a) L#5000; em (b) L#5000-EP; em (c) L#5000-PP; em (d) L#5000-EP-PP.....	45

Figura 19. Imagens de MEV-EDS. Em (a) amostra lixada L#5000; em (b) a amostra nanotexturizada L#5000-EP	48
Figura 20. Imagens de MEV-EDS. Em (a) amostra lixada com a aplicação do filme polimerizado por plasma L#5000-PP; em (b) a amostra nanotexturizada com a aplicação do filme polimerizado por plasma L#5000-EP-PP.	49
Figura 21. Análise de Long Scan de XPS, utilizando espectro fotoeletrônico em Al K α	50
Figura 22. Espectro de XPS de alta resolução no pico de Si2p das amostras polimerizadas com TEOS. Em (a) amostra com o filme depositado a plasma sobre a amostra lixada e em (b) sobre a amostra nanoestruturada.	51
Figura 23. Mecanismo sugerido para a formação de siloxano, pela identificação da ligação Si-O na análise de XPS.....	52
Figura 24. Mecanismo sugerido para formação de organo-oxisilano, pela identificação da ligação Si-C por XPS.	53
Figura 25. Medidas de ângulo de contato em H ₂ O e Solução Hanks avaliada por <i>one-way</i> ANOVA com $p < 0,05$	55
Figura 26. Potencial de circuito aberto (OCP) das amostras em estudo.	56
Figura 27. Curvas de polarização linear das amostras em estudo. A polarização linear ocorreu na faixa de -1000 mV até +400 mV em relação ao OCP, na velocidade de varredura de 1mV/s em solução de Hanks.....	57
Figura 28. Imagens de MEV antes ensaio de polarização linear.....	58
Figura 29. Imagens de MEV após ensaio de polarização linear.....	59
Figura 30. Viabilidade celular de células-tronco mesenquimais depositadas superfícies polimerização por plasma frio. Os dados expressos como média da absorbância \pm erro padrão da média por meio do teste MTT. Resultados * $p = 0,039$ e ** $p = 0,0044$, foram considerados estatisticamente significativos.	60
Figura 31. Microscopia de fluorescência com imagens representativas dos núcleos das células marcados em azul (marcado com DAPI), as células viáveis em verde (marcado com FDA) e não viáveis em vermelho (marcados com IP) nos diferentes grupos experimentais após 24 de cultura.	61

Índice de Tabela

Tabela 1. Classificação dos biomateriais.....	5
Tabela 2. Descrição das amostras avaliadas.	30
Tabela 3. Solução sintética de Hanks [Lopes, 2016].....	37
Tabela 4. Medidas de rugosidades média Ra (nm) por AFM.	43
Tabela 5. Medidas das espessuras das camadas pela técnica de Elipsometria Espectral (na tabela, R ² se refere ao ajuste do modelo físico para o filme aos pontos experimentais).	46
Tabela 6. Medidas de rugosidade média (Ra) micrométrica através do rugosímetro.	47

Lista de abreviaturas

AFM	<i>Atomic Force Microscope</i>
AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
ASTM	<i>American society for testing and materials</i>
BCC	Estrutura cristalina cúbica de corpo centrado
CAP	<i>Competitive Ablation and Polymerization</i>
CMF	Solução tampão de fosfato salino livre de cálcio e magnésio
Cp	Comercialmente puro
CTM	Células-Tronco Mesenquimais
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
ECS	Eletrodo Calomelano Saturado
FBGCs	<i>Foreign-Body Giant Cells</i>
FDA	Diacetato de fluoresceína
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GAG	<i>Glucosaminoglycans</i>
HCP	Estrutura cristalina hexagonal compacta
hESC-MPs	células-tronco embrionárias humanas
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry</i>
IP	Iodeto de propídio
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LAPEC	Laboratório de Pesquisa em Corrosão
MEV/EDS	Microscópio Eletrônico de Varredura com Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X.
MC3T3s	Células osteoblásticas estabelecidas a partir da calota craniana de camundongos e selecionadas com base na elevada atividade da fosfatase alcalina no estado de repouso.
MG-63	células de osteossarcoma
MTMOS	Metiltrimetoxissilano
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
OCP	<i>Open Circuit Potential</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ou tampão fosfato-salino
RF	Radiofrequência
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	<i>Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth</i>
TCP	<i>Tissue Culture Plate</i>
TEOS	Tetraetoxissilano ou Tetraetil ortosilicato
UV-vis	Ultravioleta-visível

XPS	X-Ray Fluorescence
BTSE	Silano bis-trietoxisilietano
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
H ₂	Gás hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HF	Ácido fluorídrico
HMDSO	Hexametildisiloxano
HNO ₃	Ácido nítrico
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de sódio
NaHCO ₃	Carbonato de sódio
O ₂	Gás oxigênio
Si(O ₄) ⁴⁻	Ortosilicato
SiCl ₄	Cloreto de silício
SiH ₂ Cl ₂	Diclorosilano
SiH ₄	Silano
SiO ₂	Dióxido de silício
Ti6Al4V	Liga titânio, alumínio e vanádio
TiO ₂	Dióxido de titânio
TMOS	Tetrametoxisilano
V ₂ O ₃	Trióxido de Divanádio
V ₂ O ₅	Pentóxido de Divanádio
VO ₂	Dióxido de vanádio
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Hidrogenofosfato dissódico dihidratado
[Si(OC ₂ H ₅) ₄]H ⁺	Complexo de TEOS
[TiF ₆] ²⁻	Hexafluoreto de titânio

Lista de Símbolos

#	Grana
%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda
\pm	Mais ou menos
\approx	Aproximado
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius
μatm	Micro atmosferas
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
A	Ampere
Al	Alumínio
Ar	Argônio
Au	Ouro
B	Boro
C	Carbono
Ca	Cálcio
cfm	Cubic foot per minute
Cl	Cloro
cm^2	Centímetro quadrado
Cr	Cromo
Cu	Cobre
eV	Elétron-volt
F	Flúor
Fe	Ferro
Ga	Galio
h	Constante de Planck
ν	Frequência da radiação incidente
I	Corrente
J	Joule
K	Potássio
Kg	Quilograma
$K\alpha$	Constante α
L	Litro
mg/mL	Miligrama por mililitro
Mg	Magnésio
min	Minuto
mm	Milimetro
mm^2	Milímetro quadrado

Mo	Molibdênio
N	Nitrogênio
Na	Sódio
Ra (nm)	Média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento, dos pontos do perfil de rugosidade em relação a linha média.
Ra (μm)	Média aritmética de valores absolutos em todo o comprimento de amostragem.
Nb	Nióbio
Ni	Níquel
N	Newton
°	Grau
O ₂	Gás oxigênio
m	Metro
P	Fósforo
p	Parâmetro estatístico
R ²	Coefficiente de determinação
S	Enxofre
Si	Silício
Sn	Estanho
Ta	Tântalo
Ti	Titânio
Torr	Torricelli, unidade de pressão mm de mercurio
V	Vanádio
V	Volt
W	Tungstênio
Zr	Zircônio
mA.cm ⁻²	Miliampere por centímetro quadrado

Resumo

O sucesso do implante no sistema biológico depende das características de superfície, as quais permitem reações interfaciais entre as substâncias orgânicas e o substrato inorgânico, ou seja, depende da interface criada entre o material e o tecido adjacente. Tais propriedades são influenciadas pela funcionalização superficial do implante. Dessa forma, processos de funcionalização de superfícies de titânio e suas ligas têm sido desenvolvidos, visando obter características superficiais que facilitem assimilação do implante pelo organismo vivo. Estudos têm demonstrado que as células-tronco respondem de forma positiva às superfícies nanotexturizadas da liga Ti6Al4V, que é uma liga amplamente utilizada na fabricação de implantes biomédicos. Nesse contexto, no presente trabalho foi estudado o efeito da funcionalização por polimerização por plasma frio em superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V sobre as propriedades morfológicas, físico-químicas e de sua resposta biológica via viabilidade celular. Os tratamentos superficiais foram realizados através de tratamento eletroquímico por 4 minutos, a 25V e 7°C e posterior aplicação de filme polimérico através da técnica de polimerização por plasma, utilizando o Tetraetoxissilano (TEOS) como precursor. A caracterização morfológica das superfícies foi realizada por meio de microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS), microscopia óptica, perfilometria e elipsometria espectral. Além disso, as superfícies foram caracterizadas quanto à composição química (fluorescência por raios-x) e molhabilidade. As superfícies funcionalizadas também foram avaliadas quanto a citotoxicidade. Células-tronco mesenquimais conhecidas como SHED foram semeadas às superfícies, e a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de atividade mitocondrial MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) e por coloração com núcleo com DAPI com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) em ensaio do tipo live/dead. Os resultados mostraram que as amostras lixadas e polimerizadas por plasma frio apresentaram maior número de células-tronco viáveis do que a superfície nanoestruturadas e polimerizadas por plasma a frio. As irregularidades provenientes do lixamento mecânico associadas com o filme fino obtido por polimerização por plasma frio podem ter favorecido o ancoramento das células-tronco contribuindo para a melhor viabilidade celular.

Abstract

The success of the implant in the biological system depends on the surface characteristics, which allow interfacial reactions between organic substances and the inorganic substrate, that is, it depends on the interface created between the material and the adjacent tissue. Such properties are influenced by the superficial functionalization of the implant. In this way, functionalization processes of titanium surfaces and their alloys have been developed, aiming at obtaining superficial characteristics that facilitate assimilation of the implant by the living organism. Studies have shown that stem cells respond positively to the nanotextured surfaces of the Ti6Al4V alloy, which is an alloy widely used in the manufacture of biomedical implants. In this context, the present work intends to study the effect of functionalization by cold plasma polymerization on Ti6Al4V nanostructured surfaces on the morphological, physical-chemical properties and their biological response via cell viability. The surface treatments were carried out through electrochemical treatment for 4 minutes, at 25V and 7° C and subsequent application of polymeric film through the technique of plasma polymerization, using TEOS as a precursor. The morphological characterization of the surfaces was carried out by means of atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM-EDS), optical microscopy, profilometry and spectral ellipsometry. In addition, the surfaces were characterized in terms of chemical composition (x-ray fluorescence) and wettability. Functionalized surfaces were also evaluated for cytotoxicity. Mesenchymal stem cells known as SHED have been associated with surfaces, and cell viability has been assessed using the MTT mitochondrial activity assay ([3- (4,5-dimethylthiazol-2yl) - 2,5-diphenyl tetrazolium bromide]) and by core staining with DAPI with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) in a LIVE / DEAD type assay. The results showed that the samples sanded and polymerized by cold plasma had a higher number of viable stem cells than the nanostructured surface and polymerized by cold plasma. Irregularities resulting from mechanical sanding associated with the thin film obtained by cold plasma polymerization may have favored the anchoring of stem cells, contributing to better cell viability.

1. Introdução

Biomateriais são comumente caracterizados como materiais utilizados para construir órgãos artificiais, dispositivos de reabilitação ou implantes para substituir ou regenerar tecidos e órgãos na função natural do corpo. [Bauer, 2013]. Como exemplo, podem ser citados dispositivos biomédicos, materiais implantáveis, dispositivos para a liberação de medicamentos, órgãos artificiais, dentre muitos outros [Pires, 2015]. São dispositivos utilizados próximos ou em contato direto com o sistema biológico, e por isso há a necessidade de serem biocompatíveis, ou seja, uma vez implantados no corpo, produzem uma resposta saudável sem efeitos adversos às células (não carcinogênico ou atóxico) [Garbacz, 2019; Elias 2010].

A microtopografia e a química da superfície determinam a adsorção celular e como as células irão alinhar na superfície do implante, uma vez que, os fluídos corpóreos contem íons além de lipídeos, carboidratos e proteínas que podem ser adsorvidos na superfície do biomaterial [Elias, 2010].

De modo geral, a diferença entre os implantes comercialmente disponíveis no mercado envolve características como rugosidade, composição química, energia de superfície, potencial químico, presença de hidratos e nitratos, camada com tensão residual, impurezas resultantes da sua produção ou manuseio, tipo de óxido de titânio formado, estrutura cristalina do óxido e espessura da camada de óxido [Elias, 2010]. No entanto, o efeito da topografia da superfície do implante, a composição química [Puckett, 2010], [Annunziata, 2015], [Mishnaevsky, 2014], e a rugosidade de superfície [Bagno, 2004] no processo de formação óssea são os fatores mais estudados.

Por mais de 50 anos, materiais metálicos têm sido utilizados em aplicações biomédicas (ortopédicas e odontológicas) [Kulkarni, 2014]. Especialmente, implantes metálicos de ligas de titânio combinam robustez, aceitável biocompatibilidade e alta resistência à corrosão [Williams, 2001]. O baixo módulo elástico, relacionada à rigidez, do titânio pode resultar em uma menor resistência ao estresse comparado com outros materiais para implantes, induzindo a regeneração óssea mais rápida e saudável [Kulkarni, 2014].

Uma das propriedades do titânio e suas ligas é a habilidade de influenciar reações redox na interface do tecido, de forma que pode modular o comportamento celular [Williams, 2001]. Contudo, o filme de óxido de titânio formado naturalmente não é efetivamente protetor em alguns ambientes agressivos, devido à baixa espessura do óxido e sua estrutura porosa [Chen, 2013].

Embora exista outras ligas de titânio sendo incluídas nas normatizações ASTM International (American Society for Testing and Materials), atualmente, a liga Ti6Al4V é amplamente utilizada na fabricação de biomateriais com aplicação em implantes ortopédicos e odontológicos. A liga Ti6Al4V exibe resistência à corrosão, possuindo uma melhor biocompatibilidade entre os biomateriais metálicos [Zhang, 2018; Bandyopadhyay, 2010].

Dorr et al. (1990) identificaram na membrana fibrosa que encapsula do implante de Ti6Al4V, concentrações relevantes dos elementos que compõe a liga em até 21 ppm de Ti, 10,5 ppm de Al e 1 ppm de V. Além disso, o implante de Ti6Al4V não é eletroquimicamente estável, podendo passar por um processo de lixiviação *in situ*, conduzindo a um aumento da concentração de alumínio e vanádio nos tecidos, o que é associado à doença de Alzheimer [Lopes, 2010].

Superfícies nanoestruturadas de liga de Ti6Al4V obtidas por eletropolimento contribuem para a presença de células com extensões citoplasmáticas menos fragmentadas [Antonini, 2017].

Tratamentos superficiais a plasma têm sido amplamente utilizados na funcionalização de diferentes substratos, para promover o aprimoramento de propriedades tribológicas, térmicas e de proteção à corrosão [Gerchman, 2019]. Como forma de proteção do implante, a utilização da técnica de polimerização por plasma frio tem se mostrado favorável no revestimento de superfícies, visto que foi observada em estudos preliminares a melhora da força de ligação do filme ao substrato, da estabilidade química e da atividade celular, o qual indica um potencial processo para a aplicação de revestimentos de implantes ortopédicos [C. [Wu 2008; Zanini, 2009].

As propriedades de superfície, como morfologia, rugosidade, espessura de camada do óxido, nível de impurezas e tipos de óxidos, dependem do tratamento de

superfície do implante. A dificuldade de analisar a influência individual de um parâmetro está na impossibilidade de alterar um parâmetro sem alterar os outros. Ou seja, não é possível modificar a composição química e a estrutura cristalina do óxido de titânio, mantendo a rugosidade inalterada [Elias, 2010].

Nesse contexto, no presente trabalho estudou-se o efeito da polimerização por plasma frio em superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V sobre as propriedades morfológicas, físico-químicas e de sua resposta biológica via adesão celular.

2. Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da funcionalização por polimerização por plasma frio de Ti6Al4V sobre as características superficiais e resposta biológica.

Objetivos específicos:

Avaliar o efeito da polimerização por plasma a frio sobre as propriedades de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V;

Avaliar a resposta biológica, quanto à viabilidade e adesão celular, sobre as superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V polimerizadas por plasma frio.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Biomaterial

O campo da pesquisa sobre biomateriais abrange diversas áreas do conhecimento como engenharia de materiais, química, física, biologia e medicina. De forma geral, um biomaterial é definido como um material natural ou fabricado pelo homem, que compreende todo ou em parte de uma estrutura viva ou dispositivo biomédico destinado a interagir com o sistema biológico para desempenhar, tratar, ampliar ou substituir qualquer tecido, órgão ou funções do organismo humano [Thate, 2010]. Outras definições de biomateriais incluem “materiais sintéticos ou de origem natural em contato com tecidos, sangue e fluidos biológicos, que anseiam o uso em próteses, diagnósticos, tratamentos terapêuticos, e outras aplicações sem afetar adversamente o organismo vivo e seus componentes”. No entanto, a palavra “biomaterial” é também confundida com “material biológico”, o qual trata-se de material produzido pelo sistema biológico como artéria ou pele [Raghavendra, 2015]. Dessa forma, os biomateriais podem ser classificados, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos biomateriais.

Classificação	Descrição	Aplicação (exemplos)	Referência
Biotolerável	Capacidade dos materiais de permanecerem no corpo por longos períodos de tempo com poucos graus de reação inflamatória	Aço-Inox, níquel-titânio, Cr-Mo (Vitallium); maioria dos polímeros sintéticos	[Hoerstrup, 2004] [Ratner, 2015]
Bioinertes (ou Biopassivo)	Provocam a mínima resposta dos tecidos do hospedeiro.	Silicones, titanium, Teflon, polyethylene, alumina, zircônia, titânio	[Hoerstrup, 2004] [Hench, 2004]
Bioativos	É o material que excreta uma específica resposta biológica na interface do material, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e o material.	Sol-gel sob titânio, hidroxiapatita de cálcio, cerâmicos	[Lausmaa, 2001] [Hench, 2004]
Bioabsorvíveis	São materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou redução da massa molecular, como no caso da dissolução lenta de implantes solúveis em fluidos corpóreos.	Fosfato de cálcio III, ácido polilático	[Hoerstrup, 2004]

No desenvolvimento de implantes e materiais biomédicos, é necessário se preocupar com a funcionalidade, durabilidade e biocompatibilidade [Lvlev, 2015]. O termo biocompatibilidade é utilizado para descrever materiais implantados no corpo que produzem uma normal ou saudável resposta e não efeitos celulares adversos (por ser carcinogênico ou tóxico). Ratner et al. (2015) diferenciou o termo *Biocompatibilidade* como a capacidade dos materiais de desencadear e orientar, localmente a cicatrização de feridas, reconstrução e integração de tecidos. Ou seja, é especificado como a habilidade de um biomaterial, prótese, ou dispositivo médico em desempenhar com apropriada resposta a uma específica aplicação, sem que o material ou o seu produto de lixiviação cause morte celular ou inflamação crônica, que não coagule, e que seja resistente a colonização de bactérias, produzindo aquecimento normal quando implantado junto aos tecidos vivos [Raghavendra, 2015; Bauer 2013]. Portanto, a biocompatibilidade é definida apenas para uma aplicação particular. Por exemplo, o biomaterial usado em uma prótese do quadril ou em stents coronários pode não ser adequado para implantes dentários, mesmo que demonstre compatibilidade biológica [Elias, 2018].

As respostas dos organismos vivos às interações entre o biomaterial e o tecido humano podem ser divididas em quatro tipos diferentes [Bose, 2013]:

- Tóxico: os materiais tóxicos causam a morte do tecido circundante;
- Bioinerte: este tipo de resposta é causado por materiais não tóxicos, mas biologicamente inativos. O encapsulamento por tecido fibroso do material bioinerte é causado in vivo, o que leva ao afrouxamento e falha final do implante, comumente visto em implantes metálicos. Um revestimento de material bioativo no implante metálico pode prevenir o encapsulamento por tecido fibroso;
- Bioativo: este tipo de resposta é visto se o material for atóxico e biologicamente ativo. O termo biologicamente ativo significa que uma se forma ligação interfacial entre o material e o tecido hospedeiro. Vidros bioativos, muitos tipos de polímeros e a maioria das cerâmicas de fosfato de cálcio se enquadram nesta categoria;

- Bioabsorvível: esse tipo de resposta ocorre quando um material atóxico se dissolve in vivo, como sulfato de cálcio (gesso), fosfato de cálcio III, vidros bioativos e PLGA. Como resultado, o tecido hospedeiro circundante pode substituir o material sintético.

Há inúmeros biomateriais que podem ser usados no corpo humano, como metais (aço inox, ligas de cobalto, ligas de titânio), cerâmicos (óxido de alumínio, zircônia, fosfato de cálcio), como também polímeros sintéticos e naturais [Mukta Kulkarni, 2014]. O desempenho e a aplicação a qual se destina o biomaterial nos sistemas biológicos são de importância crucial para o desenvolvimento de implantes biomédicos e engenharia de tecidos [Kulkarni, 2014].

Produtos de corrosão podem induzir efeitos adversos no organismo humano, como toxicidade celular, hipersensibilidade, imunogenicidade e distúrbios de funções nos órgãos excretórios [Tengvall, 1992]. A resposta do corpo pode finalmente rejeitar a prótese, como também em casos mais sérios, encapsular o dispositivo por uma membrana fibrosa [Tengvall, 1992; Bandyopadhyay, 2010]. Esse encapsulamento isola o implante do sistema biológico da vizinhança, o que é motivo de preocupação devido ao relativo e excessivo micromovimento que pode ocorrer na interface osso-implante devido à má ligação interfacial [Bandyopadhyay, 2010].

No entanto, o encapsulamento é normal na maioria dos biomateriais metálicos implantados e as células gigante *Foreign-Body Giant Cells* (FBGCs) podem residir na superfície dos biomateriais por toda a vida útil do implante [Sheikh, 2015]. Após implantado (Figura 1), a superfície do biomaterial em contato com o sangue e proteínas oriundas do sangue adsorvem-se na superfície realizando ligações entre as células e o implante. Neutrófilos e macrófagos tentam o processo de fagocitose no implante. Na falha deste sistema, elas se fundem para formar uma célula gigante (FBGCs), liberando citocinas para recrutar fibroblastos. Os fibroblastos liberam colágeno, entre outras proteínas e formam uma cápsula fibrosa ao redor do implante. O estágio final da reação tem o implante completamente envolto em uma bolsa de colágeno acelular avascular. Existem macrófagos entre a bolsa de colágeno e o implante. Este processo é conhecido como resposta ao corpo-estranho. O encapsulamento descontrolado confunde diretamente o desempenho de muitos dispositivos implantados. A presença desta cápsula degrada seriamente o

desempenho do implante, por evitar o contato direto entre o dispositivo e os tecidos [Castner, 2002].

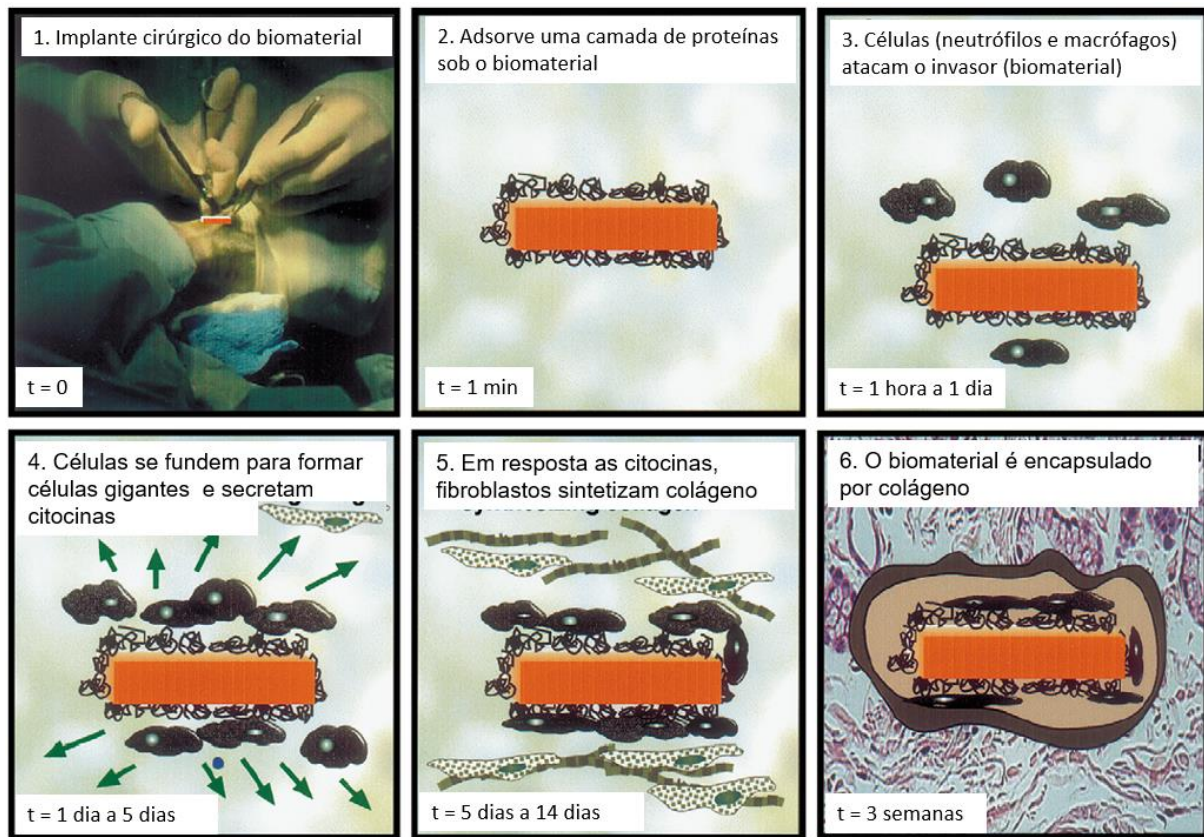


Figura 1. Esquema da reação normal do organismo da implantação de um biomaterial. Adaptado de Castner et al. (2002).

O termo osseointegração foi definido por Brånemark, como a interação funcional e estrutural direta, entre o osso e a superfície do implante, a qual somente pode ocorrer se as células aderirem a superfície do implante, sem que haja um tecido fibroso na interface [Elias, 2010]; [Bandyopadhyay, 2010]. A osseointegração envolve série de eventos biológicos influenciados por múltiplos fatores. Ligas de Ti com superfície porosa têm mostrado permitir rápido crescimento ósseo e melhorado a osseointegração, devido ao aumento da área da interface osso-implante [Elias, 2010].

De acordo com Tengvall et al. (1992), fluidos corpóreos contém água, glicosaminoglicanos (GAG), proteínas, lipídeos, equivalente a 0,9% de NaCl e concentrações em mM de íon inorgânicos como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , OH^- e H_2PO_4^- . O pH normal de 7,4 varia entre 5,5 a 7,8 durante o processo de cicatrização de feridas. No caso, de haver produto de corrosão na superfície metálica, o pH local

diminui, consideravelmente. Os fluidos corpóreos sintéticos comumente utilizados em estudos são solução de Hanks e de Ringer [Lopes, 2010; Asri, 2018].

3.2 Composição da Liga de Ti6Al4V

Titânio e suas ligas podem ser classificados como fase α , a estrutura de hexagonal de corpo centrado, a fase quase- α , a fase $\alpha + \beta$, e a fase β definida como estrutura cúbica de corpo centrado [Oshida, 2013; Ratner, 2004].

Os elementos de liga adicionados ao titânio, são classificados como α -estabilizadores (Al, Sn, Ga, Zr) e β -estabilizadores (V, Mo, Nb, Ta, and Cr). Os elementos α -estabilizadores exibem bom desempenho em altas temperaturas. Dissolvem-se na matriz de titânio, como uma solução sólida de reforço, produzindo uma pequena variação da temperatura de transformação da conformação HCP- α para BCC- β quando aquecida, ou de BCC- β para HCP- α quando resfriada [Xuanyong Liu, 2004], [Chen 2015]. Contudo, os elementos de liga β -estabilizadores (metais de transição) diminuem a temperatura de transformação da fase, tornando a liga mais quebradiça. Além destes elementos de liga, são adicionados Fe, Cu, Ni, Si e B para melhorar a resistência mecânica e estabilidade química. A liga Ti6Al4V é a mistura da fase $\alpha + \beta$, da qual pode conter de 10 a 50% da fase β na temperatura ambiente [Oshida, 2013]. A liga $\alpha + \beta$ pode proporcionar maior resistência à corrosão, dependendo do percentual de cada fase. Embora a fase α torne a liga de titânio mais resistentes a corrosão, esta resistência é limitada a baixas temperaturas. Assim a fase β apresenta alta resistência, baixo módulo elástico, boa resistência a corrosão e excelente biocompatibilidade [Lopes, 2016].

No estudo conduzido por Variola et al. (2008), foi identificado que o tempo de decapagem, utilizando eletrólito composto por H_2SO_4 e H_2O_2 , varia a composição das fases α e β na superfície da nanoestrutura. As amostras decapadas por 15 min, apresentaram a formação de nanoestruturas predominantemente nos grãos da fase β . Com o aumento do tempo de decapagem, as cavidades que correspondem aos grãos da fase β se tornam mais salientes, devido as diferenças nas taxas de dissolução entre as fases α e β da liga.

O titânio comercialmente puro (Ti-cp) possui propriedades mecânicas insuficientes para ser utilizado em implantes. Elementos de liga, como vanádio e alumínio, permitem uma significativa melhoria nestas propriedades. Atualmente a liga de Ti6Al4V é a mais utilizada em implantes cirúrgicos. Apesar da excelente passivação, que é a camada protetora responsável por dar a resistência à corrosão da liga, concentrações elevadas dos íons metálicos foram detectadas na urina, nos tecidos próximos ao implante, bem como em outros locais do corpo humano [Browne, 2000]. O alumínio é um elemento associado às doenças neurológicas como Alzheimer e doenças ósseas metabólicas, enquanto que os íons de Vanádio se mostraram potencialmente citotóxicos [Zaffe, 2004; Mishnaevsky, 2014]. Neste sentido, é também importante desenvolver filmes com características protetivas contra a liberação destes elementos ao ambiente biológico.

3.3 Superfície do Implante

A superfície de um substrato pode ser definida como a zona onde a estrutura e a composição, influenciada pela interface com o meio, difere em média de composição e estrutura da região mais interna chamado de “bulk”. [Ratner, 2004].

Mesmo se um implante apresente elevada resistência à corrosão, isto pode falhar se o implante tiver baixa tendência à osseointegração, o que significa que, não pode ter somente resistência a corrosão, mas também uma boa osseointegração [Lopes,2016]. É reconhecida que a primeira reação vital entre o tecido celular e o implante de qualquer biomaterial é a rejeição. A aceitação ou rejeição do biomaterial pelo organismo depende da interface criada entre o material implantado e ao redor dos tecidos, ou seja, a adaptação biológica destes materiais com os tecidos vivos é essencialmente controlada pela superfície e pelas reações interfaciais entre as substâncias orgânicas e o substrato inorgânico. O *bulk* proporciona somente a estabilidade mecânica para o dispositivo implantado, não interagindo com os tecidos, células e fluidos corpóreos. A superfície do biomaterial desempenha o papel principal no que diz respeito à melhoria da resposta biológica [Bauer, 2013].

A atividade de superfície pode variar a partir de ações mecânicas (fadiga); químicas (descoloração, manchas, contaminação, corrosão, oxidação); química-

mecânica (fadiga por corrosão-tensão), termoquímica (fadiga térmica); tribológica e biotribológica (desgaste, toxicidade por fragmentos por desgastes e atritos), até as ações biofísicas (superfície de contato e adesão, molhabilidade, dessorção, absorção, difusão e ataque celular). Dessa forma, os fenômenos de superfície governam a durabilidade, segurança, confiabilidade, e a integridade estrutural das próteses e dispositivos médicos e odontológicos [Oshida, 2013].

Para avaliar e determinar compatibilidade biológica, mecânica e morfológica dos biomateriais em contato com os tecidos humano, é importante entender os fenômenos interfaciais entre biomaterial e o sistema biológico, no qual o material será implantado. Na interface, os constituintes moleculares do sistema biológico vão ao encontro e interagem com os constituintes moleculares da superfície do material. A espessura desta interface é menor que 1 nm, ou seja, as propriedades de superfície são em escala atômica. Assim, a caracterização interfacial e superficial e suas regras bioquímicas e biomecânicas em ambientes biológicos são um dos mais importantes aspectos da área de implantes.

Para Oshida (2013), as propriedades de superfície (químicas, energia e morfologia de superfície) precisam ser estudadas, uma vez que as interações biológicas atuam na superfície, a qual é única região do implante em contato com o ambiente biológico, onde as características de superfícies governam a resposta biológica e a topografia afetam a estabilidade mecânica da interface implante-tecido.

A superfície pode ser modificada ou alterada de modo favorável para acomodar, facilitar e/ou promover uma maior biofuncionalidade e bioatividade em tratamentos mecânico, químico, térmico, eletroquímico ou a combinação de todos. No caso do titânio e ligas de titânio, toda sua superfície é coberta com óxido de titânio, com diferentes espessuras, dependendo do tratamento prévio.

Alguns mecanismos envolvidos na osseointegração variam dependendo se a superfície do implante é mais ou menos rugosa, uma vez que as células reagem diferentemente para estas duas condições. Células fibroblásticas e epiteliais aderem mais fortemente as superfícies mais lisas, enquanto que a proliferação osteoblástica e a síntese de colágeno aumentam com o aumento da rugosidade. Apesar da importância da rugosidade para osseointegração, não existe um padrão ideal de rugosidade em relação aos implantes dentários [Boyan, 2001].

No estudo proposto por Gittens et al. (2011), a introdução de estruturas em nanoescala combinadas com rugosidade em microescala melhora a diferenciação de osteoblastos, potencializando a osseointegração do implante *in vivo*.

3.3.1 Molhabilidade – Teoria do Ângulo de Contato

Estudos recentes mostram que a molhabilidade de uma superfície polimérica (hidrofobicidade e hidrofiliçidade) possui significativa influência na interação entre o implante e a célula, bem como no comportamento celular [Chen, 2018]. Superfícies com ângulo de contato maior que 90° são consideradas hidrofóbicas ou de caráter fracamente hidrofílico [Kulkarn, 2015].

A molhabilidade de uma superfície pode ser “seriamente” afetada pelos grupos funcionais de superfície, pela rugosidade do material, entre outros [Kasalkova, 2015]. De acordo com Manoj et al. (2020), a dependência da não aderência do fluido (ou seja, comportamento hidrofóbico) está associada ao aprisionamento de ar entre as saliências de uma superfície mais rugosa.

Para influenciar o comportamento celular, é importante notar que a molhabilidade pode controlar a adsorção essencial de proteínas na superfície do polímero e afetar as atividades celulares subsequentes. Para determinar a molhabilidade de uma superfície polimérica, é normalmente utilizada a medição do ângulo de contato com a água, para fornecer as informações sobre as propriedades de umedecimento. Normalmente, a maioria das células animais prefere uma superfície de hidrofiliçidade moderada (ângulo de contato entre 70 a 80°) que conduz maiores taxas de crescimento e proliferação de fibroblastos, enquanto as superfícies poliméricas superhidrofílicas (ângulo de contato abaixo de 5°) e superhidrofóbicas (ângulo de contato acima de 150°) não são favoráveis à fixação e ao crescimento celular [Chen, 2017; Harvey, 2013].

Estudos de Harvey et al. (2013) identificaram que a adsorção de proteínas sobre a superfície do implante é controlada pela hidrofobicidade, carga, propriedades químicas e pelas características de topografia. Considerando a Figura 2, superfície hidrofóbica tem um grau de controle sobre a adsorção de proteínas. Proteínas geralmente adsorvem fortemente em superfícies hidrofóbicas. Superfícies

fortemente hidrofílicas preferem uma condição hidratada, no qual reduz a adsorção de proteínas. A hidrofobicidade ótima permite adsorver proteínas sem desnaturar, orientando o ataque e o espalhamento do fluido [Harvey, 2013].

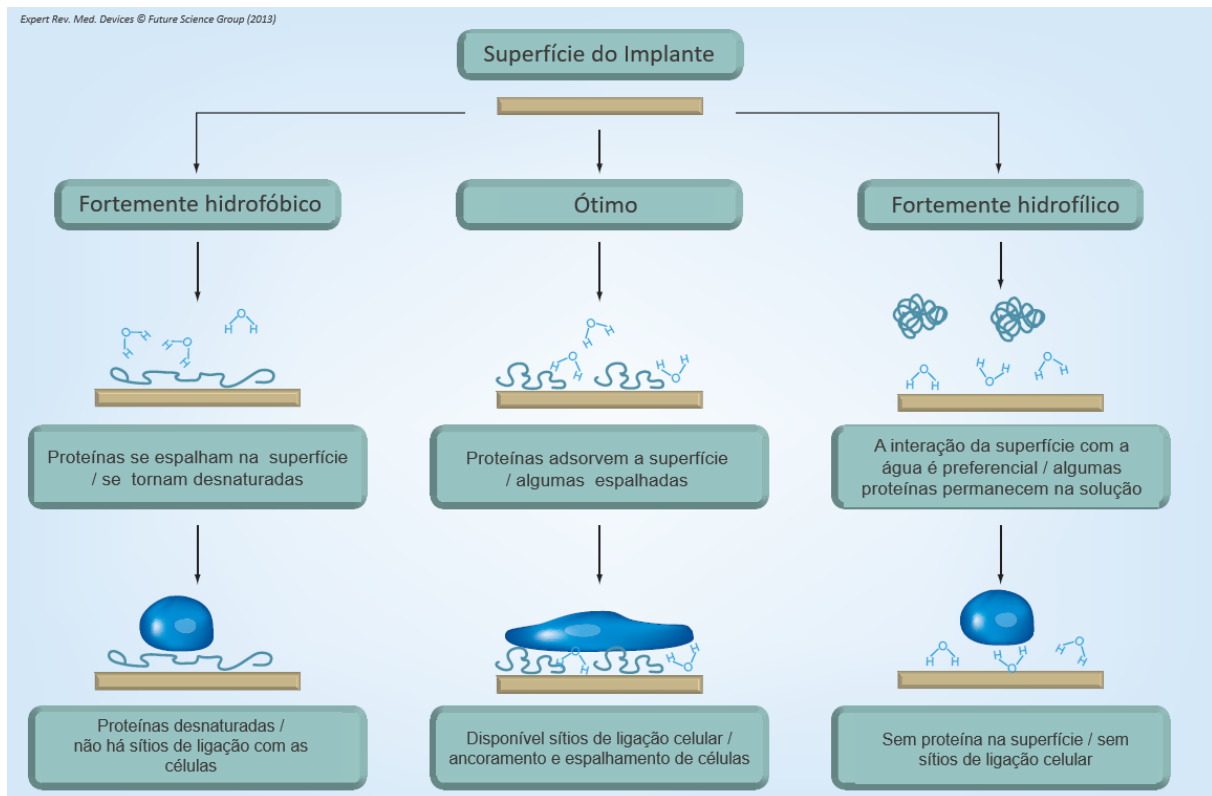


Figura 2. Esquema da interação entre a célula e a superfície do implante fortemente hidrofóbica, de hidrofobicidade ótima e fortemente hidrofílica. Adaptado: Harvey et al. (2013).

3.3.2 Obtenção de Superfícies Nanoestruturadas

A obtenção de superfícies nanoestruturadas por diferentes técnicas é uma das direções promissoras no desenvolvimento dos biomateriais de titânio e suas ligas com propriedades avançadas. Biomateriais com superfícies porosas têm atraído interesse, porque melhoram o ancoramento celular no corpo humano [Bauer, 2013]. Estudos in vitro sobre a adsorção de proteínas e adesão celular estão relacionados com o grau de rugosidade superficial, a qual pode afetar o crescimento, maturação, diferenciação e proliferação celular, bem como o crescimento ósseo [Kubo, 2009]. Estes processos estão descritos abaixo:

3.3.2.1 Ataque ácido (decapagem)

Utilizado para remover o óxido formado, obtendo uma superfície limpa e uniforme. Comumente, utilizados os ácidos HNO_3 (10 – 30%) e HF (1 – 3%). O principal efeito do ácido fluorídrico é atacar rapidamente o TiO_2 e reagir com o titânio para formar $[\text{TiF}_6]^{2-}$ e H_2 solúveis. A adsorção de hidrogênio na superfície do titânio pode causar uma fragilização da camada superficial [Madhav, 2011].

Dependendo das condições prévias da superfície e da extensão do material removido, a topografia será determinada principalmente pelo ataque ácido, sofrendo modificações superficiais em escala micrométrica, refletindo na formação de contorno de grão [Sittig, 1999]. As diferentes direções dos cristais são atacadas em diferentes taxas. Para a liga de titânio, a qual é constituída das fases α e β , a diferenças nas taxas de decapagem se dá pela diferença nestas fases, onde a fase β se sobressai a fase α , e por isso é atacada mais rapidamente [Lausmaa, 2001].

Lamolle et al. (2009) propôs um mecanismo de ação do fluoreto (F^-) no tratamento de implantes com HF . No estudo, a modificação da superfície de titânio, em escala micro e nanométrica, foi influenciada pelo tempo de exposição à solução de HF (0,2%) e a topografia inicial da superfície, o que permitiu condições favoráveis para o crescimento celular com efeito positivo na biocompatibilidade.

3.3.2.2 Anodização

A anodização é um processo eletrolítico ou eletroquímico, que promove a formação de uma controlada e uniforme camada de óxido na superfície do metal. O objetivo de produzir uma camada de óxido estável e biocompatível sobre a superfície do substrato, através da adsorção dos ânions da solução eletrolítica, aos quais levam a formação da camada de óxido na superfície do ânodo. É um método bem estabelecido para produzir diferentes tipos de filmes protetivos de óxido em metais, influenciado por parâmetros operacionais como temperatura, densidade de corrente, velocidade de agitação e composição do eletrólito (H_2SO_4 , H_3PO_4 , ácido acético entre outros), os quais são comumente utilizados na anodização do titânio [Velten, 2001; Lausmaa, 2001].

Wang et al. (2018) produziram nanotubos de TiO₂ a partir de substratos de Ti puro. As amostras lixadas apresentaram ângulos de contato $\approx 76^\circ$. Após este pré-tratamento, nanotubos foram produzidos através do processo de anodização, o que gerou a obtenção baixos valores de ângulos de contato $\approx 47^\circ$. A causa da queda foi a existência de nanotubos de TiO₂ anatase. O estudo indicou que os nanotubos de TiO₂ anatase promoveram a proliferação celular, uma vez que a viabilidade das células do tipo MC3T3s aderidas ao substrato anodizado foi maior que a amostra lixada.

Cheung et al (2020) obtiveram filme de óxido de titânio, a partir da anodização de uma superfície de Ti6Al4V. O estudo propõe avaliar os efeitos da presença e remoção da camada passiva de TiO₂ na anodização de Ti6Al4V, variando a concentração do H₂SO₄ e o tempo de anodização na obtenção de superfícies com potencial aplicação biomédica. Com a remoção da camada passiva de TiO₂ na etapa do polimento mecânico, aumentou a uniformidade morfológica da camada anodizada, tornando a superfície menos rugosa. Concluíram que o polimento prévio é o principal fator que determina a morfologia e topografia do depósito.

Puckett et al. (2010) realizaram um estudo para avaliação da aderência de colônias de bactérias sobre três tipos de superfícies com nanoestruturas, utilizando o processo de anodização como método de tratamento superficial. Para a produção de superfícies nanotexturizadas e nanotubular, as amostras de Ti-cp foram previamente imersas em solução ácida composta por ácido nítrico e ácido fluorídrico para remover a camada de óxido que se forma espontaneamente sobre a superfície do titânio, na presença de ar atmosférico. Para obtenção do Ti nanotexturizado, a anodização ocorreu em 1 min, a tensão constante de 20V, utilizando eletrólito de concentração 0,5% de HF, enquanto que o óxido da amostra que apresentou morfologia nanotubular, variou a concentração para 1,5% de HF e o tempo para 10 min. Eles concluíram que houve um maior número de colônias de bactérias sobre as superfícies anodizadas comparada a amostra nanorugosa, obtida pelo processo de evaporação de feixe de elétrons (*Electron Beam Evaporation*).

3.3.2.3 Eletropolimento

Eletropolimento refere-se ao processo eletroquímico, que remove parte da superfície do substrato metálico a polir, de forma controlada. É conhecido também como polimento eletroquímico, polimento anódico e polimento eletrolítico. Pode ser definido como um tipo específico de eletrólise que envolve a passagem de corrente direta através de um eletrólito numa célula eletrolítica [Yang, 2016]. É utilizado em aplicações biomédicas cardiovasculares e ortopédicas [Han, 2019].

A peça metálica a ser nanotexturizada serve como ânodo, e é conectada a um terminal positivo de uma fonte de corrente contínua com o terminal negativo conectado ao cátodo. A Figura 3 ilustra o processo de polimento eletroquímico. O substrato é imerso em um banho de solução eletrolítica com temperatura controlada. A ativação da fonte produz corrente elétrica que passa do ânodo para o cátodo, resultando na oxidação da superfície metálica e remoção das impurezas e irregularidades, das quais são dissolvidas no eletrólito e difusas através do filme eletrolítico até o cátodo, a uma taxa controlada [Yang, 2016] [W. Han, 2019]. No cátodo, onde ocorre a reação de redução, normalmente se produz hidrogênio [Yang, 2016; Han, 2019].

O complexo processo de eletropolimento é influenciado por muitos fatores, sendo que a quantidade de metal removido depende de um banho específico, da temperatura e da composição do eletrólito, da densidade de corrente, do tempo do eletropolimento, da rugosidade inicial do substrato metálico a ser eletropolido, etc. [Yang, 2016, Han, 2019]. No entanto, geralmente a corrente e o tempo são as duas variáveis controláveis para se obter uma superfície acabada reproduzível [Yang, 2016].

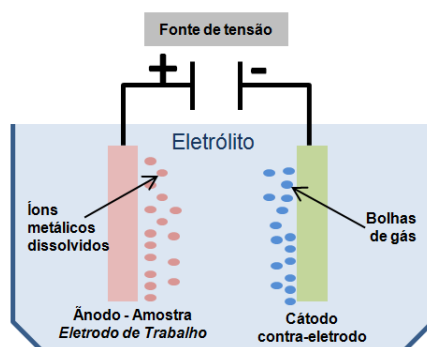


Figura 3. Esquema do processo de polimento eletroquímico. Adaptado de Han et al. (2019).

Os eletrólitos utilizados no eletropolimento são frequentemente soluções ácidas de alta viscosidade, tais como a mistura de ácido sulfúrico e ácido fluorídrico [Yang, 2016; Han, 2019]. Durante o eletropolimento, uma camada viscosa do eletrólito é formada na superfície do substrato. A espessura não uniforme da camada viscosa sob a superfície do material resulta em diferentes quedas ôhmicas a partir do cátodo para o ânodo, no qual causa uma maior dissolução das partes protuberantes comparada às partes mais profundas, assim criando um perfil de superfície do substrato uniforme. Conforme Figura 4, a camada de difusão, que compreende ao gradiente da concentração de íons metálicos dissolvidos no eletrólito, é menos espessa nas regiões protuberantes que nas regiões do vale, fazendo com que o valor da corrente limitante seja maior nestas regiões mais altas, resultando no nivelamento da superfície metálica. [Matloz, 1995; Beamud, 2017] [Yang, 2016].

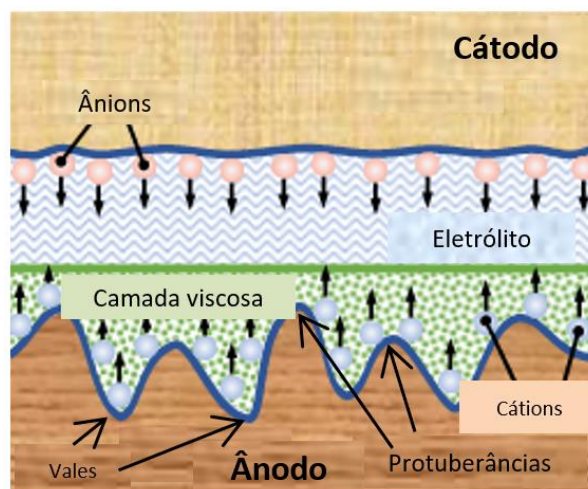


Figura 4. Esquema da teoria da viscosidade do filme do eletrólito. Adaptado de Han et al. (2019).

Zhang et al. (2018) preparou a liga de Ti6Al4V através do método *selective laser melting* (SLM), o qual esferas da liga são fundidas contra uma superfície. Este processo gera imperfeições, como uma superfície porosa e algumas esferas não fundidas. A correção da superfície foi realizada com avaliação do tempo do eletropolimento de 5, 10, 15 e 20 min, utilizando eletrólito composto por ácido acético glacial, ácido perclórico e água destilada. A menor rugosidade obtida em escala micrométrica foi obtida em 15 min de polimento eletroquímico.

Geralmente, a superfície lisa obtida no eletropolimento assume dois processos: nivelamento anódico (macro-liso) e o abrilhantamento (micro-liso). No processo de nivelamento, há eliminação da superfície com rugosidade maior que 1 μm , o que é resultado da diferença do potencial de distribuição entre as regiões protuberantes e os vales. A alta densidade de corrente nas regiões protuberantes lidera uma maior taxa de dissolução do material. No processo de abrilhantamento ocorre a eliminação da superfície com rugosidade menor que 1 μm , e isso é resultado da influência dos defeitos da superfície e da orientação cristalográfica no processo de dissolução eletroquímica. Portanto, é possível atingir o efeito nivelador sem o efeito de abrilhantamento, ou vice-versa, pelo controle dos fatores de processo [Han, 2019].

O eletropolimento pode ser limitado pelo transporte de massa, mais especificamente, pela difusão dos íons metálicos dissolvidos, pelas espécies “aceitadores” provenientes do eletrólito e pelas moléculas de água [Yang, 2016].

3.4 Polimerização por plasma

A polimerização por plasma tem sido investigada para a deposição de filmes poliméricos [Gerchman, 2019; Anand, 2019]. No entanto, algumas pesquisas têm avaliado este método para a obtenção de filmes silanos [Batan, 2010].

Comumente descrito como a quarta fase da matéria, o termo plasma descreve o estado ionizado do gás (também chamado de descarga de brilho), o qual envolve processos de ionização, excitação e quebra de ligações químicas para formação de espécies ativas como átomos, radicais, moléculas e íons no estado fundamental e em níveis excitados, elétrons livres e emissão de fótons UV-vis [Trizio, 2018]. Como as densidades de íon e elétrons são iguais, o plasma é macroscopicamente neutro [Thiry, 2016]. Tais espécies são capazes de interagir com o material do substrato e polimerizar na interface, obtendo um filme que adere firmemente ao substrato. O processo pode ser conduzido com uma variedade de configurações de eletrodo, que tipicamente envolve baixa pressão e baixa temperatura [Alba, 2020].

No caso da polimerização por plasma (sinônimo de polimerização por descarga luminescente), estas espécies surgem com a ativação de um precursor orgânico, os quais convergem para a formação a um filme sólido [Thiry, 2019], ou seja, refere-se à formação de materiais poliméricos sobre influência de plasma (gás parcialmente ionizado) [Yasuda, 1985]. A polimerização por plasma envolve a recombinação de unidades de monômeros por ligação cruzada após fragmentação para então, produzir uma estrutura aleatória do polímero [Alba, 2020].

Historicamente, foi desenvolvido como barreira física de proteção à corrosão [Thiry, 2016]. Quase sempre, estruturalmente, o polímero formado no plasma não se assemelha ao polímero convencional, devido à existência de uma abundante quantidade de espécies reativas, com as quais podem gerar diversos caminhos reacionais (Figura 5). Assim, a deposição por plasma se comparada à polimerização convencional, o filme polimerizado por plasma produzido é em grande parte amorfo com ligação cruzada, possuindo altas taxas de reticulação e ramificação das cadeias poliméricas, proporcionando uma boa resistência mecânica [Batan, 2010], [Anand, 2019]; [Thiry, 2016]. Além disso, a polimerização por plasma exibe uma forte adesão para uma ampla variedade de substratos (cerâmicos, metais, etc.), além de permitir a deposição do filme nas mais diversas formas do substrato [Anad, 2019].

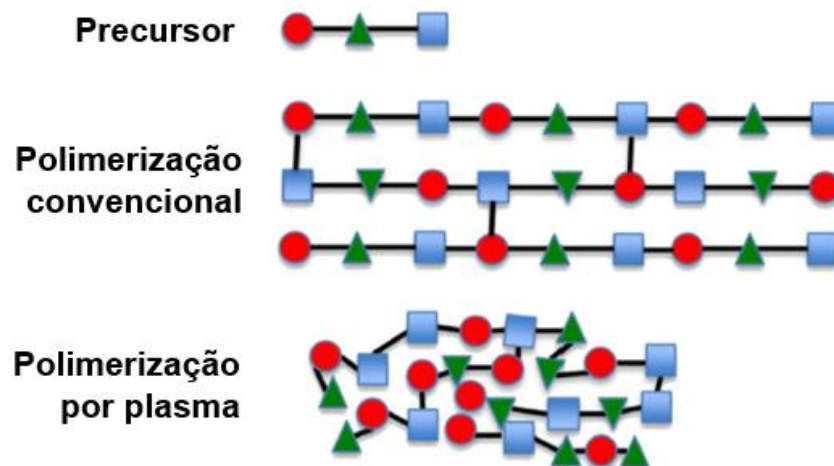


Figura 5. Diferença estrutural entre polímeros depositados através métodos convencionais e por plasma. Adaptado Anand et al. (2019).

Deposição de revestimentos sobre a superfície metálicas são uma das melhores soluções para melhorar a osseointegração e a citocompatibilidade

sanguínea. Teoricamente, os revestimentos de superfície atuam na formação de uma camada mais externa para melhorar ou prevenir os metais da corrosão ou exposição a oxidação. Adicionalmente a deposição sob a superfície do implante ajuda a prevenir a liberação de íons metálicos nocivos ao organismo humano. [Asri, 2017]. Recentemente, Zouaghi et al. (2018) obtiveram uma superfície nanoestruturada com Si-O-Si que possibilitou a redução de 30% a proliferação de *S. aureus* comparativamente ao substrato metálico de AISI 316L pela aplicação de filme silano a base do precursor hexametildisiloxano (HMDSO) por pulverização a plasma.

Alba et al. (2020) avaliaram o efeito da potência, tempo de deposição e espessura do filme polimerizado a plasma nas características de molhabilidade e composição química, utilizando o precursor acrilato de metila. Foi demonstrado que a rugosidade pode ser mantida depois da deposição do filme polimérico polimerizado por plasma.

As principais vantagens da técnica de polimerização por plasma são:

- Possibilidade de se depositar filmes extremamente finos sobre objetos das mais diferentes formas, sendo que as alterações produzidas são apenas superficiais, preservando as propriedades do interior do substrato (*bulk*) [Burkarter, 2016; Anad, 2019];
- Quando comparado com processos úmidos, a polimerização por plasma produz pequenas quantidades de resíduos e utiliza pequenas quantidades de reagentes [Carvalho, 2005], como também não utiliza solventes para dissolver o monômero como na polimerização convencional, o que a torna uma técnica compatível com as questões ambientais [Thiry, 2016], minimizando também um efeito citotóxico na superfície no implante [Alba, 2020].
- Possibilidade de tratamento de uma ampla faixa de materiais, incluindo polímeros. [Thury, 2016], [Anad, 2019];
- Baixa temperatura de processo [Thury, 2016];

- Capacidade de modular as propriedades de uma dada superfície (cristalinidade, morfologia, composição química do material depositado) pelo ajuste das condições. [Thury, 2016];
- Exibe propriedades físico-química interessantes para materiais orgânicos, assim como estabilidade térmica, mecânica e química. O filme depositado é quimicamente estável e fisicamente durável [Alba, 2020];
- Exibe uma forte adesão para uma ampla variedade de substratos (cerâmicos, metais, etc.) [Anad, 2019], [Thury, 2016].

De acordo com o mecanismo de polimerização por plasma frio, o mais importante fator que afeta as propriedades do filme é a energia aplicada por molécula, do qual governa o grau de fragmentação do precursor na descarga energética. Assim Yasuda (1985) propôs o parâmetro Yasuda, o qual é definido pela energia de entrada (necessária) por unidade de massa do precursor:

$$\text{Yasuda} = W/F.M$$

Onde:

W – força dissipada na descarga [J/s]

F – taxa de fluxo do precursor [mol/s]

M – massa molecular do precursor [kg/mol]

Tetraetoxissilano (TEOS) Figura 6, é um dos organosilanos mais utilizados no processo de polimerização por plasma frio. Atóxico e não explosivo, é mais seguro entre os silanos [Aumaille, 2000]. De acordo com Batan et al. (2010), o plasma pode ser utilizado para decompor quimicamente o precursor silano, gerando espécies ativas, que promovem a formação do filme com composição próxima a do monômero utilizado (precursor). Na literatura, é comum encontrá-lo nos processos que utilizam plasma de gás oxidante, como oxigênio, ozônio ou óxido nitroso, para a deposição de filmes de óxido de silício [Firouzjaha, 2013; Carvalho, 2005; Granier, 2003; Chung, 2009]. Nestas condições, é capaz de produzir alta qualidade de filmes de SiO₂, com altas taxas de deposição a baixas temperaturas, favorecendo uma superfície menos rugosa com melhor cobertura do substrato [Firouzjah, 2013]. No

entanto, SiO_2 pode ser depositados pelo próprio TEOS sem a utilização de gás oxidante, uma vez que no TEOS, o átomo de silício já está oxidado, ao contrário dos outros precursores a base de silício como SiH_4 , SiCl_4 , SiH_2Cl_2 [Chung, 2009; Teshima, 2003]. Além disso, os precursores alcoxissilanos não necessariamente necessitam apresentar insaturações para propagar a polimerização [Nisol, 2014].

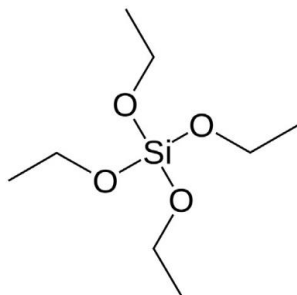


Figura 6. Estrutura molecular de TEOS.

Porém, é conhecido que o controle da deposição de filme polimerizado por plasma depende ou do impacto de elétrons ou da presença do átomo de oxigênio da fase gás [Chung, 2009; Anand, 2019]. Estudos prévios realizados por Granier et al (2003), mostraram que a concentração de oxigênio no plasma é uma função da taxa de decapagem, utilizando diferentes forças de injeção, ou seja, a decapagem e a deposição competem em sistemas a plasma de O_2 e o precursor TEOS. Nestes estudos, foi estabelecido que o mecanismo de deposição a partir de TMOS (tetrametoxisilano), pode ser estendido ao TEOS. Assim, como a razão da pressão parcial de O_2 aumenta, a frequência do impacto de elétron na dissociação de TMOS e suas reações com o átomo de oxigênio diminuem, isso porque presume-se que o oxigênio esteja envolvido na dissociação do precursor na fase gasosa e também, que seja responsável pela eliminação (decapagem) dos átomos de carbono e hidrogênio do crescimento do filme [Granier, 2003, Chung, 2009].

Silva et al. (1997) elucidaram os fragmentos obtidos na polimerização por plasma frio a partir dos precursores TEOS e TMOS como fonte de silício, através da técnica espectroscópica FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*). TEOS se mostrou o mais favorável para essas reações de polimerização, presumidamente pela habilidade de eliminar etileno e etanol como produtos neutros.

Todos os fragmentos de TEOS levam à formação $[\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4]\text{H}^+$, a qual é o produto de reação mais importante em todos os mecanismos estudados.

O ajuste dos parâmetros utilizados no plasma permite controlar as propriedades dos materiais resultantes (espessura e composição química) [Nisol, 2014]. Ressalta-se que o uso de precursores alcoxissilanos destaca-se neste método de aplicação, devido principalmente a vaporização à temperatura ambiente, no entanto, alguns estudos vêm priorizando o uso de organoalcoxissilanos [Batan, 2010; Szili, 2009]. Batan et al. (2010) verificaram maior reticulação da rede siloxano (Si-O-Si) na camada formada de revestimentos silanos depositados por plasma em relação ao método por sol-gel, em revestimentos silanos a base do precursor bis-trietoxissililetano (BTSE) sobre substrato de alumínio.

Gás argônio é utilizado para aumentar a eficiência no processo de ionização. Para Firouzjah et al (2013), ao adicionar argônio ao plasma, a soma da pressão parcial do oxigênio com os vapores de TEOS diminui, desde que a pressão de trabalho seja mantida constante. De fato, para a dissociação das moléculas de TEOS com o aumento do percentual de argônio, decai o mecanismo de oxidação simultaneamente com a melhoria do mecanismo de impacto do elétron. Porém altas quantidades de elétrons energeticamente produzidos causa a dissociação de TEOS em fragmentos menores que os grupos alquil, o que levou a formação da ligação Si-O-Si mesmo em pequenas quantidades de oxigênio. O estudo reportou também, que aumentando a potência do plasma, o TEOS é dissociado em pequenos fragmentos, diminuindo os grupos oxigenados.

Arolkar et al (2016) utilizam TEOS como precursor, para produzir filmes de óxido de silício em substratos poliméricos biodegradáveis a base de amido de milho e poli-caprolactona, utilizando a técnica de polimerização por plasma frio em diferentes tempos de deposição. Na análise da composição química do filme obtido, foram identificados quatro picos $\text{C}_3\text{-Si-O}$, $\text{C}_2\text{-Si-O}_2$ e C-Si-O_3 . Os autores concluíram que com o aumento do tempo de deposição de 5 min para 20 min, aumentou a conversão de SiO_4 nos compostos de grupamentos de silanos.

3.4.1 Mecanismos de formação do polímero

As reações no estado de plasma são, na sua maioria, dirigidas pelas colisões dos elétrons e espécies energizadas, as quais fragmentam o precursor. Geralmente, o processo é operado sob condições de baixa pressão (da ordem de μatm), na presença de gás inerte como argônio e hélio. A função desses gases é iniciar e sustentar o plasma, atuando como gás de arraste para que os vapores orgânicos (oriundos do precursor) sejam introduzidos ao sistema como reagente [Anand, 2019]. No entanto, há grande parte de estudos utilizando oxigênio, e outros gases. [Teshima, 2003; Kim 2000; Aumaille, 2000; Trizio, 2018].

Na presença destes vapores orgânicos, a dissociação da cadeia de hidrocarbonetos produz grandes fragmentos de espécies ativas e pequenos radicais, que por sua vez, podem se recombinar dando origem a novas moléculas ou cadeias poliméricas intermediárias, que novamente podem ser dissociadas pela ação do plasma, podendo fazer ligações cruzadas para formar um polímero. Essa sucessiva dissociação e recombinação de espécies na fase gasosa origina o polímero depositado com cadeias altamente desordenadas e com grupos funcionais diferentes daquele precursor inicial. [Anand, 2019; Gerchman, 2019; Bussey, 2018].

Neste mecanismo chamado de *polimerização por plasma*, ocorre a liberação de gases residuais devido ao alto índice de fragmentação molecular existente. Esses gases não contribuem para a formação do polímero e são retirados do reator pelo sistema de vácuo [Anand, 2019; Gerchman, 2019]. Um processo semelhante, é chamado de *polimerização induzida por plasma*, também conhecida como polimerização molecular, a qual a formação do filme ocorre sem que haja a fragmentação das moléculas do precursor. Neste caso, a cadeia polimérica é formada através da junção de unidades moleculares reativas (radicais livres, moléculas em estados excitados ou ionizados, etc). Sendo assim, a estrutura de um filme tende a ser muito parecida com a estrutura molecular do precursor.

Na Figura 7, com a polimerização por plasma, o elétron desemparelhado no radical livre faz a espécie altamente reativa em direção a outros radicais e ligações insaturadas nas moléculas. Isto é similar a polimerização convencional por radical livre, porém a diferença está nas espécies de iniciação no processo de polimerização. O local de início é frequentemente aleatório na polimerização à

plasma, porque há diversidade das rotas de fragmentação do precursor, enquanto na polimerização convencional por radical livre, o monômero é sempre o mesmo. Contudo, similar a este processo, as reações de iniciação, propagação, terminação e reiniciação dos radicais (um com outro e entre moléculas) são principalmente aplicáveis à descrição do mecanismo de crescimento a polimerização por plasma. Enquanto na polimerização por plasma por indução é similar ao processo de polimerização convencional, consistindo em propagação e terminação das reações entre cadeias, na polimerização por plasma, a iniciação e a reiniciação de intermediários são mandatórias para manter a reação. Estes intermediários são criados, na sua maioria, pelo impacto de elétrons da dissociação de hidrocarbonetos no estado de plasma.

Polimerização por Plasma	Polimerização Induzida por Plasma
Iniciação / Reiniciação	Propagação / Terminação
$S_i \rightarrow S_i^*$	$S^* + S \rightarrow SS^*$
$S_j \rightarrow S_j^*$	$S_i^* + S \rightarrow S_i^* + 1$
Propagação / Terminação	$S_i^* + S_j^* \rightarrow S_i-S_j$
$S_i^* + S_j^* \rightarrow S_i + S_j$	
$S_i^* + S_j \rightarrow S_i + S_j$	

Figura 7. Esquema do mecanismo da polimerização por descarga de brilho proposto por Yasuda (1985).

Onde i e j são números de unidades repetitivas ($i = j = 1$) do precursor e S representa as espécies reativas, que podem ser um íon de qualquer carga, uma molécula excitada, ou um radical livre. O S não necessariamente mantém a estrutura do precursor.

De acordo com Anand et al. (2019), a polimerização por plasma e polimerização induzida por plasma coexistem em diferentes graus, conforme demonstrado pelo esquema proposto por Yasuda (1985). Conforme Figura 8, o monômero é polimerizado por estes dois processos, onde na polimerização induzida a plasma o produto do polímero mantém a estrutura do seu precursor (monômero), ou seja, moléculas do monômero ativadas pelo plasma agrupam-se consecutivamente através do mecanismo de propagação de cadeia (semelhante a

polimerização convencional). Neste processo ocorre somente quando a estrutura do monômero é polimerizável. Em contrapartida, na polimerização por plasma, o produto final será totalmente diferente do precursor, o qual servirá apenas como fonte de radicais para a polimerização proceder. Neste processo, há recombinações de espécies ativadas, formando aglomerados de alto peso molecular na fase plasma. Estes são chamados de polímeros intermediários, que podem ser depositados pela ação da gravidade ou forças eletrostáticas, reativados pelo plasma ou ainda removidos do reator pelo sistema de vácuo. Quando este mecanismo de deposição é predominante, a estrutura do filme não apresenta unidades de repetição, mas ao invés disto, é completamente desordenada.

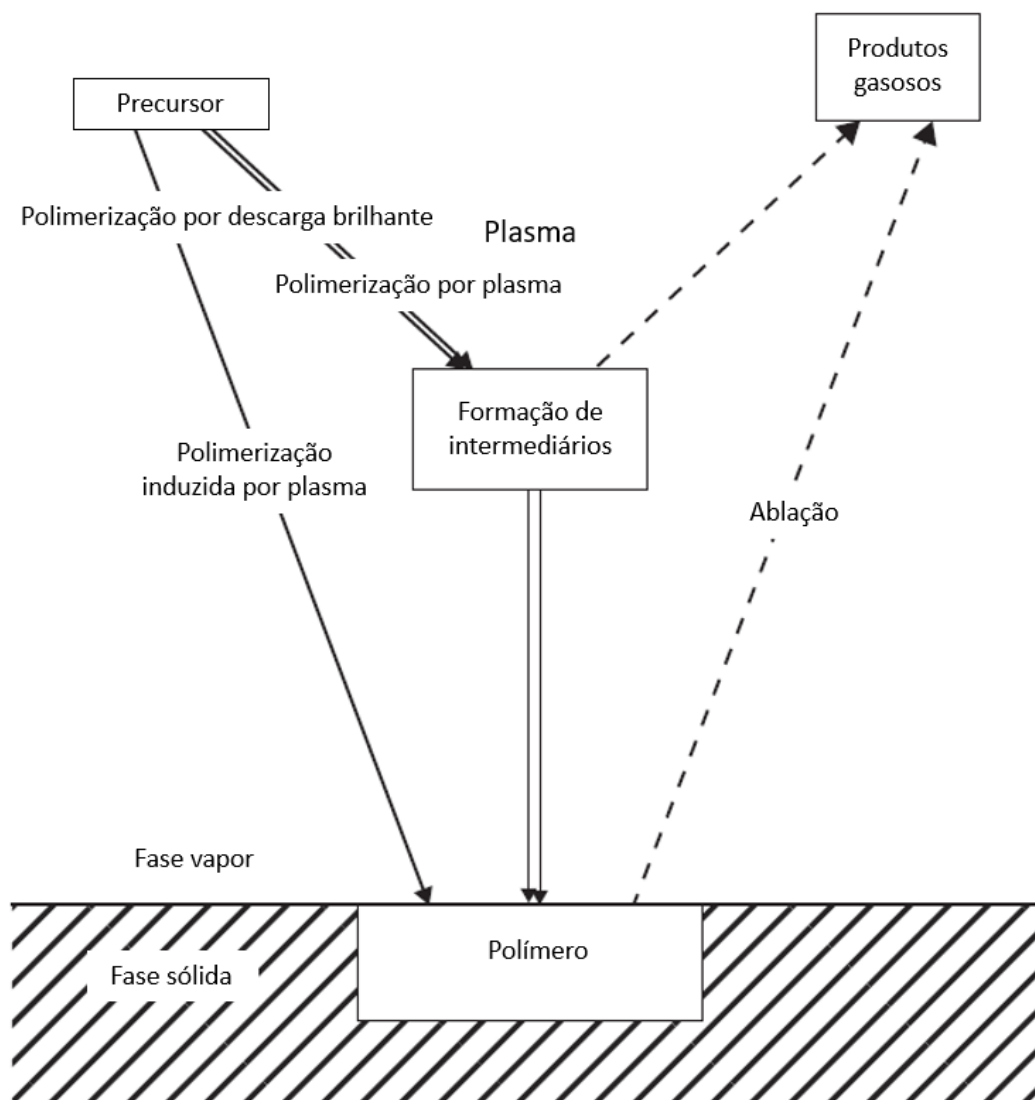


Figura 8. Processo de deposição de filme polimerizado por plasma sobre superfície sólida. Adaptado de Anand et al. (2019) e Yasuda (1985).

Paralelamente a isso, há um processo competitivo à polimerização o qual será discutido no item 3.4.2. Neste processo, parte de subprodutos e da própria superfície são removidas como efluente gasoso.

3.4.2 Processo de Ablação

Concorrentemente ao processo de deposição do polímero, pode ocorrer o processo de corrosão do filme. Chamada de ablação, é um mecanismo frequentemente negligenciado, mas que tem um grande impacto na estrutura do produto final e na taxa de polimerização. É o processo contrário à deposição, e pode ocorrer de forma física (*sputtering*) ou quimicamente (decapagem) [Yasuda, 1985].

O termo ablação no mecanismo CAP (*Competitive Ablation and Polymerization*), o qual é definido como um processo competitivo entre a ablação e a polimerização por plasma ou polimerização de plasma-induzido. Quando a ablação ocorre pelo processo físico, espécies com alta energia cinética da descarga transferem energia para a superfície, rompendo ligações químicas e liberando espécies para a fase gasosa. No processo químico, as espécies reativas do plasma interagem quimicamente com espécies da superfície, formando grupos voláteis que são ejetados do filme sólido. Contudo, o processo de ablação nos sistemas de polimerização por plasma, não necessariamente é resultado de uma remoção de material. O material ablado pode ser redepositado, através da reativação das espécies gasosas ou deixar o sistema como um efluente gasoso, dependendo da natureza das espécies [Yasuda, 1985].

3.5 Crescimento Celular sobre superfícies metálicas

A biocompatibilidade de um material pode ser definida como a sua aceitação biológica quando colocada no organismo vivo, podendo ser analisada por diferentes parâmetros, sendo que a topografia de um implante ortopédico desempenha um papel essencial na formação óssea com o tecido ósseo da região adjacente ao implante.

Células-tronco mesenquimais são isoladas a partir da medula óssea ou outros tecidos, sendo aptos a se diferenciar em diversos tipos celulares sob condições específicas, tanto *in vitro* como *in vivo* [Dominici, 2006]. Em decorrência da facilidade em se dividir e proliferar, concluiu-se que as células-tronco mesenquimais seriam as células responsáveis pela manutenção e renovação dos tecidos mesenquimais adultos, incluindo o músculo cardíaco [Caplan, 2005].

Shen et al. (2015) investigou o efeito da superfície topográfica de substratos de titânio (Ti) no comportamento de células-tronco mesenquimais (CTM). No estudo, uma série de estrutura hierárquica micro/nano foi fabricada sobre substratos de titânio micro-estruturados via sol-gel pelo método spin-coating. O efeito desta estrutura foi avaliado no comportamento do crescimento das CTM em níveis celulares e moleculares *in vitro* em superfícies de 20 nm, 40 nm e 80 nm de diâmetro da nanoestrutura. Os ensaios em *in vitro* demonstraram que o espalhamento, a proliferação e a diferenciação de CTM foram melhoradas com a estrutura com tamanho de grão de 80 nm.

Testrich et al. (2013) verificaram a variação molecular do filme polimerizado por plasma a partir do precursor etilenodiamina sobre a superfície de Ti6Al4V durante 360 dias. Simultaneamente, foi investigada a adesão celular a partir da forma das células do tipo MG-63 aderidas sob a superfície da liga polimerizada. Observaram que estas células se fundem na superfície, como resultado do aumento da área de contato entre a célula e a superfície, provavelmente associado a maior ligação do implante no organismo humano. Presume-se que os grupos nitrogenados polimerizados a plasma facilitaram o espalhamento, mesmo sob uma superfície rugosa e polimerizada por plasma.

Martínez et al. (2016) avaliaram a biocompatibilidade pelo comportamento *in vitro* (células-tronco mesenquimais adiposas) e *in vivo* de revestimentos silanos compostos por metiltrimetoxisilano (MTMOS) e TEOS, em diferentes proporções, depositados sobre substratos de titânio. Os autores evidenciaram o efeito positivo da liberação de silício pela degradação dos revestimentos na proliferação e diferenciação de células-tronco (ambos os comportamentos foram pronunciados para as amostras contendo maior percentual de TEOS). Quando avaliado o comportamento *in vivo*, observou-se a bioatividade do revestimento bem como o

auxílio do mesmo na formação de um novo osso, justificada pela liberação de silício que conseqüentemente ativou a produção de colágeno tipo I.

Antonini et al. (2017) avaliou a influência do tratamento de superfície de Ti6Al4V na diferenciação osteogênica de progenitores mesenquimais derivados de células-tronco embrionárias humanas (hESC-MPs). Tais superfícies foram obtidas a partir do polimento mecânico e dos eletropolimentos de 4 e 12 min em solução eletrolítica de H₂SO₄/HF/Glicerina. Os autores demonstraram que os tratamentos utilizados no estudo contribuíram para diferenciação osteogênica, indicando que a diferenciação foi fortemente influenciada pela microrugosidade da superfície produzida.

Antonini et al. (2019) relacionou o crescimento celular com três tipos de esterilização sob superfície de Ti6Al4V nanotexturizada. Foi identificado que a esterilização por plasma a ar favoreceu a viabilidade celular comparando com as esterilizações por autoclave e PBS + Etanol, além de ter evitado modificações na superfície nanoestruturada.

4. Procedimento experimental

Todas as amostras da liga de titânio (Ti6Al4V) foram preparadas mecanicamente com lixas de carbetto de silício de grana 180 até 5000; sabão neutro e água. Após, as amostras foram limpas com água deionizada, álcool etílico e secas em ar frio. Parte destas amostras receberam o polimento eletroquímico utilizando eletrólito ácido para posterior aplicação do filme polimerizado por plasma (tetraetoxissilano - $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) por polimerização por plasma frio, conforme fluxograma abaixo:

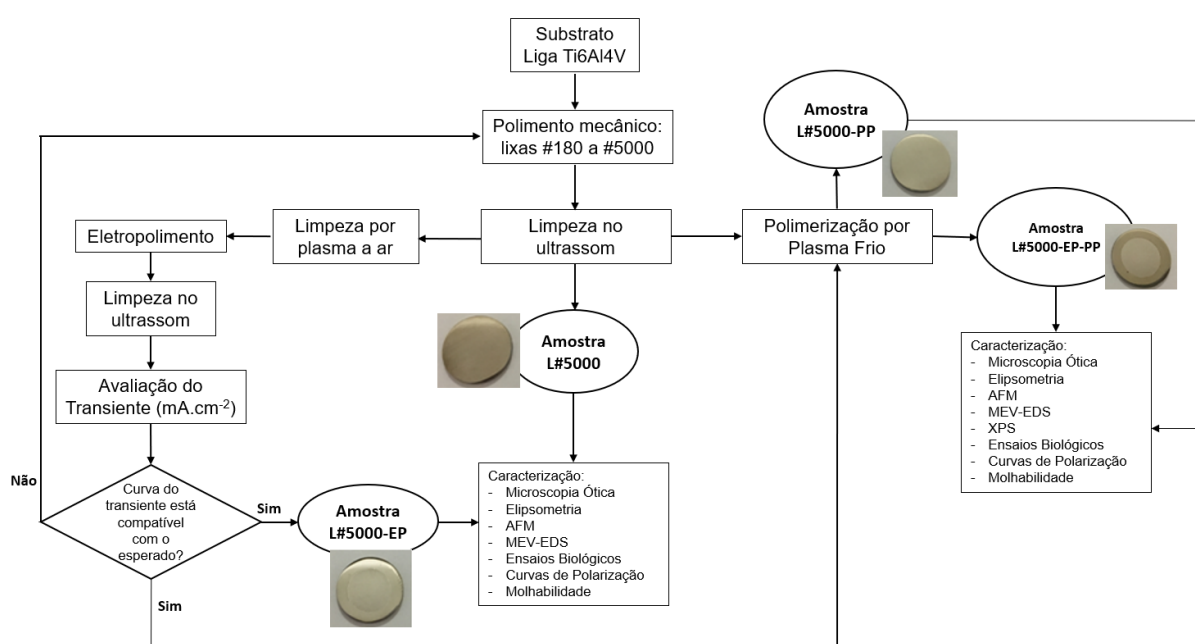


Figura 9. Fluxograma na metodologia utilizada na pesquisa.

Tabela 2. Descrição das amostras avaliadas.

L#5000	Amostra lixada até 5000
L#5000-PP	Amostra lixada até 5000 com aplicação do filme polimerizado por plasma
L#5000-EP	Amostra lixada até 5000 com polimento eletroquímico
L#5000-EP-PP	Amostra lixada até 5000, polida eletroquimicamente, com aplicação do filme polimerizado por plasma

4.1 Materiais empregados

As amostras foram obtidas a partir de uma chapa da liga de Ti6Al4V, com aproximadamente, 2 mm de espessura, cujo diâmetro do corte foi de 14 mm. Conforme especificações da empresa fornecedora da chapa de Ti6Al4V de grau 5 e segundo norma ASTM B348-13 (2013), a composição da liga de estudo é 5,5 a 6,75% de alumínio, 3,5 a 4,5% de vanádio e o restante em titânio.

4.1.1 Preparação da superfície

A preparação da superfície (14 mm de diâmetro e 2 mm de espessura), consistiu no desgaste mecânico gradual utilizando lixa de SiC de grana 180, 240, 320, 600, 800, 1000, 2400 a 5000, alternando 90° entre cada sucessiva lixa.

4.1.2 Limpeza

As amostras foram limpas em banho no ultrassom com etanol seguidas de água por 5 min cada. Após, foram secas em ar frio, e limpas em plasma a ar.

A limpeza por plasma de ar (78,1% de N₂, 20,9% de O₂ e 1% de Argônio e outros gases) foi realizada com uma descarga do tipo RF (radiofrequência), com potência máxima de 65W e tempo de limpeza de 1 minuto na pressão de 250 μ atm.

Este processo foi realizado antes do eletropolimento das amostras.

4.1.3 Eletropolimento

Os substratos foram eletropolidos em eletrólito composto por 60% de ácido sulfúrico, 30% ácido fluorídrico e 10% de glicerina [Antonini, 2016]. O contato elétrico com o ânodo foi feito através de uma haste de cobre no interior de um suporte de PLA, onde a amostra foi posicionada, conforme Figura 10. A área exposta da amostra a ser tratada eletroquimicamente foi de 0,71 cm², ao passo que a área do

cátodo (contra-eletrodo) foi de 1,5 cm², ambas medidas com valores aproximados. Neste trabalho, a superfície eletropolida foi renomeada como nanotexturizada.

O eletropolimento (Figura 11) foi conduzido utilizando 25 V de tensão constante, em temperatura controlada de 7°C ± 0.5°C, por 4 min. Depois do tratamento eletroquímico as amostras nanotexturizadas foram lavadas no ultrassom em banho com água por 10 min, trocando a água a cada 5 min. Os valores de corrente (mA) x tempo (s) foram registrados pelo software TCXX. A escolha dos parâmetros de eletropolimento foi baseada em estudo de Antonini et al. (2012), em superfícies de titânio, que mostrou que tempos de eletropolimento mais longos favorecem a formação de óxidos, enquanto tempos de eletropolimento mais curtos e temperatura de eletrólito de ~ 7°C favorecem a formação de óxidos nanoestruturados.



Figura 10. Suporte com a amostra a ser nanotexturizada.



Figura 11. Sistema de tratamento eletroquímico utilizado nesse estudo.

4.1.4 Polimerização por plasma frio

O processo de polimerização por plasma frio foi conduzido utilizando o precursor TEOS (tetraetoxissilano - $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) à temperatura ambiente ($22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Quando atingida a $230 \mu\text{atm} \pm 5 \mu\text{atm}$ o plasma de gás argônio (pureza 99,999%) foi ligado e mantido por 20 min. Esta metodologia foi baseada no estudo desenvolvido por Firouzjah et al. (2013). A potência e a tensão utilizada foram, respectivamente, de 30W e 4000V. Então, uma descarga elétrica do tipo de radiofrequência (RF) foi aplicada para promover a geração do plasma e consequentemente, a formação do filme polimerizado sob a superfície metálica.

A deposição filme por plasma foi realizada em um aparato confeccionado no Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC/UFRGS) Figura 12, onde as amostras foram colocadas dentro de um recipiente de borosilicato, sob eletrodo de titânio. Dentro desse recipiente foi realizado vácuo na pressão de $260 \mu\text{atm}$, monitorada por um vacuômetro eletrônico CPS VG100A e utilizando-se uma bomba de vácuo de 12 cfm duplo estágio bivolt.

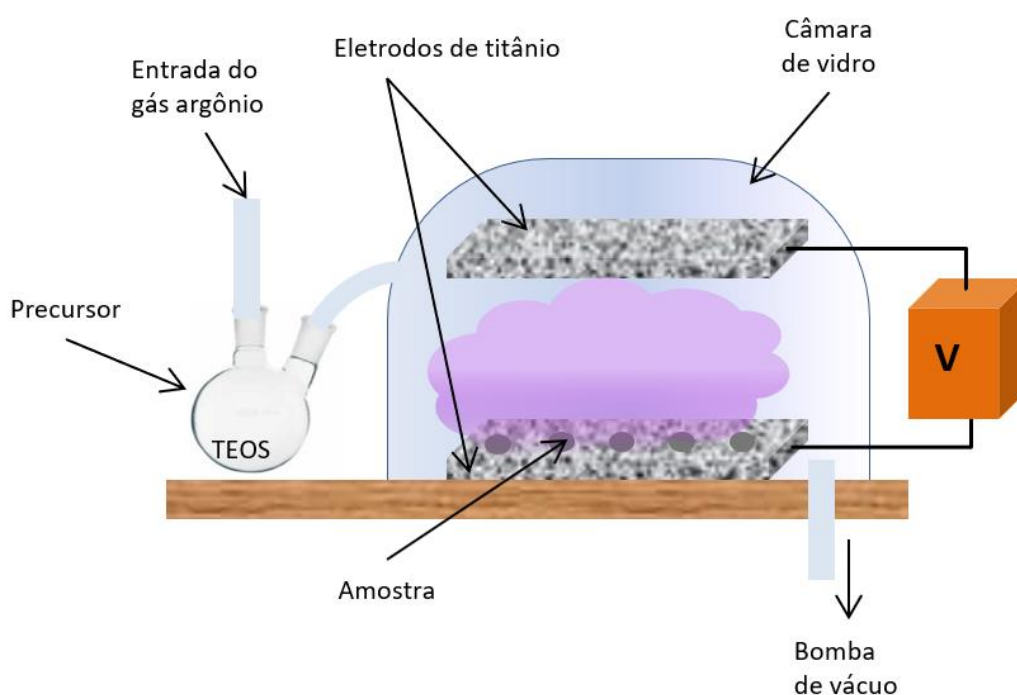


Figura 12. Sistema experimental de polimerização por plasma frio do LAPEC.

Posteriormente, uma atmosfera inerte foi criada pela injeção de gás argônio, que atuou como gás de arraste, uma vez em contato com o precursor TEOS. Após,

foi aplicada uma descarga elétrica do tipo RF (radiofrequência) para promover a geração do plasma e conseqüentemente a formação filme polimerizado sobre o substrato metálico.

4.2 Caracterização

A amostras dos sistemas L#5000; L#5000-PP, L#5000-EP e L#5000-EP-PP foram caracterizadas morfologicamente através das técnicas Elipsometria Espectral, Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV/EDS), rugosidade micrométrica por perfilometro, Microscopia de Força Atômica (AFM) e Espectroscopia de Raio-X (XPS). As propriedades eletroquímicas foram avaliadas a partir das curvas de polarização e monitoramento do potencial de circuito aberto (OCP). A molhabilidade foi avaliada através das medidas de ângulo de contato. As respostas biológicas foram avaliadas pelas técnicas de viabilidade celular (atividade mitocondrial com MTT e coloração de vivas e mortas com FDA e IP) e coloração de células aderidas (com DAPI).

4.2.1 Elipsometria Espectral

A espessura dos filmes de TEOS foi determinada pela técnica óptica de elipsometria espectral (SOPRA GES-5E), a qual mede a mudança no estado da polarização da luz, após esta refletir na amostra num ângulo de incidência de 75 graus, e correlaciona essa mudança a um modelo físico do filme, para assim obter a curva de dispersão do filme e sua espessura física. A faixa espectral utilizada foi de 0,35 a 0,75 μm (passos de 0,005 μm). O R^2 se refere ao ajuste do modelo físico para o filme aos pontos experimentais.

Primeiramente, a amostra lixada sem filme (L#5000) foi medida para a obtenção de suas curvas de dispersão pelo software de análise. Como é um material bulk (substrato onde os filmes foram depositados), essas curvas são obtidas diretamente da equação fundamental da elipsometria e são utilizadas nos modelos matemáticos para o cálculo das constantes ópticas dos filmes. Para o cálculo das espessuras, foi considerado que os filmes eram homogêneos e isotrópicos,

possuindo uma pequena absorção e espalhamento, com curvas de dispersão real ($n(\lambda)$) e imaginária ($k(\lambda)$) de Cauchy:

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4}$$

$$k(\lambda) = \frac{D}{\lambda} + \frac{E}{\lambda^3} + \frac{F}{\lambda^5}$$

Onde A, B, C, D, E e F são constantes características de cada filme, as quais serão obtidas pelo software de análise no ajuste do modelo aos dados experimentais.

4.2.2 Microscopia Óptica

A caracterização morfológica das amostras foi auxiliada por microscopia óptica, antes e após a aplicação do filme polimerizado por plasma. As análises foram realizadas por meio de um microscópio óptico da marca OLYMPUS CX31 de magnitude de 10x.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV/EDS)

Para as imagens obtidas por MEV foi utilizado o modelo ZEISS EVO LS-10 com detector de EDS, modelo BRUKER XFlash Detector 610M. A aceleração de voltagem (EHT) foi de 20kV sob uma corrente de aceleração de 100 pA. A distância de trabalho (WD) e a magnificação (Mag) estão descritas nas imagens.

4.2.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens foram obtidas com o microscópio de força atômica SPM-9500J3 SHIMADZU operando em modo de contato, com sondas de nitreto de silício (NANOSENSORS) e scanner com variação vertical de 4 μm e área de varredura de 2 μm x 2 μm . A avaliação da rugosidade da superfície através do AFM foi realizada através das medidas de Ra (média aritmética dos valores absolutos das ordenadas

de afastamento, dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medição).

4.2.5 Rugosidade Micrométrica

A rugosidade micrométrica das superfícies das amostras foi determinada utilizando o perfilômetro de contato da marca MITUTOYO SJ-400, de onde foram obtidos os valores de Ra. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. De acordo com as informações do fabricante, Ra é definido como a média aritmética dos valores absolutos de todo o comprimento da amostra.

4.2.6 Espectroscopia de raio-X (XPS)

Essa técnica foi utilizada para verificar a presença de silício para confirmar a deposição do filme polimerizado por plasma sobre as superfícies das amostras polimerizadas a plasma. A análise por XPS foi conduzida usando um analisador Omicron Sphera com fonte de raio-X de Al K α ($h\nu = 1486,6$ eV). A fonte de raio-x foi posicionada a 80° em relação a direção da emissão dos fotoelétrons. As amostras foram colocadas no porta-amostras sem preparação adicional e inseridas na câmara de vácuo ultra-alta ($\sim 5 \times 10^{-9}$ mbar). As medições foram conduzidas em Long Scan, na região eletrônica Si 2p, O 1s and C 1s das amostras. Foi utilizada uma energia de passagem de 50 eV e 10 eV, uma etapa de energia de 1 eV e 0,1 eV e 0,1 s de tempo de permanência para as regiões Long Scan e XPS de alta resolução, respectivamente. A calibração do analisador de elétrons foi realizada utilizando um padrão Au e considerando a posição do pico Au 4f $_{7/2}$ a 84,0 eV. Além disso, o C adjacente foi considerado em 284,5 eV na região C1 para verificar possíveis efeitos de carregamento.

Os espectros XPS de Si 2p foram analisados com o software XPS Peak 4.1, usando um background do tipo Shirley e uma função de soma simétrica Gaussiana-Lorentziana com contribuição Lorentziana de 18%, conforme determinado a partir da análise da região XPS do Au 4f do padrão Au usado. A energia de ligação e os

valores de FWHM de um determinado componente químico foram restringidos ao mesmo valor para todas as amostras.

4.2.7 Curvas de Polarização e monitoramento de potencial de circuito aberto (OCP)

Para determinar as propriedades eletroquímicas das nanoestruturas, as curvas de polarização foram realizadas utilizando potenciostato/galvanostato PGSTAT302N no laboratório LAPEC/UFRGS, o qual foi utilizado uma célula convencional de três eletrodos: eletrodo calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência, fio de platina como contra-eletrodo, e a amostra com área exposta de 50,26 mm², como eletrodo de trabalho. A medida foi realizada em meio não agitado, naturalmente aerado, sob temperatura de 37°C ± 1°C e pH 7,4 ± 0,2, sendo que como eletrólito foi empregada a Solução de Hanks, que mimetiza o fluido corpóreo (Tabela 3). O potencial de circuito aberto (OCP) foi monitorado durante os primeiros 30 min de imersão no eletrólito antes do ensaio de polarização. A polarização linear ocorreu na faixa de -1000 mV até +400 mV em relação ao OCP. A velocidade de varredura para obtenção da curva de polarização foi de 1 mV/s.

Tabela 3. Solução sintética de Hanks [Lopes, 2016].

Eletrólito	g/L
NaCl	8,00
CaCl ₂	0,14
KCl	0,40
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,06
NaHCO ₃	0,35
NaH ₂ PO ₄	0,10
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,06

4.2.8 Molhabilidade

A molhabilidade foi avaliada nos quatro sistemas estudados, aplicando solução de Hanks, que simula os fluidos corpóreos e da água deionizada.

A técnica (Figura 13) mede o valor do ângulo de contato formado entre a linha tangente à superfície do líquido e a superfície horizontal do substrato. Quando este ângulo estiver acima de 90° , a superfície é considerada hidrofóbica. Se o ângulo estiver abaixo de 90° , a superfície será chamada de hidrofílica [García, 2019]. Os resultados foram avaliados por ANOVA.



Figura 13. Diferenças no ângulo formado na superfície hidrofóbica (esquerda) e hidrofílica (direita).

Os testes foram realizados com um aparato desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O ângulo de contato foi determinado por meio de um programa de análise de imagens. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.2.9 Ensaios biológicos

As células-tronco mesenquimais (CTM) utilizadas neste trabalho são conhecidas como SHED (células-tronco mesenquimais a partir de dente de leite) e as culturas foram estabelecidas conforme estudos anteriores [Kabir, 2020; Bernardi, 2011].

Em capela de fluxo laminar, a polpa dos dentes foi digerida com colagenase e as células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO_2 em meio DMEM baixa glicose suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). Sempre que atingida a confluência, a cultura foi repicada utilizando 0,05% de Tripsina/EDTA. As células dissociadas foram então transferidas na densidade de 5.000 células por cm^2 . Dessa forma, subseqüentes passagens foram realizadas, e as culturas celulares foram avaliadas na quarta passagem.

Anteriormente à realização dos experimentos, conforme as recomendações da International Society for Cellular Therapy (ISCT) [Dominici, 2006], as células foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais humanas da seguinte

forma: (1) avaliação morfológica celular e capacidade de adesão ao plástico; (2) análise imunofenotípica das células por meio de citometria de fluxo e (3) capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica in vitro [Kabir, 2020; Bernardi, 2011].

As amostras L#5000, L#5000-EP, L#5000-PP e L#5000-EP-PP foram submetidas 1h de UV/lado. As células-tronco (30,000 por poço) foram semeadas nas *tissue culture plate* (TCP, usada como controle) e nas amostras e após 1 dia de cultivo, a viabilidade das células foi avaliada por meio do ensaio de atividade mitocondrial MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). O MTT foi utilizado em uma concentração de 0,25 mg/mL em tampão CMF por um tempo de incubação de 3h a 37°C (Maurmann, 2017; Siqueira, 2017). Após esse tempo, os sobrenadantes dos poços foram descartados e os cristais de formazan formados foram dissolvidos com 500 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e 300 µL lidos em espectrofotômetro Multiskan™ FC (Thermo Scientific – Thermo Fisher Scientific®) e o resultado calculado pela diferença de absorbâncias nos comprimentos de onda de 630 e 570 nm. Os resultados foram avaliados por ANOVA e teste t.

As amostras foram lavadas em tampão fosfato, fixadas em tampão paraformaldeído a 4% e os núcleos celulares foram corados com 0,5 µg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), de acordo com o protocolo de Maurmann et al. (2017). As fotografias foram obtidas com um microscópio de fluorescência (Leica Dmi8, Leica Microsystems). A viabilidade celular foi também visualizada por coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) em ensaio do tipo LIVE/DEAD. Os sobrenadantes dos poços de cultura foram desprezados e os mesmos foram lavados com tampão fosfato. Foram então adicionados 10 µg/mL de FDA e 5 µg/mL de IP dissolvidos em tampão fosfato, e as imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência (Leica Dmi8, Leica Microsystems).

5. Resultados e discussão

A densidade de corrente e o tempo de eletropolimento é frequentemente utilizado para controlar a rugosidade da superfície [Han, 2019]. Dessa forma, o transiente ($\text{mA}/\text{cm}^2 \times \text{min}$) obtido durante o tratamento eletroquímico está apresentado na Figura 14. Observou-se que após 1 minuto de eletropolimento, a densidade de corrente atinge um limite de estabilidade, provavelmente associada a saturação dos cátions dissolvidos na camada superficial do eletrólito [Yang, 2016]. Nesta região prevalece a formação do óxido, decorrente do processo de oxidação da superfície metálica, conforme reportado por Antonini et al. (2018) na caracterização estrutural das amostras eletropolidas da liga Ti6Al4V, por análise de XPS. Ao final do tratamento eletroquímico, a amostra nanotexturizada é obtida. Além disso, a partir dos resultados do transiente de densidade de corrente, se evidencia que todas as amostras nanotexturizadas foram reproduzíveis, indicando uma preparação adequada para o tratamento posterior por polimerização por plasma frio.

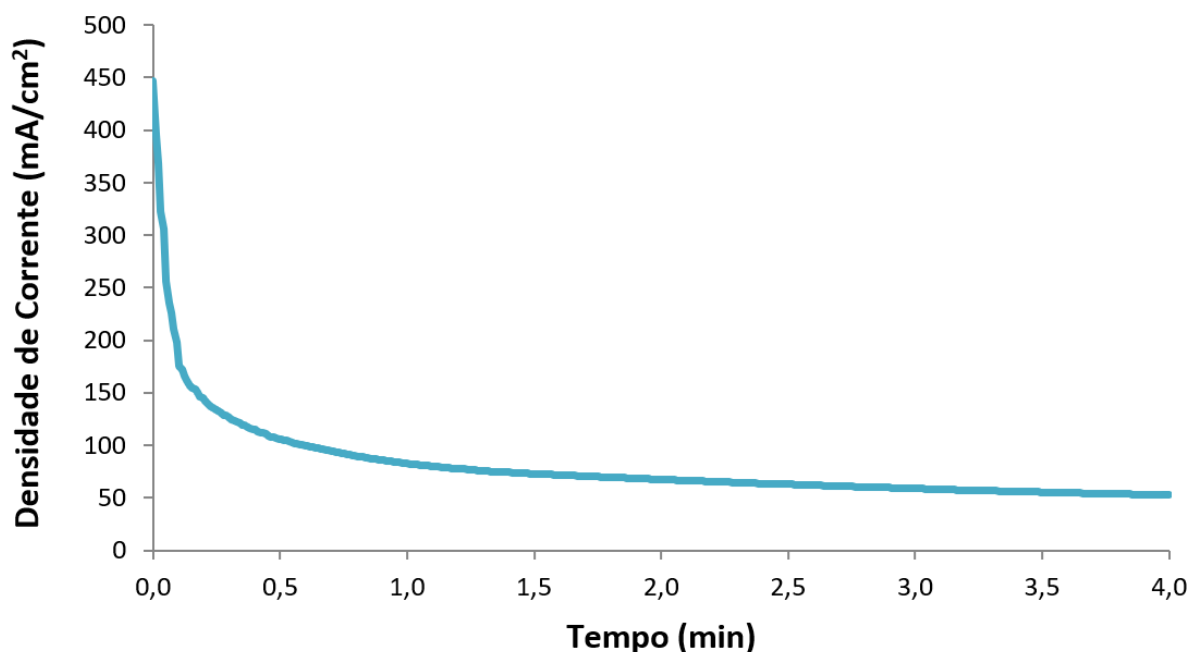


Figura 14. Transiente de densidade de corrente da amostra nanotexturizada.

Antonini et al (2017) encontrou superfícies semelhantes e utilizou o gráfico de transiente ($\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ vs. segundos) para avaliar a estabilidade da densidade de corrente associada a formação da camada de óxido da superfície nanoestruturada.

No estudo identificaram que a queda da densidade de corrente pode estar relacionada com o aumento da resistência elétrica.

A superfície original L#5000 ao final do eletropolimento (após 4 min), obteve aparência de cinza opaco (Figura 15). Tal aparência obtida é semelhante a que foi encontrada por S. F. Lamolle et al. (2009), no entanto, utilizou condições mais amenas no seu estudo (eletrólito com concentração de 0,2% de HF e 150 s de tempo de exposição) comparada às condições utilizadas neste trabalho.



Figura 15. Amostras de Ti6Al4V (a) antes e (b) após o eletropolimento.

Na Figura 16 são apresentadas as imagens por microscopia óptica dos sistemas estudados. A amostra lixada com aplicação do filme polimérico L#5000-PP (Figura 16c) não apresentou diferença entre a amostra sem o filme L#5000 (Figura 16a), o que é esperado, já que a camada de filme polimerizado por plasma é muito fina apresentando 23 nm (espessura obtida por medidas de elipsometria, como será discutido depois), a partir do processo de polimerização por plasma frio.

Ao analisar a microscopia óptica da amostra nanotexturizada (Figura 16-c), observa-se uma textura sem a presença de sulcos, isso pode estar relacionado aos mecanismos de competição entre a dissolução anódica e o espessamento da camada de óxido formado durante o tratamento eletroquímico. Tal comportamento não aparece na amostra somente lixada (Figura 16-a) e lixada com polimerização por plasma frio (Figura 16-c). Observa-se, também, que houve uma redução do diâmetro das cavidades (Figura 16-d) na amostra nanotexturizada após a deposição do filme polimerizado por plasma (L#50000-EP-PP), quando comparada com a amostra nanotexturizada sem o filme (Figura 16-b). Este comportamento, em escala

micrométrica, pode estar associado ao preenchimento ou deposição do precursor nas nanocavidades geradas no processo de polimerização por plasma a frio.

De modo a obter rugosidades específicas, S.H. Chen et al. (2016), obteve estruturas semelhantes a partir de substratos de Ti-*cp*, utilizando eletrólito composto de 2% de HF. Porém neste estudo, a rugosidade micrométrica foi obtida pelo método de *pitting* eletroquímico. O titânio puro mostra notável resistência à corrosão em ambientes ácidos oxidantes em virtude de um filme passivo de óxido. No entanto, as superfícies de titânio são facilmente atacadas pelos elementos ou soluções de halogênio, como por exemplo solução de ácido fluorídrico (HF).

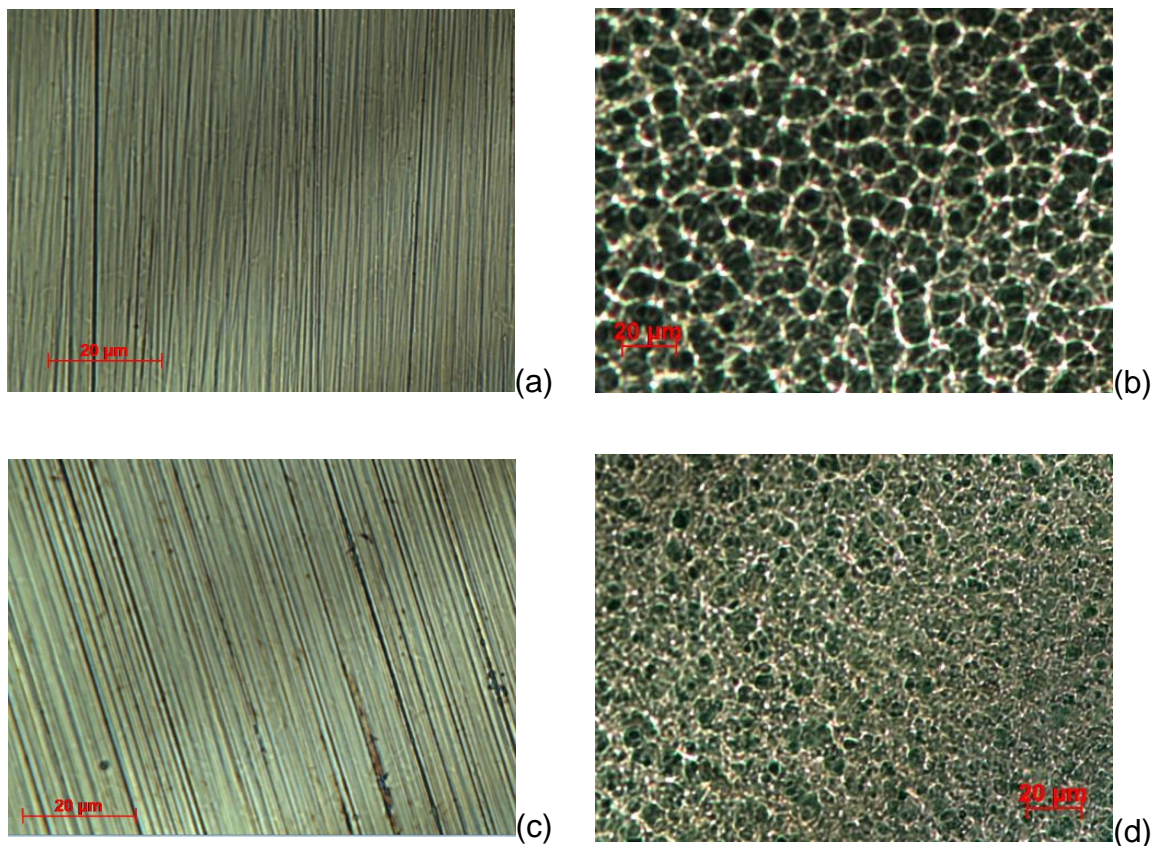


Figura 16. Imagens por microscopia óptica dos sistemas: (a) L#5000; (b) L#5000-EP; (c) L#5000-PP; e (d) L#5000-EP-PP.

As medições de rugosidade nanométrica obtidas (Tabela 4) pelas imagens obtidas por AFM, apresentam uma redução de Ra (29 ± 5 nm para 16 ± 3 nm) nas amostras lixadas (L#5000), comparativamente as amostras polimerizadas por plasma (L#5000-PP). Ao analisar o efeito da aplicação do filme oriundo da polimerização por plasma de TEOS sob a superfície nanotexturizada (L#5000-EP

versus L#5000-EP-PP), verificou-se uma redução na rugosidade dos valores Ra (13 ± 2 nm para 7 ± 2 nm). Novamente, a polimerização por plasma frio de TEOS sob a superfície nanotexturizada favoreceu a redução na rugosidade (Ra). A partir das imagens Figura 17-b e Figura 17-d observa-se que a deposição ocorreu em diferentes regiões e pontos da superfície. Viana et al. (2001) verificou que o aumento do fluxo de argônio no processo de polimerização por plasma frio, utilizando o TEOS como precursor, houve a redução da rugosidade média (Ra).

Tabela 4. Medidas de rugosidades média Ra (nm) por AFM.

Amostra	Ra (nm)
L#5000	29 ± 5
L#5000-EP	13 ± 2
L#5000-PP	16 ± 3
L#5000EP-PP	7 ± 2

Analisando o efeito do eletropolimento sobre a superfície lixada (L#5000 *versus* L#5000-EP) nas imagens obtidas por AFM (Figura 17 e Figura 18), os sulcos oriundos do polimento mecânico com o conjunto de lixas, desapareceram na amostra nanotexturizada (L#5000-EP), dando lugar às nanocavidades obtidas no tratamento eletroquímico por eletropolimento. Uma textura semelhante ao obtida nesse trabalho já havia sido visualizada por Antonini et al. (2016), como uma superfície nanoestruturada a partir do óxido formado durante o tratamento eletroquímico. Adicionalmente, o tratamento eletroquímico revelou um contorno de grão por ataque metalográfico. Antonini (2016) identificou as fases α (estrutura hexagonal) e β (estrutura cúbica de corpo centrado) por MEV-FEG. Tal figura da amostra nanotexturizada (L#5000-EP), observa-se superfície com contorno de grão. As diferenças no nivelamento da superfície podem estar associadas às fases que coexistem na liga Ti6Al4V, as quais estão identificadas na Figura 17b. Quanto às superfícies polimerizadas por plasma frio (Figura 17-c; Figura 17-d, Figura 18-c e Figura 18-d), observa-se agregados de polímeros depositados sobre a superfícies, provavelmente associada à deposição de TEOS através da técnica utilizada neste trabalho. Hwang et al. (2015) propuseram o mecanismo de deposição do filme

polimerizado por plasma. No estudo foi relacionado o tempo de deposição do filme com a alteração na rugosidade da superfície, pela formação de ilhas (agregados) de polímero posterior à formação de um filme contínuo, do qual foi elucidado pela redução da rugosidade a cada 15s da deposição do precursor de tiofeno.

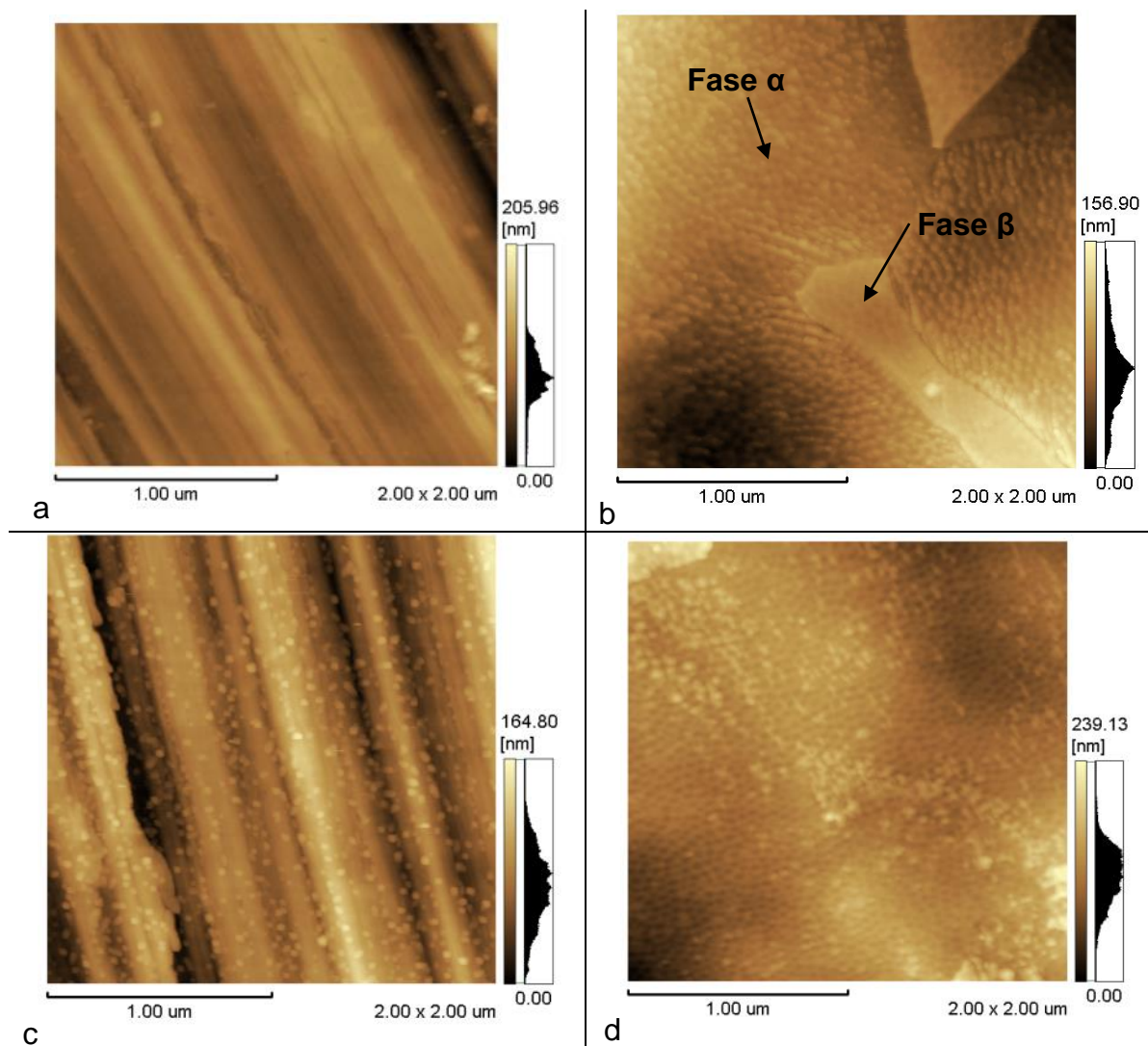


Figura 17. Imagens obtidas por AFM. Em (a) L#5000; em (b) L#5000-EP; em (c) L#5000-PP; em (d) L#5000-EP-PP.

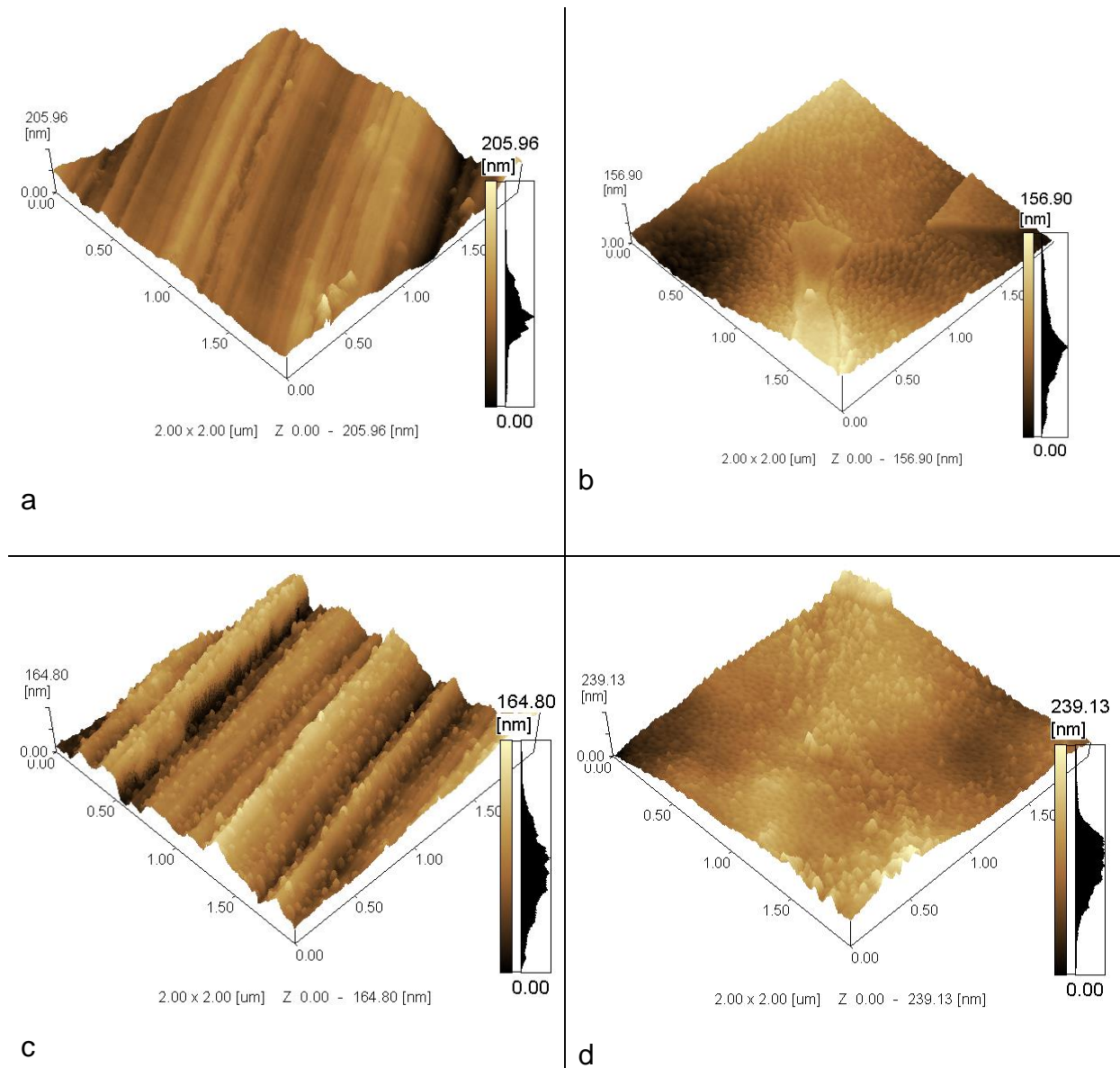


Figura 18. Imagens por AFM 3D. Em (a) L#5000; em (b) L#5000-EP; em (c) L#5000-PP; em (d) L#5000-EP-PP.

Bazaka et al. (2020) identificaram que o processo de polimerização a plasma frio (25°C; 150 mTorr; 10W RF; 10 min) utilizando precursor terpeno-4-ol, foi guiado pelas características topográficas em nanoescala. De acordo com os autores, as espécies obtidas pelo plasma começam a interagir preferencialmente nos picos da nanoestrutura, gerando uma carga superficial significativa. Isso pode levar à formação de um forte de campo elétrico semelhante a um dipolo, que aumenta o volume do fluxo de íons do plasma em direção à superfície. Tal distribuição do fluxo de íons resulta na deposição das espécies geradas no plasma, entre as ilhas de polímero já formadas (nucleadas), resultando no preenchimento gradual das lacunas e espaços vazios na superfície. Assim, o forte campo elétrico que é formado na

superfície em nanoescala promove a formação de um revestimento liso, uniforme em sua composição química e espessura e, por isso, apresentou o melhor desempenho antimicrobiano.

Quanto à análise de Elipsometria Espectral (Tabela 5) para a determinação das espessuras dos sistemas, os resultados mostram que houve modificações na superfície nanoestruturada evidenciadas pelas medições de espessura das camadas de óxido de titânio. Na obtenção de filmes contínuos formados a partir do precursor TEOS (analisados por XPS), há indicação que o eletropolimento favoreceu o aumento da espessura de camada do filme polimerizado por plasma, visto que, amostra lixada e polimerizada por plasma (L#5000-PP) apresentou espessura de $10 \pm 0,3$ nm, enquanto a amostra nanotexturizada e polimerizada a plasma (L#5000-EP-PP) obteve espessura de $23 \pm 0,1$ nm, indicando que o processo de nanotexturização contribuiu significativamente na deposição do filme. Isso pode estar associado ao preenchimento das nanocavidades, aumentando a espessura do filme. Aumaille et al. (2000) utilizaram TEOS aquecido (40°C), uma vez que o precursor possui uma baixa pressão de vapor (4 Torr) nas condições ambientais. Tal grupo obteve espessura de 50 nm em 1 min de polimerização por plasma, o que é superior à obtida neste trabalho.

Tabela 5. Medidas das espessuras das camadas pela técnica de Elipsometria Espectral (na tabela, R^2 se refere ao ajuste do modelo físico para o filme aos pontos experimentais).

Amostra	Espessura (nm)	R^2
L#5000	-	-
L#5000-EP	$5 \pm 0,2$	0,9988
L#5000-PP	$10 \pm 0,3$	0,9985
L#5000-EP-PP	$23 \pm 0,1$	0,9993

Quanto a amostra somente nanotexturizada (L#5000-EP), apresentou uma espessura de $5 \pm 0,2$ nm. Tal espessura estaria associada à camada de TiO_2 formada durante o tratamento eletroquímico de nanotexturização. E esse óxido de titânio obtido por eletropolimento foi reportado por Antonini et al. (2017). De acordo com Ask (1985), para uma superfície eletropolida de titânio, os valores característicos de rugosidade média (R_a) são menores que 10 nm, sendo que a espessura do óxido produzido na superfície é muito fina (< 5 nm), composta

principalmente de TiO₂. Tais valores estão próximos aos resultados encontrados neste trabalho.

A rugosidade micrométrica, determinada pelo Rugosímetro, foi analisada perpendicularmente aos sulcos nas amostras L#5000 e L#5000-PP. Os resultados dos quatro sistemas estão apresentados na Tabela 6. Observa-se que houve um aumento da rugosidade micrométrica com a aplicação do filme polimerizado por plasma sob as amostras nanotexturizadas (L#5000-EP *versus* L#5000-EP-PP). Tal comportamento pode estar relacionado a associação dos processos envolvidos, uma vez que a superfície nanotexturizada já é irregular devido a competição entre a dissolução anódica e o espessamento da camada de óxido durante a realização desse tratamento eletroquímico [Antonini, 2018], que aliada a posterior deposição do filme polimerizado pode tender a deposição regiões mais elevadas da superfície, o que predominantemente, atraem o processo de deposição, acarretando em valores mais altos de Ra em escala micrométrica. O aumento da rugosidade micrométrica com a deposição do filme sobre a amostra eletropolida pode estar associada a teoria de deposição por ilhas promovida pela superfície eletropolida, de acordo com o estudo de Bazaka et al. (2020) e Hwang et al. (2015).

Antonini et al (2017) verificou que a diferenciação e crescimento de células hESC-MPs em meio osteogênico foi fortemente influenciada pela microrugosidade da superfície, uma vez que ambos processos de polimento mecânico e eletropolimento apresentaram este comportamento.

Tabela 6. Medidas de rugosidade média (Ra) micrométrica através do rugosímetro.

Amostra	Ra (µm)
L#5000	0,1 ± 0,01
L#5000-EP	0,2 ± 0,01
L#5000-PP	0,1 ± 0,03
L#5000-EP-PP	0,3 ± 0,03

A morfologia da superfície dos quatro sistemas também foi avaliada através da técnica (MEV-EDS), conforme Figura 19 e Figura 20. Os sulcos gerados a partir do polimento mecânico (L#5000) deram lugar à uma superfície nanoestruturada (L#5000-EP e L#5000-EP-PP). Através da análise de MEV-EDS, foi possível

identificar a presença de Si, somente na amostra nanotexturizada com o filme (L#5000-EP-PP); o que pode estar associada à camada mais espessa da amostra nanotexturizada, comparada a amostra lixada com o filme (L#5000-PP), conforme verificada na Tabela 5.

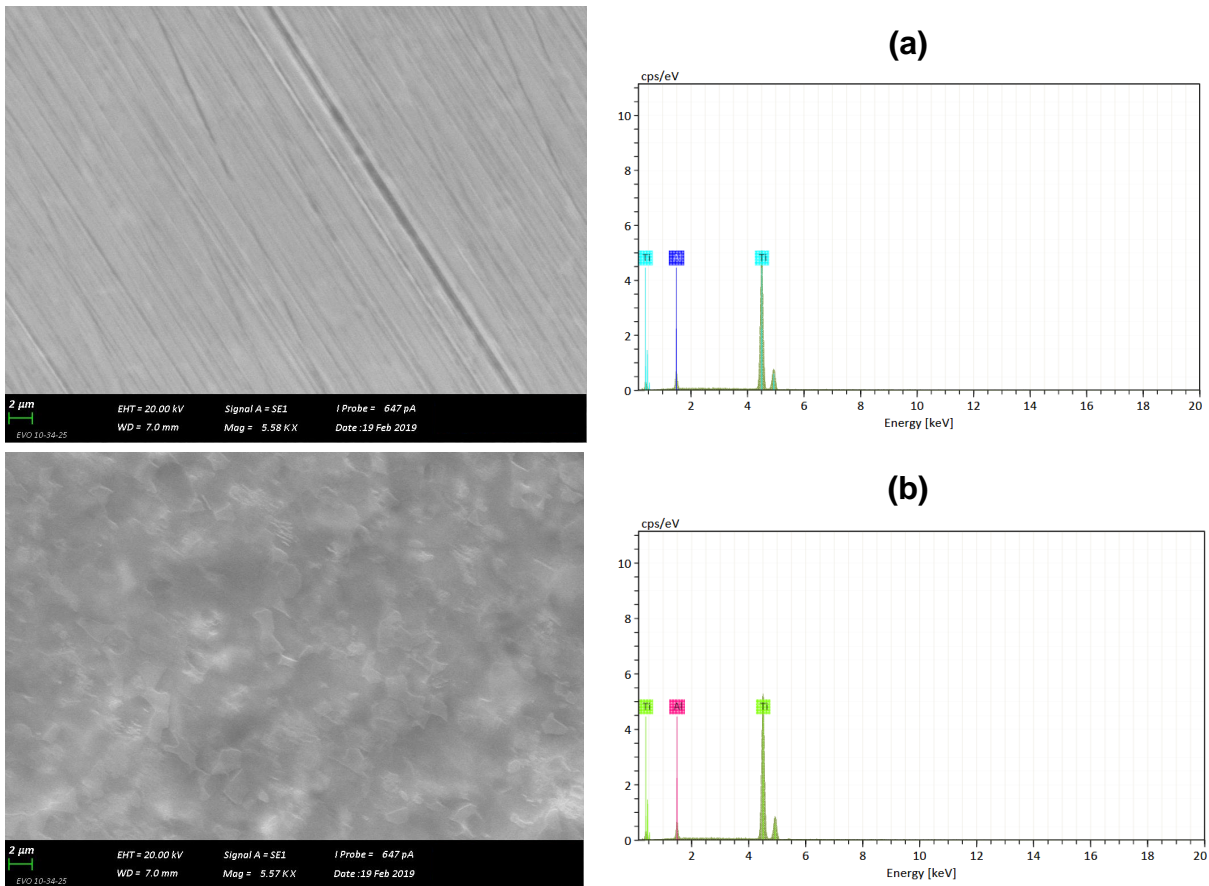


Figura 19. Imagens de MEV-EDS. Em (a) amostra lixada L#5000; em (b) a amostra nanotexturizada L#5000-EP

De acordo com os estudos de Zhang (2019), amostras de Ti6Al4V com 5 minutos de eletropolimento, os óxidos na superfície da liga foram principalmente óxido de titânio e óxido de alumínio, sendo que o óxido de vanádio quase não foi detectado, uma vez que as propriedades químicas do vanádio são estáveis e não são fáceis de serem oxidadas durante o eletropolimento. Dessa forma, na análise de MEV-EDS, tanto na superfície nanotexturizada (L#5000-EP e L#5000-EP-PP) quanto na lixada (L#5000 e L#5000-PP) foram encontrados somente os elementos Ti e Al da liga em estudo.

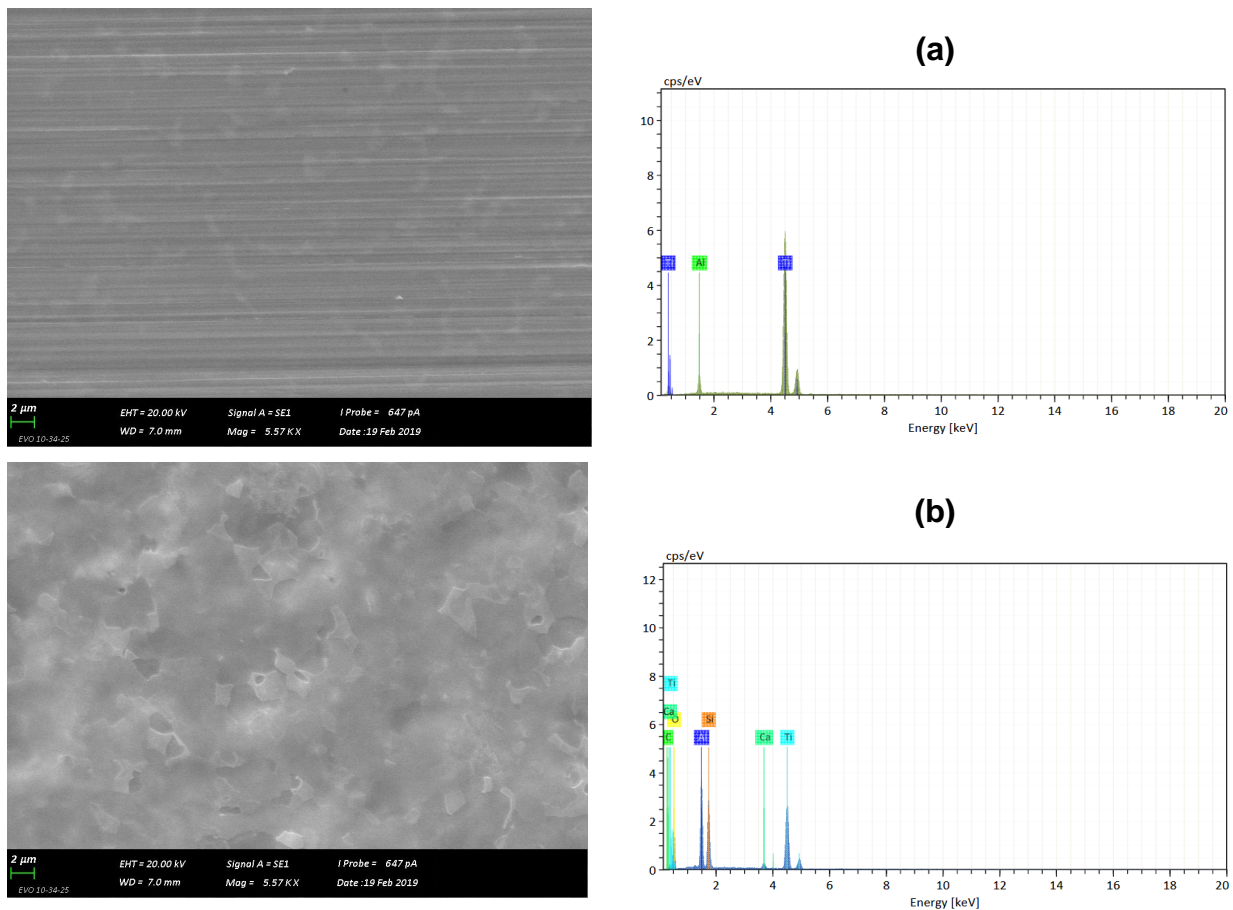


Figura 20. Imagens de MEV-EDS. Em (a) amostra lixada com a aplicação do filme polimerizado por plasma L#5000-PP; em (b) a amostra nanotexturizada com a aplicação do filme polimerizado por plasma L#5000-EP-PP.

Em contrapartida, nas amostras polimerizadas por plasma (L#5000-PP e L#5000-EP-PP) foram analisadas por XPS e identificado a presença dos elementos Ti, V, O, N, Si, Al nos espectros de Long Scan. A presença de V, Ti e Al pertencem a composição do substrato e os átomos de C e O provêm da exposição das amostras à atmosfera, além dos produtos formados durante a síntese dos filmes finos a partir de compostos orgânicos à base de silício. No entanto, o pico O1s em 532,6 eV está associado ao átomo de oxigênio da ligação Si-O-Si [Zouaughy, 2018].

Para o pico de V2p, Silversmit et al. (2004) no processo de deconvolução do sinal reportaram que o mesmo estaria associado aos óxidos de vanádio em V2p 3/2 (VO_2 , V_2O_3) e em V2p 1/2 (V_2O_3) além do óxido com estado de oxidação mais avançado V_2O_5 . Isso está associado à formação do óxido de vanádio oriunda da reação de oxidação do eletropolimento [Zhang, 2018]. Enquanto os picos Ti2s, Ti2p, Ti3s, Ti3p, O1s para TiO_2 , muito provavelmente indicam a presença de TiO_2 [Antonini 2017; Jain, 2014; Shchukarev, 2017; Yazdi, 2018]. Battocchio et al (2019),

analisou por XPS superfícies de Ti6Al4V decapadas com soluções a base de HCl e HF, tratadas com ácido cloroacético para promover o ancoramento de quitosana. No estudo, a atenuação do sinal do pico Ti2p em 458,5 eV foi atribuída pela imobilização da quitosana pelo pré-tratamento com ácido cloroacético. O pico C1s em 284,6 eV está relacionado à ligação hidrocarbônica oriunda da deposição do precursor TEOS [Shchukarev, 2017].

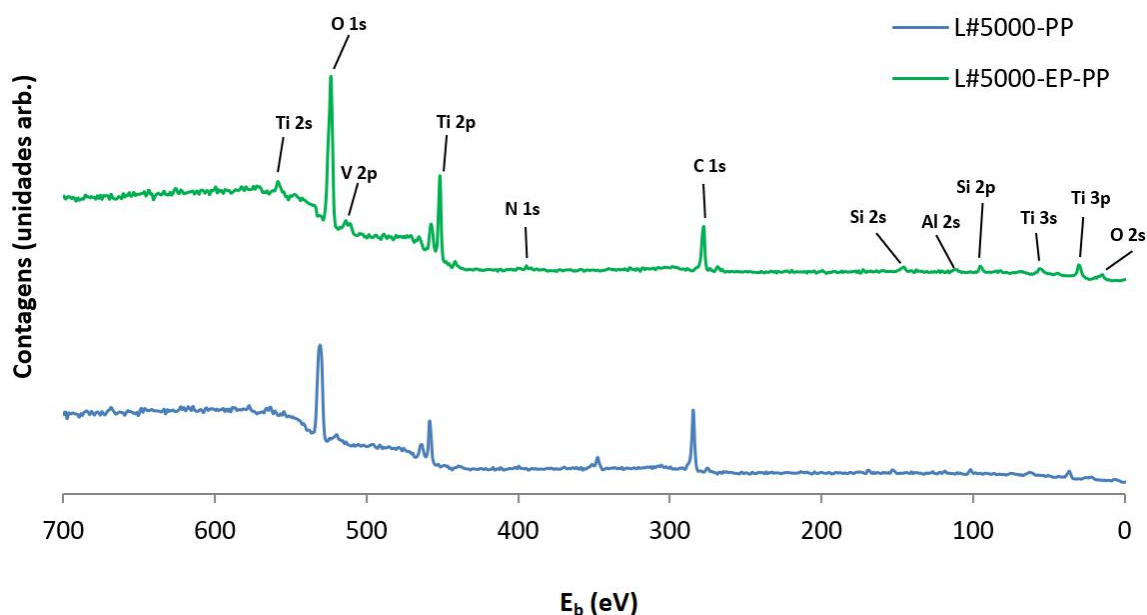


Figura 21. Análise de Long Scan de XPS, utilizando espectro fotoeletrônico em Al K α .

Com relação ao pico de O2s próximo de 20 eV, o mesmo pode ser reportado como o oxigênio da molécula O_{2(g)}, a qual pode ter ficado adsorvida na superfície do revestimento conforme também sugerido por Avval et al. (2019).

Na análise do espectro de XPS de Si2p de alta resolução (Figura 22), foi possível identificar a presença de um pico próximo a 101,8 eV nas amostras L#5000-PP e L#5000-EP-PP, associado ao organoxisilano [Zouaghi, 2018]. Além disso, pico em 103 eV (Si 2p) foi identificado como pela ligação Si-O (SixOy) [Macgregor, 2016]. Alguns autores [Keremidarska, 2018; Liu, 2014] relataram a formação de filmes finos de menor energia superficial para menores pressões de polimerização, aumentando o reticulado e melhorando as propriedades mecânicas do revestimento sintetizado.

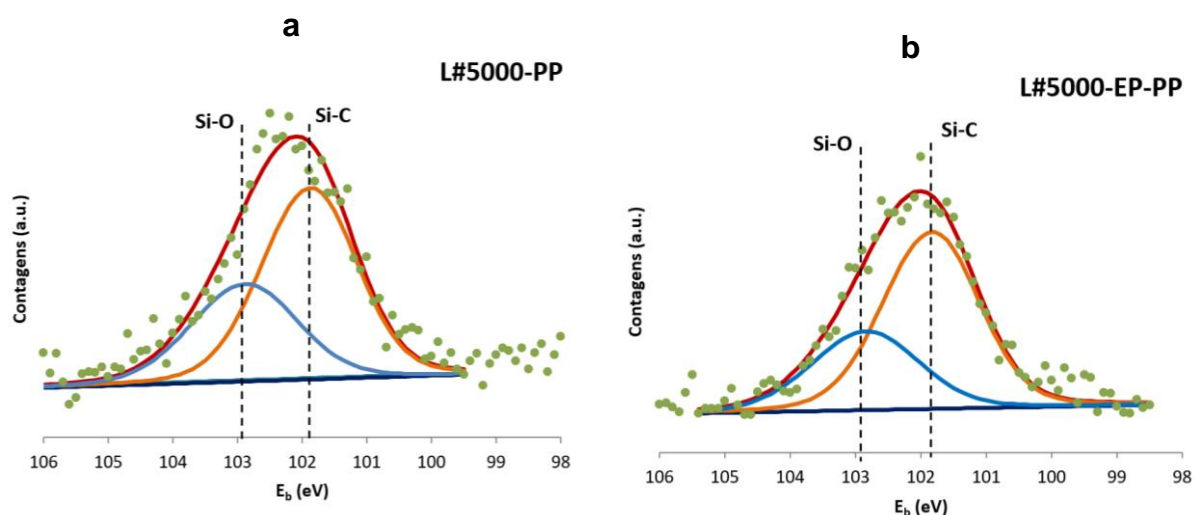


Figura 22. Espectro de XPS de alta resolução no pico de Si2p das amostras polymerizadas com TEOS. Em (a) amostra com o filme depositado a plasma sobre a amostra lixada e em (b) sobre a amostra nanoestruturada.

Com base nos resultados de XPS, dois mecanismos foram propostos: o primeiro baseado na formação de um produto principal da reação indicando a formação da ligação Si-O, que está relacionada ao grupamento siloxano (Figura 23) e o segundo propondo a formação do grupamento organo-oxsilano, como produto principal pela formação da ligação de Si-C (Figura 24).

Com base nas ligações apresentadas na análise de XPS (Figura 21), duas moléculas de TEOS reagem, uma das moléculas sofre o rompimento da ligação O-CH₂ e na outra molécula ocorre o rompimento da ligação Si-O, conforme mecanismo da Figura 23. Após o rompimento dessas ligações, são gerados centros reativos, ocorrendo a aproximação do grupo •Si-R₃ ao grupo •OSi-R₃ e ao mesmo tempo ocorre a união do grupo •O-CH₂-CH₃ ao grupo •CH₂-CH₃. Posteriormente há a formação do produto final da reação com a formação da ligação Si-O-Si (siloxano). A formação de produtos do processo de polimerização por plasma com o surgimento da ligação Si-O-Si também foi encontrada por Graeve et al. (2007), Kim et al. (2000) e Silva et al. (1997). Enquanto a ligação O-CH₂ associada ao subproduto CH₃-CH₂-O-CH₂-CH₃, conforme mostrado por Han et al. (2017) and Sharan et al. (2015).

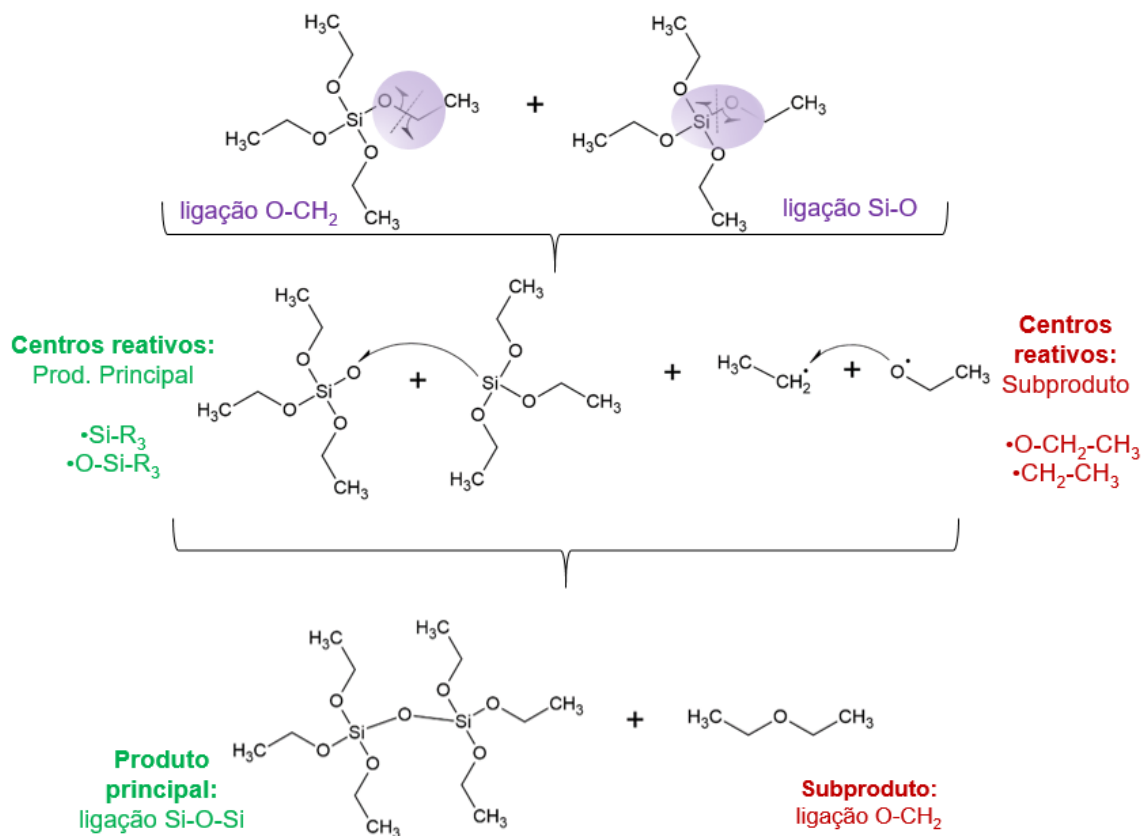


Figura 23. Mecanismo sugerido para a formação de siloxano, pela identificação da ligação Si-O na análise de XPS.

O segundo mecanismo de formação do filme por polimerização por plasma frio engloba inicialmente duas moléculas de TEOS que reagem (Figura 24). Uma das moléculas sofre o rompimento da ligação O-CH₂ e na outra molécula ocorre o rompimento da ligação Si-O. Após o rompimento dessas ligações e formação dos centros reativos, ocorre a aproximação do grupo $\cdot\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ao $\cdot\text{Si-R}_3$ e ao mesmo tempo ocorre a união do grupo $\cdot\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ ao grupo $\cdot\text{O-Si-R}_3$. Posteriormente há a formação do produto final com a formação da ligação Si-C, conforme observado na Figura 24. Já a ligação Si-O do subproduto da reação também pode ser evidenciada na Figura 24, justificando a formação da ligação Si-O durante o processo de polimerização em baixas pressões (230 μatm).

Neste trabalho, acredita-se que mecanismo da Figura 24 esteja predominantemente ocorrendo durante o processo de polimerização por plasma, uma vez que o pico da ligação Si-C é mais intenso do que o pico da ligação Si-O.

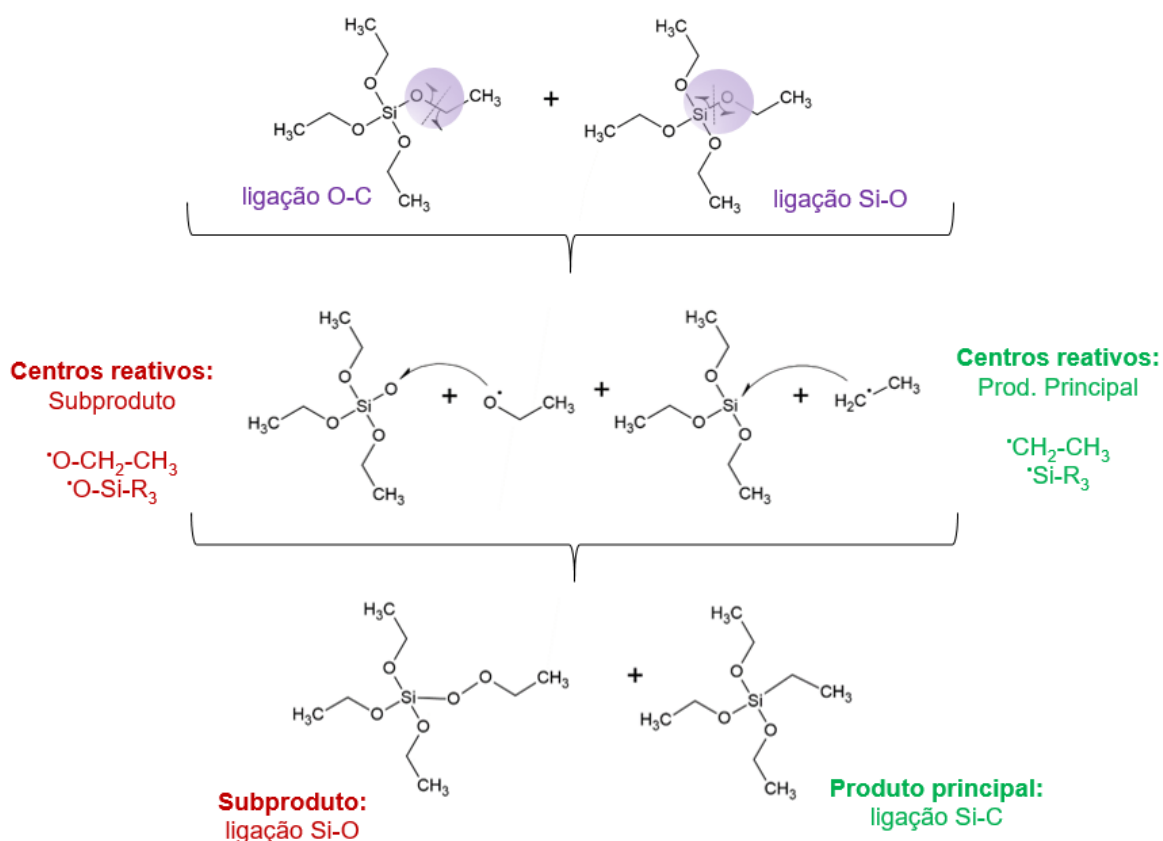


Figura 24. Mecanismo sugerido para formação de organo-oxisilano, pela identificação da ligação Si-C por XPS.

Segundo Firouzjah et al. (2013) há dois mecanismos para dissociação de moléculas de TEOS pelo processo de polimerização por plasma, há o mecanismo de oxidação e o mecanismo de dissociação por impacto de elétrons. O grupo ainda destaca que quando há concentração de oxigênio durante a polimerização, o mecanismo de oxidação é dominante durante a dissociação de moléculas de TEOS. Os fragmentos de TEOS que consistem em grupos alquil são adsorvidos sobre o substrato e ligações cruzadas de Si-O-Si são formadas sobre o substrato pela reação desses fragmentos com outros fragmentos. Átomos de oxigênio excitados e íons ajudam na remoção dos ligantes a partir de fragmentos adsorvidos sobre a superfície e melhoram a formação das ligações Si-O-Si. Processos de polimerização por plasma com argônio, conforme o que foi realizado nesse trabalho de pesquisa vão de acordo com o que foi mostrado pelos autores, os quais destacam que a presença de argônio aumenta o processo de ionização e diminui o processo de oxidação. Os autores destacam que aumentando a concentração de argônio, diminui

a incidência do mecanismo de oxidação com o aumento do mecanismo de impacto dos elétrons.

Conforme mostrado por Chung et al. (2009) e Teshima et al. (2003) além de ligações Si-O-Si formadas pelo processo de polimerização, pode aparecer SiO₂ formado a partir TEOS mesmo sem fonte de oxigênio, uma vez que átomos de Si podem ser oxidados. De acordo com Kim et al. (2000), átomos de oxigênio excitados (íons O₂⁺) lideram a formação de ligações Si-O-Si e conseqüentemente o crescimento do filme.

A partir dos valores obtidos para o ângulo de contato com água e solução de Hanks em interação com as superfícies de estudo (Figura 25), foi possível observar uma redução significativa do ângulo nas superfícies com o filme depositado (L#5000 versus L#5000-PP) e (L#5000-EP versus L#5000-EP-PP), ou seja um aumento da molhabilidade em ambas as soluções utilizadas. Essa maior molhabilidade pode estar associada à deposição do filme por polimerização por plasma frio, uma vez que a estrutura do precursor promove um caráter polar ao revestimento, o que acarreta numa maior interação com a água e fluidos aquosos, e portanto a superfície se torna mais hidrofílica. Observou-se também, que o eletropolimento não teve efeito significativo para a redução do ângulo de contato (L#5000 versus L#5000-EP), tanto em Hanks quanto em água. Strnad et al. (2016) encontrou valores semelhantes (82°) para amostras tratadas com jato de areia de SiO₂ de 250 a 300 µm, apesar da diferença dos processos de produção das superfícies. As amostras passivadas com 30% de HNO₃ após decaapagem, apresentaram ângulos de contato em torno de 61° processo semelhante ao eletropolimento, considerando também a remoção de parte da superfície. Panjwani et al (2012), obtiveram ângulo de contato em 73° para a mesma liga de titânio, a partir de polimento mecânico com lixas de SiC seguidas de pasta de diamante, o qual este último processo pode ter contribuído para o ângulo ser mais baixo que o encontrado na amostra L#5000.

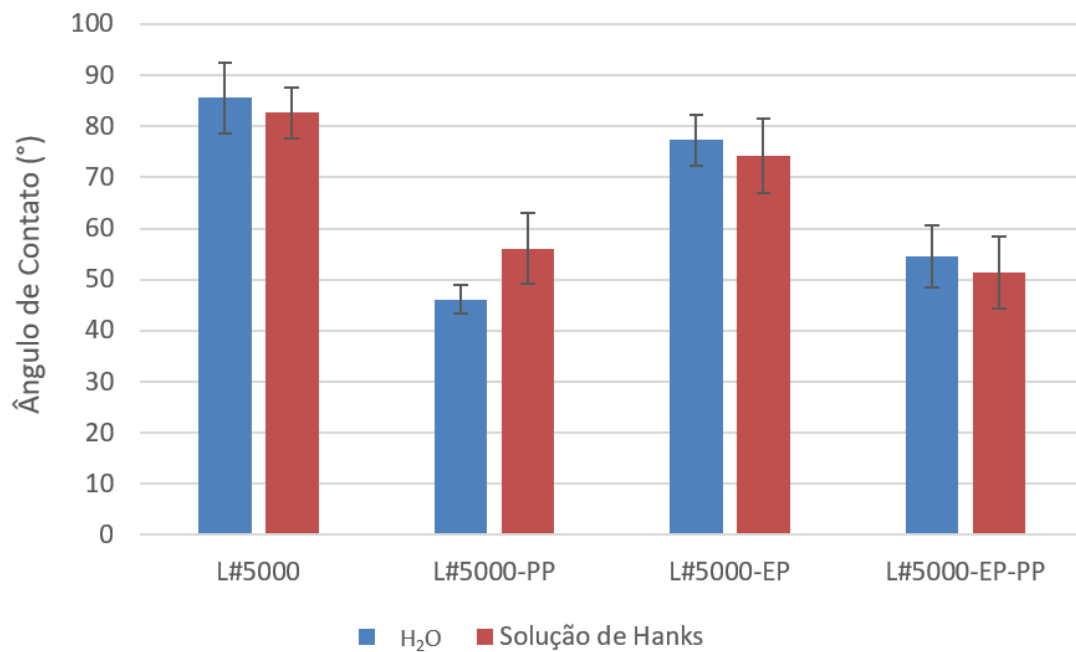


Figura 25. Medidas de ângulo de contato em H₂O e Solução Hanks avaliada por *one-way* ANOVA com $p < 0,05$.

A partir dos valores de OCP (potencial e circuito aberto), a mudança de OCP na direção de potenciais menos ativos, comparando a amostra L#5000 com a amostra L#5000-EP (Figura 26), sugere que a formação de um filme de óxido gerado pelo eletropolimento atuou como barreira no processo de dissolução, indicando que o eletropolimento contribuiu para uma superfície menos ativa quando em contato com a solução de Hanks. Zhang et al. (2019) observou que o aumento do tempo do eletropolimento, aumenta o potencial de corrosão. Quanto à influência da deposição do revestimento por plasma, pode ser observada, ao se comparar os valores de OCP obtidos para a amostra somente lixada (L#5000) com a amostra lixada e polimerizada por plasma (L#5000-PP), uma diferença de aproximadamente 500 mV para potenciais mais positivos quando a superfície se encontra revestida, demonstrando que a presença do filme atua como uma barreira, que conseqüentemente, dificulta a interação do eletrólito com o substrato metálico. Essa mesma diferença de potencial não foi observada entre as amostras nanotexturizadas com e sem o filme obtido por polimerização por plasma, sendo possível concluir que a realização do eletropolimento promove a formação de uma camada de óxido, conforme já reportado por Antonini et al. (2017) e que gerou menor influência sobre os valores de OCP após polimerização por plasma.

A partir dos resultados obtidos por polarização linear (Figura 27), novamente se evidenciou que a superfície lixada polimerizada por plasma (L#5000-PP) apresentou potencial de corrosão mais nobre e valores menores de densidade de corrente do que a amostra somente lixada (L#5000), indicando que o revestimento obtido por polimerização por plasma contribuiu positivamente para o aumento da resistência a corrosão. No entanto, foi observado que as amostras nanotexturizadas, os valores de densidade de corrente e dos potenciais de corrosão foram muito próximos para as amostras com e sem revestimento, demonstrando novamente a menor influência da deposição do filme quando aplicado sobre uma superfície nanotexturizada sobre as respostas eletroquímicas dos sistemas avaliados.

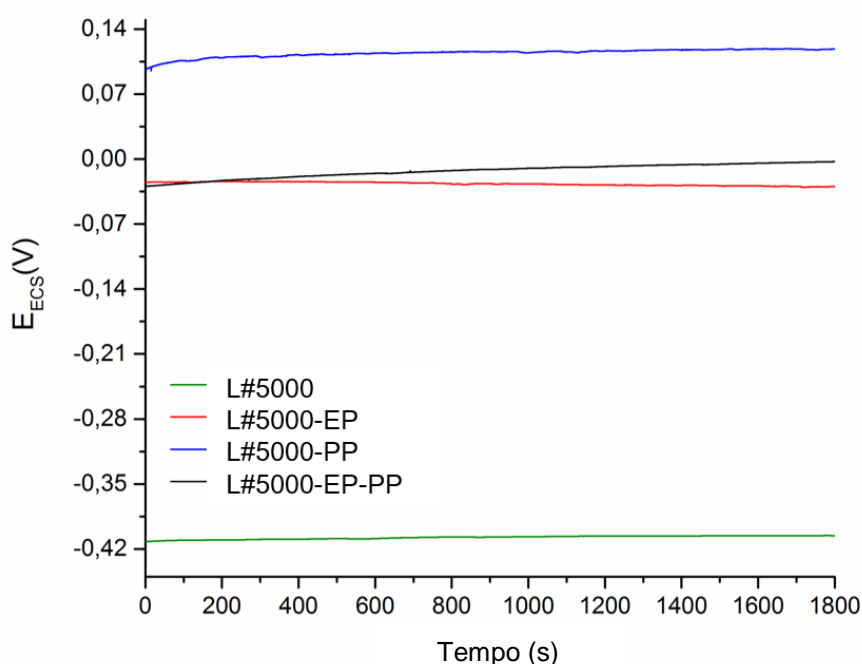


Figura 26. Potencial de circuito aberto (OCP) das amostras em estudo.

Pelos resultados de polarização linear (Figura 27) confirmou-se o superior potencial eletroquímico apresentado pela superfície polimerizada a lixada (L#5000-PP), uma vez que essa amostra apresentou potencial de corrosão mais nobre e valores menores de densidade de corrente, indicando o aumento da resistência a corrosão pela presença do revestimento. Conforme mostrado por Batan et al. (2010) e Palanivel et al. (2003), filmes de silano depositados por polimerização por plasma frio apresentam forte adesão a superfícies metálicas, o que promove um aumento da sua resistência à corrosão. Para Batan et al. (2010), a proteção à corrosão que

filmes de silano depositados em metais por polimerização por plasma frio podem estar associados a formação de um filme com ligações cruzadas, que atua como uma barreira física entre o substrato e o ambiente agressivo, reduzindo o número de caminhos os quais espécies agressivas possam penetrar. Isso vai de acordo com Prikryl et al. (2003), que também chamou atenção de que filmes de silano depositados por plasma são revestimentos para proteção à corrosão, uma vez que apresentam ramificações, ligações altamente cruzadas e insolúveis. Conforme mostrado por Graeve et al. (2007), a presença de ligação Si-O-Si no filme polimerizado é o resultado de reações de condensação entre moléculas do silano e o substrato metálico, resultando num aumento de ligações cruzadas, o que conseqüentemente aumenta a propriedade barreira contra a hidratação e corrosão do substrato. Vale destacar, que a formação dessas ligações foi sugerida na proposta de mecanismo (Figura 23) da formação do filme a partir de TEOS, conforme pode ser observado no produto principal da reação.

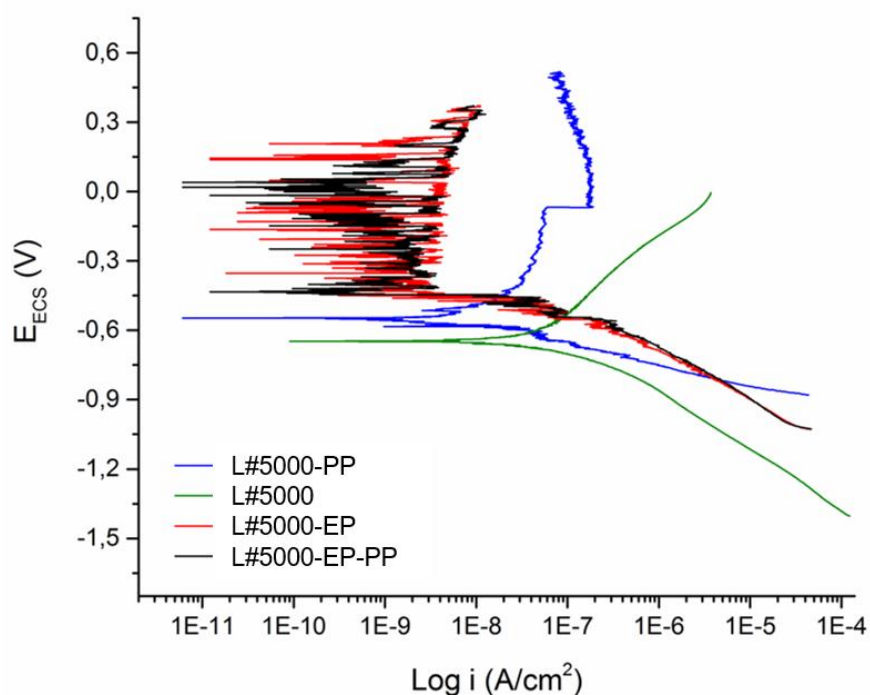


Figura 27. Curvas de polarização linear das amostras em estudo. A polarização linear ocorreu na faixa de -1000 mV até +400 mV em relação ao OCP, na velocidade de varredura de 1mV/s em solução de Hanks.

Pelas imagens obtidas das amostras antes (Figura 28) e após (Figura 29) a realização dos ensaios eletroquímicos por polarização linear, observou-se que superfície lixada (L#5000) apresentou a formação uma região em destaque, que

pode estar relacionada com a reação do eletrólito com o filme passivo de TiO_2 , formado naturalmente quando em contato com o ar. Para a amostra somente nanotexturizada (L#5000-EP) após o ensaio observou-se somente a presença de partículas sobre a superfície em análise, muito provavelmente relacionadas a retenção de sais do eletrólito sob a camada de óxido. Para os filmes finos obtidos por polimerização por plasma frio, sobre a superfície lixada (L#5000-PP) não foram evidenciadas modificações superficiais após o ensaio de polarização, porém sobre a superfície nanotexturizada (L#5000-EP-PP) ainda que em menor quantidade, evidenciou-se novamente a presença de sais presentes no eletrólito utilizado no ensaio eletroquímico. Isso pode estar associado que o filme depositado a partir de TEOS conferiu uma maior proteção à superfície da liga, a qual o sistema L#5000-PP apresentou potenciais mais positivos em relação as outras amostras.

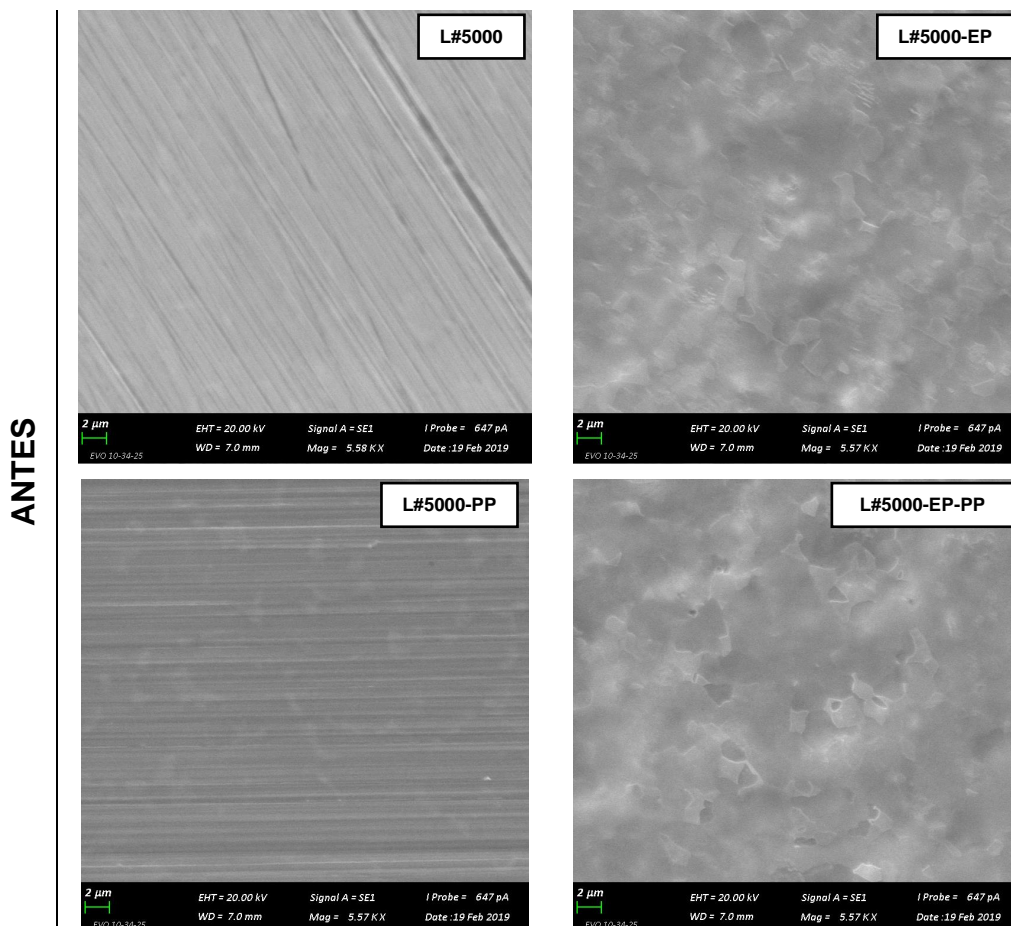


Figura 28. Imagens de MEV antes ensaio de polarização linear.

DEPOIS

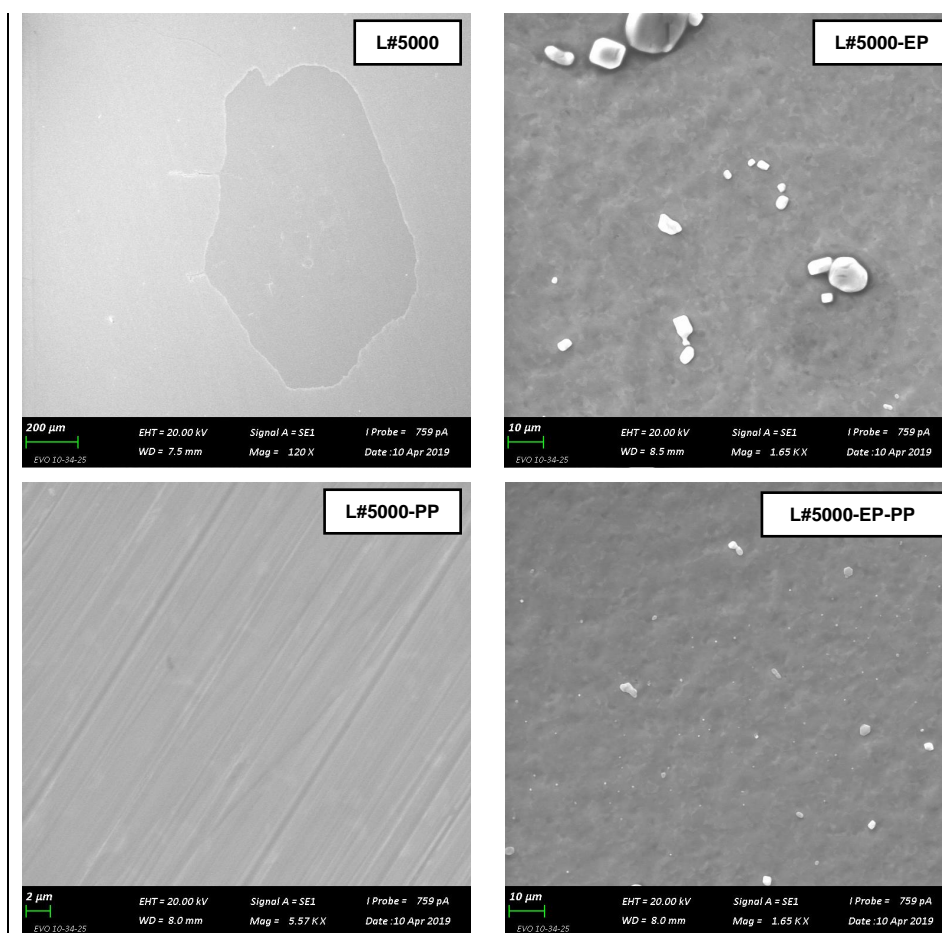


Figura 29. Imagens de MEV após ensaio de polarização linear.

Em virtude deste trabalho ter aplicação biomédica, se fez necessário o estudo da superfície desenvolvida quanto a sua resposta biológica, utilizando células tronco mesenquimais *in vitro*. No ensaio de atividade mitocondrial (Figura 30), a análise de variância ANOVA não detectou diferença estatística entre os grupos experimentais ($p = 0.0858$). Esses resultados indicam que as superfícies não afetaram a viabilidade das células-tronco. Os resultados do MTT apresentados na Figura 30 e as imagens dos núcleos celulares corados por DAPI, as células-tronco vivas marcadas por FDA e mortas marcadas por PI na Figura 31, mostraram uma similaridade no número de células nas diferentes amostras. Bao et al. (2018) apresentaram em seu estudo, que uma topografia superficial com rugosidade micrométrica e texturizada tende a promover um maior crescimento de células-tronco em virtude da presença de sítios de adesão celular. Em nosso estudo, foi possível observar apenas uma tendência de maior quantidade de SHED no grupo lixado (L#5000 e L#5000-PP).

Por outro lado, na avaliação pelo teste t ($p < 0,05$) comparando as amostras polidas mecanicamente (L#5000) e as amostras polimerizada por plasma a frio (L#5000-PP), demonstraram maior número de células-tronco viáveis que as amostras nanotexturizadas e polimerizada por plasma a frio (L#5000-EP-PP) conforme Figura 31. Conforme mostrado por Alba et al. (2020), filmes polimerizados por plasma a Ar, além de serem filmes de espessura nanométrica, tendem a seguir a topografia do substrato metálico. Neste trabalho acredita-se que as irregularidades do lixamento mecânico presentes nas amostras L#5000-PP, permaneceram abaixo do filme polimerizado por plasma. Essas superfícies (L#5000 e L#5000-PP) provavelmente favoreceram o ancoramento das células-tronco nas superfícies, uma vez que ambos grupos experimentais apresentam similar absorvância correlacionada ao número de SHEDs viáveis ($p = 0.2783$).

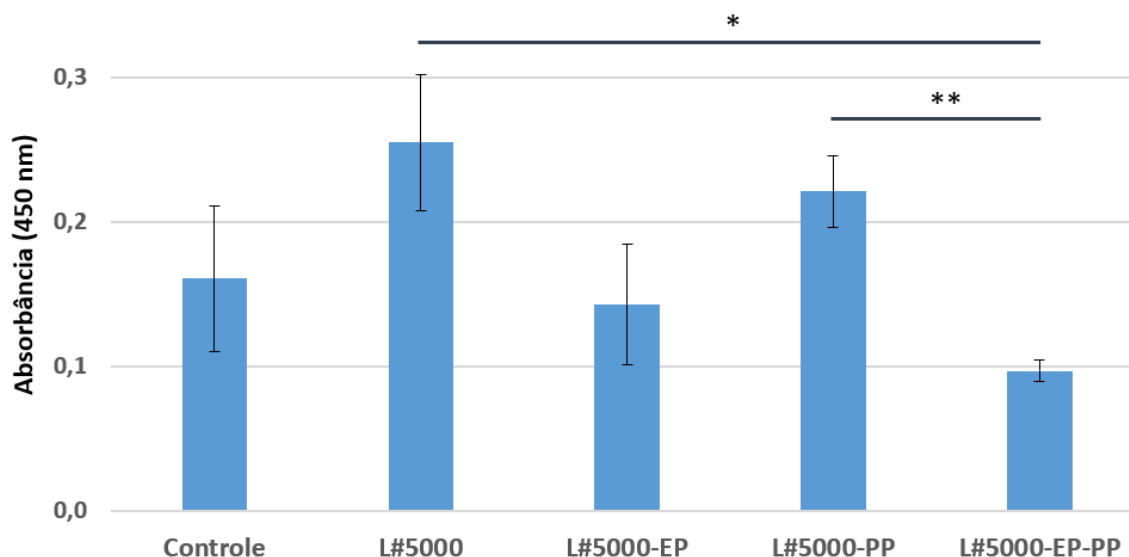


Figura 30. Viabilidade celular de células-tronco mesenquimais depositadas superfícies polimerização por plasma frio. Os dados expressos como média da absorvância \pm erro padrão da média por meio do teste MTT. Resultados * $p = 0,039$ e ** $p = 0,0044$, foram considerados estatisticamente significativos.

Pela técnica de análise de fluorescência, foi possível verificar a disposição das alterações morfológicas celulares, as quais estão de acordo com as análises mencionadas por Zhang et al. (2015); Sharma et al. (2016). Observou-se uma determinada orientação para as amostras L#5000 e L#5000-PP, conforme Figura 31, provavelmente induzida pela topografia proveniente da preparação mecânica. Nas superfícies nanoestruturadas, L#5000-EP e L#5000-EP-PP as células-tronco

apresentaram disposição desorientada durante o cultivo celular, similar a placa de cultura utilizada como controle. De acordo com Ortiz et al. (2018), células-tronco tem maior afinidade para ancoramento em superfícies com ranhuras com largura entre elas de 15 μm .

Com base nos ensaios biológicos utilizados neste trabalho, entre as duas amostras de maior absorvância, observa-se que a combinação dos processos de polimento mecânico e a deposição do filme (L#5000-PP) induziu a orientação celular em uma única direção, como também, reduziu a presença de células mortas dentro do período de estudo. As superfícies nanotexturizadas com e sem o filme, provocaram uma desordem na aderência celular. Nos estudos de Rebl et al (2012), foi observado que a combinação das ranhuras com a deposição de colágeno por polimerização por plasma frio promoveu o espalhamento das células do tipo MG-63. No entanto, concluíram que o alinhamento da célula devido a topografia pode ser superado se uma superfície tiver sido modificada via plasma, de forma eficiente. Kearns et al. (2013) observaram que a deposição de nano-fibras sobre a superfície de titânio orientou a deposição de fibroblastos gengivais, os quais secretaram colágeno no mesmo sentido das fibras.

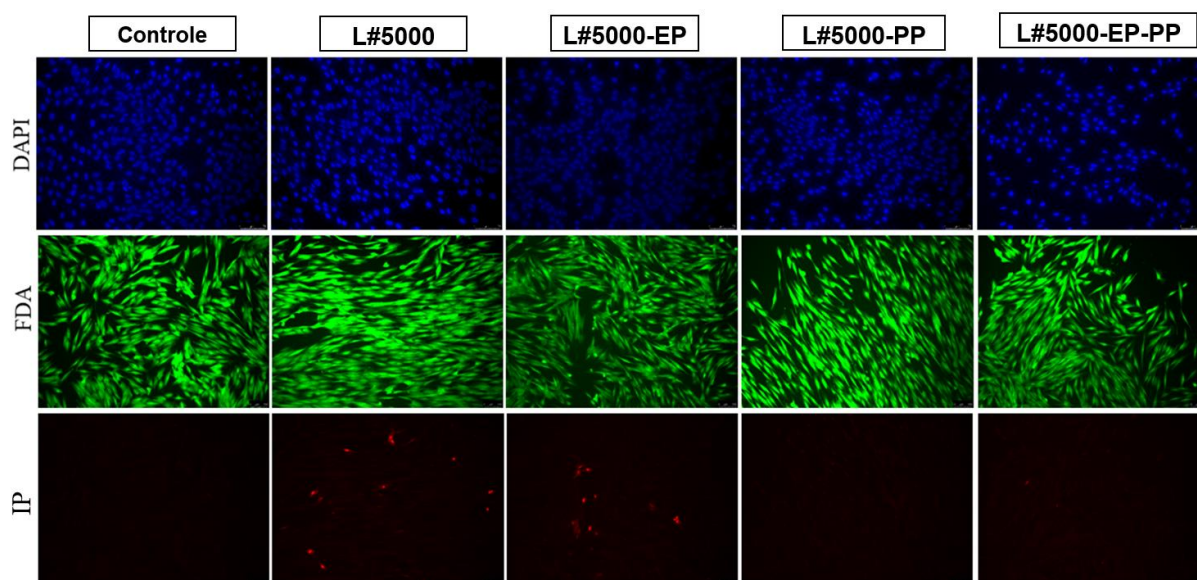


Figura 31. Microscopia de fluorescência com imagens representativas dos núcleos das células marcados em azul (marcado com DAPI), as células viáveis em verde (marcado com FDA) e não viáveis em vermelho (marcados com IP) nos diferentes grupos experimentais após 24 de cultura.

6. Conclusão

O processo de polimerização por plasma frio utilizando o precursor TEOS foi capaz de resultar na deposição de um filme de Si sobre o substrato Ti6Al4V, com a formação de ligações predominantemente Si-O e de Si-C.

Nesse estudo foram sugeridos dois mecanismos prováveis para a formação do filme por polimerização por plasma frio sobre a superfície Ti6Al4V. O primeiro propõe a formação do grupamento siloxano. A segunda teoria do mecanismo é a mais provável que tenha ocorrido, uma vez que ligações Si-C apareceram mais na superfície do que as ligações Si-O.

O filme polimerizado sobre a superfície nanoestruturada apresentou a mesma composição química do filme polimerizado sobre a superfície lixada, indicando que o processo de nanoestruturação não contribuiu para alguma modificação na composição química.

A amostra nanotexturizada com filme polimerizado por plasma apresentou caráter mais hidrofílico do que a amostra somente nanotexturizada, esse comportamento pode estar associado a presença de oxigênio na composição química do filme polimerizado, o que conseqüentemente, pode estar favorecendo a formação de pontes de hidrogênio com a água, aumentando a molhabilidade da superfície.

A nanotexturização da superfície contribuiu para o aumento da espessura do filme depositado por polimerização por plasma frio, o que pode estar associado à formação de um forte de campo elétrico semelhante a um dipolo gerado nesta superfície, que aumentaria o fluxo de íons do plasma em direção à superfície nanotexturizada, resultando na deposição das espécies geradas no plasma.

O revestimento obtido por polimerização por plasma frio contribuiu para a obtenção de uma superfície menos ativa, uma vez que foram alcançados valores menores de densidade de corrente na varredura anódica para essas as amostras, comparativamente as amostras lixadas e nanotexturizada que não receberam esse tratamento superficial.

As amostras lixadas com e sem o filme depositado por polimerização por plasma frio apresentaram tendência de um maior número de células viáveis, pelos resultados de absorvância avaliados pelo teste t. Assim como, as amostras lixadas e polimerizadas por plasma frio apresentaram maior número de células-tronco viáveis do que a superfície nanoestruturada e polimerizada por plasma. As irregularidades provenientes do polimento mecânico associadas com o filme fino obtido por polimerização por plasma frio podem ter contribuído para a manutenção da viabilidade celular, o que pode estar relacionado com a capacidade que as células-tronco têm de se ancorar nos sulcos provenientes da preparação mecânica.

7. Trabalhos Publicados

Participação em congresso:

PEREIRA, Mireli Pandolfo; ANTONINI, Leonardo Marasca; PEREIRA, Marcelo Barbalho; MALFATTI, Célia de Fraga. Efeito da Polimerização por Plasma sobre a Morfologia e Propriedades Físico-Químicas de Superfícies Nanoestruturadas de Ti6Al4V. In: SEMINÁRIO DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - INOVTEC, 7º Edição, 2018, Sapucaia do Sul - RS. **Anais**. Sapucaia do Sul: IFSul, 2018. p. 493-505.

Artigo publicado:

PEREIRA, Mireli; BALDIN, Estela Kerstner; ANTONINI, Leonardo Marasca; BERNARDI, Fabiano; OLIVEIRA, Luiza; MAURNANN, Natasha; PRANKE, Patricia; MALFATTI, Célia de Fraga. TEOS thin films obtained by plasma polymerization on Ti6Al4V alloys: influence of the deposition pressure on surface properties and cellular response. **Applied Surface Science Advances**, v. 5, n. 100123, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100123>

8. Trabalhos futuros

Como sugestões de trabalhos futuros, propõem-se:

- Manter o precursor TEOS aquecido durante o processo de polimerização por plasma frio.
- Realizar a limpeza por plasma nas superfícies lixada e nanotexturizada anterior ao processo de polimerização por plasma a frio.
- Avaliar as propriedades morfológicas e físico-químicas dos filmes obtidos em diferentes tempos de deposição durante a polimerização por plasma frio.
- Quantificar pela técnica de ICP-OES, o teor de metais liberados pelas amostras nanotexturizadas em fluido corpóreo, para avaliar a capacidade protetiva das camadas de óxido dos metais da liga, bem como a influência da polimerização por plasma a frio a partir do precursor TEOS.

9. Referências Bibliográficas

ABBASI-FIROUZJAH, Marzieh; HOSSEINI, Seyed-Iman; SHARIAT, Mahdi; SHOKRI, Babak. The effect of TEOS plasma parameters on the silicon dioxide deposition mechanisms. **Journal Of Non-Crystalline Solids**, [S.L.], v. 368, p. 86-92, 2013.

ALBA-PEREZ, Andres; JAYAWARNA, Vineetha; CHILDS, Peter G.; DALBY, Matthew J.; SALMERON-SANCHEZ, Manuel. Plasma polymerised nanoscale coatings of controlled thickness for efficient solid-phase presentation of growth factors. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 113, p. 110966, 2020.

ANAND, Venu; THOMAS, Rajesh; RAMAN, Thulasi; GOWRAVARAM, Mohan Rao. Plasma-Induced Polymeric Coatings. In: THOMAS, Sabu; MOZETIČ, Miran; CVELBAR, Uroš; IPATENKA, Petr; K.M., Praveen. **Non-Thermal Plasma Technology for Polymeric Materials**: applications in composites, nanostructured materials and biomedical fields. Cap. 5. p. 129-157, 2019

ANNUNZIATA, Marco; GUIDA, Luigi. The Effect of Titanium Surface Modifications on Dental Implant Osseointegration. **Biomaterials For Oral And Craniomaxillofacial Applications**, Itália, p. 62-77, 2015.

ANTONINI, Leonardo Marasca. Superfícies nanoestruturais de titânio e tratamento superficial com filmes Diamond Like Carbon (DLC). [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.

ANTONINI, Leonardo Marasca. **Avaliação do efeito de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V na indução da osteogênese de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea murina**. 2016. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia dos Materiais, Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2016.

ANTONINI, Leonardo Marasca; KOTHE, Vinícius; REILLY, Gwendolen C.; OWEN, Robert; MARCUZZO, Jossano Saldanha; MALFATTI, Célia de Fraga. Effect of Ti6Al4V surface morphology on the osteogenic differentiation of human embryonic stem cells. **Journal Of Materials Research**, [S.L.], v. 32, n. 20, p. 3811-3821, 26 out. 2017.

ANTONINI, Leonardo Marasca; MALFATTI, Célia de Fraga; REILLY, Gwendolen C.; OWEN, Robert; TAKIMI, Antonio Shigueaki. Effect of sterilization processes on nanostructured Ti6Al4V surfaces obtained by electropolishing. **Journal Of Materials Research**, Brasil, v. 34, n. 08, p. 1439-1446, 26 fev. 2019.

ANTONINI, Leonardo Marasca; SANTOS JUNIOR, Adilar Gonçalves dos; REILLY, Gwendolen; MALFATTI, Célia de Fraga. Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Progenitor (hESCs-MP) Growth on Nanostructured Ti6Al4V Surfaces. **Materials Research**, v. 21, n. 5, p. 1-10, 2018.

AROLKAR, Gauree A.; JACOB, Salgo M.; PANDIYARAJ, Krishnasamy N.; KELKAR-MANE, Varsha R.; DESHMUKH, Rajendra R.. Effect of TEOS plasma polymerization on corn starch/poly(ϵ -caprolactone) film: characterization, properties and biodegradation. **Rsc Advances**, Coimbatore, v. 6, n. 20, p. 16779-16789, 2016.

ASK, M. Surface Characterization of Oxide Films on Ti6Al4V Alloy. Tese de doutorado. Departamento de Física, Gotemburgo, Suécia; 1985.

ASRI, R.I.M.; HARUN, W.s.W.; SAMYKANO, M.; LAH, N.A.C.; GHANI, S.A.C.; TARLOCHAN, F.; RAZA, M.R.. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: a review. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 77, p. 1261-1274, 2017.

ASTM B348-13: **Standard specification for titanium and titanium alloy bars and billets.**

AUMAILLE, K.; VALLÉE, C.; GRANIER, A.; GOULLET, A.; GABORIAU, F.; TURBAN, G.. A comparative study of oxygen/organosilicon plasmas and thin SiO_xCyHz films deposited in a helicon reactor. **Thin Solid Films**, França, v. 359, n. 2, p. 188-196, 2000.

AVVAL, Tahereh G.; CHATTERJEE, Shiladitya; HODGES, Grant T.; BAHR, Stephan; DIETRICH, Paul; MEYER, Michael; THIBEN, Andreas; LINFORD, Matthew R.. Oxygen gas, O₂(g), by near-ambient pressure XPS. **Surface Science Spectra**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 014021, 2019.

BAGNO, Andrea; BELLO, Carlos di. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, S.L, v. 15, p. 935-949, 2004.

BANDYOPADHYAY, Amit; ESPANA, Felix; BALLA, Vamsi Krishna; BOSE, Susmita; OHGAMI, Yusuke; DAVIES, Neal M.. Influence of porosity on mechanical properties and in vivo response of Ti6Al4V implants. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1640-1648, abr. 2010.

BAO, Min; XIE, Jing; HUCK, Wilhelm T. S.. Recent Advances in Engineering the Stem Cell Microniche in 3D. **Advanced Science**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 1800448, 2018.

BATAN, A.; BRUSCIOTTI, F.; GRAEVE, I. de; VEREECKEN, J.; WENKIN, M.; PIENS, M.; PIREAUX, J.J.; RENIERS, F.; TERRYN, H.. Comparison between wet deposition and plasma deposition of silane coatings on aluminium. **Progress In Organic Coatings**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 126-132, 2010.

BATTOCCHIO, Chiara; CONCOLATO, Sofia; SANTIS, Serena de; FAHLMAN, Mats; IUCCI, Giovanna; SANTI, Marta; SOTGIU, Giovanni; ORSINI, Monica. Chitosan functionalization of titanium and Ti6Al4V alloy with chloroacetic acid as linker agent. **Materials Science and Engineering: C**, [S.L.], v. 99, p. 1133-1140, 2019.

BAUER, Sebastian; SCHMUKI, Patrik; MARK, Klaus von Der; PARK, Jung. Engineering biocompatible implant surfaces. **Progress In Materials Science**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 261-326, 2013.

BAZAKA, Olha; BAZAKA, Kateryna; TRUONG, VI Khanh; LEVCHENKO, Igor; JACOB, Mohan V.; ESTRIN, Yuri; LAPOVOK, Rimma; CHICHKOV, Boris; FADEEVA, Elena; KINGSHOTT, Peter. Effect of titanium surface topography on plasma deposition of antibacterial polymer coatings. **Applied Surface Science**, Melbourne, v. 521, p. 146375, 2020.

BEAMUD, E.M.; NÓÑEZ, P.J.; GARCÍA-PLAZA, E.; RODRÍGUEZ, D.; GONZÁLEZ, A.; GARCÍA, J.. Impact of electrolyte concentration on surface gloss in electropolished stainless steel. **Procedia Manufacturing**, [S.L.], v. 13, p. 663-670, 2017.

BERNARDI, Lisiane; LUISI, Simone Bonato; FERNANDES, Raquel; DALBERTO, Tiago Pires; VALENTIM, Lauren; CHIES, José Artur Bogo; FOSSATI, Anna Christina Medeiros; PRANKE, Patricia. The Isolation of Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp Is Related

to the Physiological Process of Resorption. **Journal Of Endodontics**, [S.L.], v. 37, n. 7, p. 973-979, 2011.

BOSE, Susmita; BANDYOPADHYAY Amit. Introduction to Biomaterials. In: Bose, Susmita; Bandyopadhyay Amit. **Characterization of Biomaterials** EUA: 1. ed. p. 1-9, 2013.

BOYAN, Barbara D; LOHMANN, Christoph H; DEAN, David D; SYLVIA, Victor L; COCHRAN, David L; SCHWARTZ, Zvi. Mechanisms Involved in Osteoblast Response to Implant Surface Morphology. **Annual Review Of Materials Research**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 357-371, 2001.

BROWNE, M; GREGSON, P.J. Effect of mechanical surface pretreatment on metal ion release. **Biomaterials**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 385-392, fev. 2000.

BURKARTER, Ezequiel. **Construção de Imagens por Padrões Hidrofóbico/Hidrofílico**. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Física, Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

BUSSEY, Dawn; PERINA, Vratislav; JONES, Frank R.; CECH, Vladimir. Effect of chemical modification on the mechanical properties of plasma-polymerized organosilicones. **Progress In Organic Coatings**, [S.L.], v. 119, p. 85-90, 2018.

CARVALHO, R.A.M.; LIMA, R.R.; NASCIMENTO FILHO, A.P.; SILVA, M.L.P.; DEMARQUETTE, N.R.. Plasma polymerized TEOS films for nanochannels formation and sensor development. **Sensors And Actuators B: Chemical**, São Paulo, v. 108, n. 1-2, p. 955-963, 2005.

CASTNER, David G.; RATNER, Buddy D. Biomedical surface science: foundations to frontiers. **Surface Science**, [S.L.], v. 500, n. 1-3, p. 28-60, 2002.

CHEN, Jiali; WANG, Jinwei; YUAN, Hongye. Morphology and performances of the anodic oxide films on Ti6Al4V alloy formed in alkaline-silicate electrolyte with aminopropyl silane addition under low potential. **Applied Surface Science**, [S.L.], v. 284, p. 900-906, 2013.

CHEN, Lina; YAN, Casey; ZHENG, Zijian. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. **Materials Today**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 38-59, 2018.

CHEUNG, Keng Ho; PABBRUWE, Moreica Beatrice; CHEN, Wen-Fan; KOSHY, Pramod; SORRELL, Charles Christopher. Effects of substrate preparation on TiO₂ morphology and topography during anodization of biomedical Ti6Al4V. **Materials Chemistry And Physics**, [S.L.], v. 252, p. 1-13, 2020.

CHUNG, T.H.; KANG, M.s.; CHUNG, C.J.; KIM, Y. Effects of process parameters on the properties of silicon oxide films using plasma enhanced chemical vapor deposition with tetramethoxysilane. **Current Applied Physics**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 598-604, 2009.

DOMINICI, M.; BLANC, K. Le; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C; KRAUSE, D.s.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DORR LD, Bloebaum R, Emmanuel J, Meldrum R. Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1990; 261:82_95.

ELIAS, Carlos Nelson; FERNANDES, Daniel Jogaib; SOUZA, Francielly Moura de; MONTEIRO, Emília dos Santos; BIASI, Ronaldo Sérgio de. Mechanical and clinical properties of titanium and titanium-based alloys (Ti G2, Ti G4 cold worked nanostructured and Ti G5) for biomedical applications. **Journal Of Materials Research And Technology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1060-1069, 2019.

ELIAS, Carlos Nelson; MEIRELLES, Luiz. Improving osseointegration of dental implants. **Expert Review Of Medical Devices**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 241-256, 2010.

GARBACZ, Halina *et al.* **Nanocrystalline Titanium**: biological properties. Polônia: p. 277, 2019.

GERCHMAN, D.; BONES, B.; PEREIRA, M.B.; TAKIMI, A.S. Thin film deposition by plasma polymerization using d-limonene as a renewable precursor. **Progress In Organic Coatings**, [S.L.], v. 129, p. 133-139, 2019.

GITTENS, Rolando A.; MCLACHLAN, Taylor; OLIVARES-NAVARRETE, Rene; CAI, Ye; BERNER, Simon; TANNENBAUM, Rina; SCHWARTZ, Zvi; SANDHAGE, Kenneth H.; BOYAN, Barbara D. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. **Biomaterials**, [S.L.], v. 32, n. 13, p. 3395-3403, 2011.

GRAEVE, I. de; VEREECKEN, J.; FRANQUET, A.; VAN SCHAFTINGHEN, T.; TERRY, H.. Silane coating of metal substrates: complementary use of electrochemical, optical and thermal analysis for the evaluation of film properties. **Progress In Organic Coatings**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 224-229, 2007.

GRANIER, A; VERVLOET, M; AUMAILLE, K; VALLEE, C. Optical emission spectra of TEOS and HMDSO derived plasmas used for thin film deposition. **Plasma Sources Science And Technology**, França, v. 12, p. 89-96, 2003.

HAN, Wei; FANG, Fengzhou. Fundamental aspects and recent developments in electropolishing. **International Journal Of Machine Tools And Manufacture**, [S.L.], v. 139, p. 1-23, abr. 2019.

HARVEY, Alison G; HILL, Ernie W; BAYAT, Ardeshir. Designing implant surface topography for improved biocompatibility. **Expert Review Of Medical Devices**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 257-267, 2013.

HENCH Larry L.; BEST Serena. Ceramics, Glasses and Glass-Ceramics. In: RATNER, Buddy D.; HOFFMAN, Allan S.; SCHOEN, Frederick J.; LEMONS, Jack E. **Biomaterials Science**: an introduction to materials in medicine. 2° ed. EUA, p. 155-170, 2004.

HOERSTRUP Simon P.; VACANTI Joseph P. Overview of Tissue Engineering. In: RATNER, Buddy D.; HOFFMAN, Allan S.; SCHOEN, Frederick J.; LEMONS, Jack E. **Biomaterials Science**: an introduction to materials in medicine. 2° ed., p. 712-728, 2004.

HOERSTRUP, SIMON P.; LU, Lichun; LYSAGHT, Michael J.; MIKOS, Antonios G.; REIN, David; SCHOEN, Frederick J.; TEMENOFF, Johnna S.; TESSMAR, Joerg K.; and VACANTI, Joseph P. Tissue Engineering. In: RATNER, Buddy D.; HOFFMAN, Allan S.; SCHOEN, Frederick J.; LEMONS, Jack E. **Biomaterials Science**: an introduction to materials in medicine. 2° ed. EUA, p. 709-712, 2004.

HWANG, Sukyoung; SEO, Hosung; JEONG, Dong-Cheol; WEN, Long; HAN, Jeon Geon; SONG, Changsik; KIM, Yunseok. Growth kinetics of plasma-polymerized films. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 11201-1 11201-4, 2015.

IVLEV, Ilya; VACEK, Jakub; KNEPPO, Peter. Multi-criteria decision analysis for supporting the selection of medical devices under uncertainty. **European Journal Of Operational Research**, [S.L.], v. 247, n. 1, p. 216-228, 2015.

JAIN, N.; ZHU, Y.; MAURYA, D.; VARGHESE, R.; PRIYA, S.; HUDAIT, M. K.. Interfacial band alignment and structural properties of nanoscale TiO₂ thin films for integration with epitaxial crystallographic oriented germanium. **Journal Of Applied Physics**, [S.L.], v. 115, n. 2, p. 024303-1 - 024303-8, 2014.

KABIR, Humayun; NASRIN, Rahima; RAHMAN, M. Mahbubur; BHUIYAN, A.H.. Heat treatment effect on the structural, morphological, and optical properties of plasma polymerized furan-2-carbaldehyde thin films. **Results In Physics**, [S.L.], v. 16, p. 103014, 2020.

KASALKOVA, Nikola Slepickova; SLEPICKA, Petr; KOLSKA, Zdenka; SVORCIK, Vaclav. Wettability and Other Surface Properties of Modified Polymers. In: ALIOFKHAZRAEI, Mahmood. **Wetting and Wettability**. Iran: Intechopen, 2015. Cap. 12. p. 323-356.

KEARNS, Victoria R; WILLIAMS, Rachel L.; MIRVAKILY, Felora; DOHERTY, Patrick J.; MARTIN, Nicolas. Guided gingival fibroblast attachment to titanium surfaces: an in vitro study. **Journal Of Clinical Periodontology**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 99-108, 2012.

KEREMIDARSKA, Markova, Milena; RADEVA, Ekaterina; MITEV, Dimitar; HRISTOVA-PANUSHEVA, Kamelia; PAULL, Brett; NESTERENKO, Pavel; SEPITKA, Josef; JUNKAR, Ita; IGLIC, Ales; KRASTEVA, Natalia. Increased elastic modulus of plasma polymer coatings reinforced with detonation nanodiamond particles improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Turkish Journal Of Biology**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 195-203, 27 abr. 2018.

KIM, Min Tae. Deposition kinetics of silicon dioxide from tetraethylorthosilicate by PECVD. **Thin Solid Films**, Coreia do Sul, v. 360, n. 1-2, p. 60-68, 2000.

KUBO, Katsutoshi; TSUKIMURA, Naoki; IWASA, Fuminori; UENO, Takeshi; SARUWATARI, Lei; AITA, Hideki; CHIOU, Wen-An; OGAWA, Takahiro. Cellular behavior on TiO₂ nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. **Biomaterials**, [S.L.], v. 30, n. 29, p. 5319-5329, 2009.

KULKARNI, Mukta et al. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. **Nanomedicine**, v. 111, p. 111, 2014.

KULKARNI, Mukta; PATIL-SEN, Yogita; JUNKAR, Ita; KULKARNI, Chandrashekhar V.; LORENZETTI, Martina; IGLIČ, Aleš. Wettability studies of topologically distinct titanium surfaces. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, Slovenia, v. 129, p. 47-53, 2015.

LAMOLLE, Sébastien F.; MONJO, Marta; RUBERT, Marina; HAUGEN, Håvard J.; LYGSTADAAS, Ståle P.; ELLINGSEN, Jan E.. The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. **Biomaterials**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 736-742, 2009.

LAUSMAA, Jukka. Mechanical, Thermal, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium. In: BRUNETTE, Donald M.; TENGVALL, Pentti; TEXTOR, Marcus; THOMSEN,

Peter. **Titanium in Medicine**: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications. Inglaterra, p. 231-266, 2001.

LIU, X; CHU, P; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science And Engineering**: R, [S.L.], v. 47, n. 3-4, p. 49-121, 2004.

LIU, Xujie; FENG, Qingling; BACHHUKA, Akash; VASILEV, Krasimir. Surface Modification by Allylamine Plasma Polymerization Promotes Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 9733-9741, 2014.

LOPES, Cátia S. D.; DONATO, Mariana T.; RAMGI, P.. Comparative Corrosion Behaviour of Titanium Alloys (Ti-15Mo and Ti-6Al-4V) for Dental Implants Applications: a review. **Corrosão e Protecção de Materiais**, [S.L.], n. 35, p. 5-14, 2016.

MACGREGOR, Melanie; VASILEV, Krasimir. Plasma Polymer Deposition: A Versatile Tool for Stem Cell Research. In: TIWARI, Ashutosh; GARIPCAN, Bora; UZUN, Lokman. **Advanced Surfaces for Stem Cell Research**. Eua, Cap. 8. p. 199-232, 2016.

MANOJ, T.P.; RASITHA, T.P.; VANITHAKUMARI, S.C.; ANANDKUMAR, B.; GEORGE, R.P.; PHILIP, John. A simple, rapid and single step method for fabricating superhydrophobic titanium surfaces with improved water bouncing and self-cleaning properties. **Applied Surface Science**, [S.L.], v. 512, p. 145636, 2020.

MARTÍNEZ-IBÁÑEZ, M.; JUAN-DÍAZ, M. J.; LARA-SAEZ, I.; COSO, A.; FRANCO, J.; GURRUCHAGA, M.; ANTÓN, J. Suay; GOÑI, Isabel. Biological characterization of a new silicon based coating developed for dental implants. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, Nova York, v. 27, n. 4, p. 1-9, 2016.

MATLOSZ, Michael. Modeling of impedance mechanisms in electropolishing. **Electrochimica Acta**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 393-401, 1995.

MAURMANN, Natasha; PEREIRA, Daniela P; BURGUEZ, Daniela; PEREIRA, Frederico D A de s; INFORÇATTI NETO, Paulo; A REZENDE, Rodrigo; GAMBA, Douglas; SILVA, Jorge V L da; PRANKE, Patricia. 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**, [S.L.], v. 3, n. 4, 045005, 2017.

MISHNAEVSKY, Leon; LEVASHOV, Evgeny; VALIEV, Ruslan Z.; SEGURADO, Javier; SABIROV, Ilchat; ENIKEEV, Nariman; PROKOSHKIN, Sergey; SOLOV'YOV, Andrey V.; KOROTITSKIY, Andrey; GUTMANAS, Elazar. Nanostructured titanium-based materials for medical implants: modeling and development. **Materials Science And Engineering**: R, [S.L.], v. 81, p. 1-19, 2014.

NEUPANE, Madhav P. et al. Synthesis and morphology of TiO₂ nanotubes by anodic oxidation using surfactant based fluorinated electrolyte. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 158, n. 8, 2011.

NISOL, B.; OLDENHOVE, G.; PREYAT, N.; MONTEYNE, D.; MOSER, M.; PEREZ-MORGA, D.; RENIERS, F.. Atmospheric plasma synthesized PEG coatings: non-fouling biomaterials showing protein and cell repulsion. **Surface And Coatings Technology**, [S.L.], v. 252, p. 126-133, 2014.

ORTIZ, Rocio et al. Laser surface microstructuring of a bio-resorbable polymer to anchor stem cells, control adipocyte morphology, and promote osteogenesis. **Polymers**, v. 10, n. 12, 2018.

OSHIDA, Yoshiki. Materials Classification. In: OSHIDA, Yoshiki. **Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials**. Inglaterra: Elsevier, 2° ed. Cap. 2. p. 9-34, 2013.

OSHIDA, Yoshiki. Oxidation and Oxides. In: OSHIDA, Yoshiki. **Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials**. Inglaterra: Elsevier, 2° ed. Cap. 4. p. 87-115, 2013.

PALANIVEL, Vignesh; ZHU, Danqing; VAN OOIJ, Wim J. Nanoparticle-filled silane films as chromate replacements for aluminum alloys. **Progress In Organic Coatings**, [S.L.], v. 47, n. 3-4, p. 384-392, 2003.

PANJWANI, Bharat; SINHA, Sujeet.K.. Tribology and hydrophobicity of a biocompatible GPTMS/PFPE coating on Ti6Al4V surfaces. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, Singapura, v. 15, p. 103-111, 2012.

PIDWIRNY, M. Atmospheric Composition. **Fundamentals of Physical Geography**, 2nd Edition, 2006.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M.. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Química Nova**, Campinas-Sp, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PRIKRYL, R.; CECH, V.; BALKOVA, R.; VANEK, J.. Functional interlayers in multiphase materials. **Surface And Coatings Technology**, [S.L.], v. 174-175, p. 858-862, 2003.

PUCKETT, Sabrina D.; TAYLOR, Erik; RAIMONDO, Theresa; WEBSTER, Thomas J.. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. **Biomaterials**, EUA, v. 31, n. 4, p. 706-713, 2010.

RAGHAVENDRA, Gownolla Malegowd; VARAPRASAD, Kokkarachedu; JAYARAMUDU, Tippabattini. BIOMATERIALS: design, development and biomedical applications. In: THOMAS, Sabu; GROHENS, Yves; NINAN, Neethu. **Nanotechnology Applications for Tissue Engineering**. Eua, p. 21-44, 2015.

RATNER, Buddy D. Surface Properties and Surface Characterization of Materials. In: RATNER, Buddy D.; HOFFMAN, Allan S.; SCHOEN, Frederick J.; LEMONS, Jack E.. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. 2° ed. Eua p. 40-58, 2004.

RATNER, Buddy D. The Biocompatibility of Implant Materials. In: BADYLAK, Stephen. **Host Response to Biomaterials**. Seattle: Elsevier, 2015. Cap. 3. p. 37-51.

REBL, Henrike; FINKE, Birgit; LANGE, Regina; WELTMANN, Klaus-Dieter; NEBE, J. Barbara. Impact of plasma chemistry versus titanium surface topography on osteoblast orientation. **Acta Biomaterialia**, Alemanha, v. 8, n. 10, p. 3840-3851, 2012.

ROY, Poulomi; BERGER, Steffen; SCHMUKI, Patrik. TiO₂ Nanotubes: synthesis and applications. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 50, n. 13, p. 2904-2939, 2011.

SHARAN, Chandrashekhar; KHANDELWAL, Puneet; PODDAR, Pankaj. The mechanistic insight into the biomilling of goethite (α -FeO(OH)) nanorods using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 5, n. 111, p. 91785-91794, 2015.

SHARMA, Shaily; BANO, Subia; GHOSH, Anindya S.; MANDAL, Mahitosh; KIM, Hae-Won; DEY, Tuli; KUNDU, Subhas. C. Silk fibroin nanoparticles support in vitro sustained antibiotic release and osteogenesis on titanium surface. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1193-1204, 2016.

SHCHUKAREV, Andrey; MALEKZADEH, Behnosh Öhrnell; RANSJÖ, Maria; TENGVALL, Pentti; WESTERLUND, Anna. Surface characterization of insulin-coated Ti6Al4V medical implants conditioned in cell culture medium: an xps study. **Journal Of Electron Spectroscopy And Related Phenomena**, [S.L.], v. 216, p. 33-38, 2017.

SHEIKH, Zeeshan; BROOKS, Patricia; BARZILAY, Oriyah; FINE, Noah; GLOGAUER, Michael. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. **Materials**, Toronto, v. 8, n. 9, p. 5671-5701, 2015.

SILVA, Maria L.P. da; RIVEROS, José.. A comparative study of gas-phase ion/molecule reactions in $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ and $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$. **International Journal Of Mass Spectrometry And Ion Processes**, [S.L.], v. 165-166, p. 83-95, 1997.

SILVERSMIT, Geert; DEPLA, Diederik; POELMAN, Hilde; MARIN, Guy B.; GRYSE, Roger de. Determination of the V2p XPS binding energies for different vanadium oxidation states (V5+ to V0+). **Journal Of Electron Spectroscopy And Related Phenomena**, [S.L.], v. 135, n. 2-3, p. 167-175, 2004.

SIQUEIRA, Renato L.; MAURMANN, Natasha; BURGUÊZ, Daniela; PEREIRA, Daniela P.; RASTELLI, Alessandra N.s.; PEITL, Oscar; PRANKE, Patricia; ZANOTTO, Edgar D.. Bioactive gel-glasses with distinctly different compositions: bioactivity, viability of stem cells and antibiofilm effect against streptococcus mutans. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 76, p. 233-241, 2017.

SITTIG, C.; TEXTOR, M.; SPENCER, N. D.; WIELAND, M.; VALLOTTON, P. -H.. Surface characterization of implant materials c.p. Ti, Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V with different pretreatments. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 35-46, 1999. Springer Science and Business Media LLC.

STRNAD, Gabriela; CHIRILA, Nicolae; PETROVAN, Cecilia; RUSSU, Octav. Contact Angle Measurement on Medical Implant Titanium Based Biomaterials. **Procedia Technology**, [S.L.], v. 22, p. 946-953, 2016.

SZILI, Endre J.; KUMAR, Sunil; SMART, Roger St. C.; VOELCKER, Nicolas H.. Generation of a stable surface concentration of amino groups on silica coated onto titanium substrates by the plasma enhanced chemical vapour deposition method. **Applied Surface Science**, [S.L.], v. 255, n. 15, p. 6846-6850, 2009.

TATHE, Amogh; GHODKE, Mangesh; NIKALJE, Anna Pratima. A BRIEF REVIEW: BIOMATERIALS AND THEIR APPLICATION. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 19-23, 2010.

TENGVALL, Pentti; LUNDSTROM, Ingemar. Physico-chemical considerations of titanium as biomaterial. **Clinical Materials**, Suécia, v. 9, p. 115-134, 1992.

TESHIMA, Katsuya; INOUE, Yasushi; SUGIMURA, Hiroyuki; TAKAI, Osamu. Synthesis of silica films on a polymeric material by plasma-enhanced CVD using tetramethoxysilane. **Surface And Coatings Technology**, [S.L.], v. 169-170, p. 583-586, jun. 2003.

THIRY, Damien; KONSTANTINIDIS, Stephanos; CORNIL, Jérôme; SNYDERS, Rony. Plasma diagnostics for the low-pressure plasma polymerization process: a critical review. **Thin Solid Films**, [S.L.], v. 606, p. 19-44, 2016.

THIRY, Damien; VINX, Nathan; APARICIO, Fancisco Javier; MOERMAN, David; LAZZARONI, Roberto; COSSEMENT, Damien; SNYDERS, Rony. An innovative approach for micro/nano structuring plasma polymer films. **Thin Solid Films**, [S.L.], v. 672, p. 26-32, 2019.

TRIZIO, Ilaria; TRULLI, Marta Garzia; LOPORTO, Chiara; PIGNATELLI, Daniela; CAMPOREALE, Giuseppe; PALUMBO, Fabio; SARDELLA, Eloisa; GRISTINA, Roberto; FAVIA, Pietro. **Plasma Processes for Life Sciences**, p. 1-21, 2018.

VARIOLA, Fabio; YI, Ji-Hyun; RICHERT, Ludovic; WUEST, James D.; ROSEI, Federico; NANCI, Antonio. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. **Biomaterials**, [S.L.], v. 29, n. 10, p. 1285-1298, 2008.

VELTEN, D.; BIEHL, V.; AUBERTIN, F.; VALESKE, B.; POSSART, W.; BREME, J.. Preparation of TiO₂ layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 18-28, 2001.

VIANA, Carlos E.; SILVA, Ana N. R. da; MORIMOTO, Nilton I.; BONNAUD, Olivier. Analysis of SiO₂ Thin Films Deposited by PECVD Using an Oxygen-TEOS-Argon Mixture. **Brazilian Journal Of Physics**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 299-303, 2001.

WANG, Guisen; WAN, Yi; REN, Bing; LIU, Zhanqiang. Fabrication of an orderly micro/nanostructure on titanium surface and its effect on cell proliferation. **Materials Letters**, China, v. 212, p. 247-250, 2018.

WILLIAMS, David F.. Titanium for Medical Applications. In: BRUNETTE, Donald M.; TENGVALL, Pentti; TEXTOR, Marcus; THOMSEN, Peter. **Titanium in Medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications**. Inglaterra: Springer, p. 13-24, 2001.

WU, Chengtie; RAMASWAMY, Yogambha; LIU, Xuanyong; WANG, Guocheng; ZREIQAT, Hala. Plasma-sprayed CaTiSiO₅ ceramic coating on Ti-6Al-4V with excellent bonding strength, stability and cellular bioactivity. **Journal Of The Royal Society Interface**, [S.L.], v. 6, n. 31, p. 159-168, 2008.

YANG, G.; WANG, B.; TAWFIQ, K.; WEI, H.; ZHOU, S.; CHEN, G.. Electropolishing of surfaces: theory and applications. **Surface Engineering**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 149-166, 2016.

YASUDA, Hiromi. Competitive Ablation and Polymer Formation in Plasma. In: YASUDA, Hiromi. **Plasma Polymerization**. Florida: Academic Press, p. 178-195, 1985.

YASUDA, Hiromi. Scope of Polymer Formation by Plasma Polymerization. In: YASUDA, Hiromi. **Plasma Polymerization**. Florida: Academic Press, p. 19-43, 1985.

YAZDI, R.; GHASEMI, H.M.; ABEDINI, M.; WANG, C.; NEVILLE, A.. Mechanism of tribofilm formation on Ti6Al4V oxygen diffusion layer in a simulated body fluid. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, [S.L.], v. 77, p. 660-670, 2018.

ZAFFE, Davide; BERTOLDI, Carlo; CONSOLO, Ugo. Accumulation of aluminium in lamellar bone after implantation of titanium plates, Ti-6Al-4V screws, hydroxyapatite granules. **Biomaterials**, [S.L.], v. 25, n. 17, p. 3837-3844, 2004.

ZANINI, Stefano; ZIANO, Roberto; RICCARDI, Claudia. Stable Poly(Acrylic Acid) Films from Acrylic Acid/Argon Plasmas: influence of the mixture composition and the reactor geometry on the thin films chemical structures. **Plasma Chemistry And Plasma Processing**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 535-547, 2009.

ZHANG, Erlin; ZHENG, Lanlan; LIU, Jie; BAI, Bing; LIU, Cong. Influence of Cu content on the cell biocompatibility of Ti-Cu sintered alloys. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 46, p. 148-157, 2015.

ZHANG, Yue; WU, Meng; WANG, Tao; GUO, Shiming. Fabrication of porous micro-nanostructured networks on Ti6Al4V for faster hydroxyapatite deposition in SBF. **Materials Letters**, [S.L.], v. 256, p. 126571, 2019.

ZHOU, Xuemei; NGUYEN, Nhat Truong; ÖZKAN, Selda; SCHMUKI, Patrik. Anodic TiO₂ nanotube layers: why does self-organized growth occur.:a mini review. **Electrochemistry Communications**, v. 46, p. 157-162, 2014.

ZOUAGHI, Sawsen; SIX, Thierry; BELLAYER, Séverine; COFFINIER, Yannick; ABDALLAH, Marwan; CHIHIB, Nour-Eddine; ANDRÉ, Christophe; DELAPLACE, Guillaume; JIMENEZ, Maude. Atmospheric pressure plasma spraying of silane-based coatings targeting whey protein fouling and bacterial adhesion management. **Applied Surface Science**, [S.L.], v. 455, p. 392-402, 2018.