



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E

ENGENHARIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E

CIÊNCIA DOS MATERIAIS

ESTUDO DA AÇÃO BACTERICIDA EM REGIÕES PRÓXIMAS À

SUPERFÍCIE DE TITÂNIO E AISI 304 PELA INCORPORAÇÃO

DE PRATA

TATIANA PACHECO SOARES ZAMBONI

Caxias do Sul

2017

TATIANA PACHECO SOARES ZAMBONI

**ESTUDO DA AÇÃO BACTERICIDA EM REGIÕES PRÓXIMAS À
SUPERFÍCIE DE TITÂNIO E AISI 304 PELA INCORPORAÇÃO DE PRATA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Aguzzoli

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanela

Caxias do Sul, 2017

P116e Pacheco Soares Zamboni, Tatiana
ESTUDO DA AÇÃO BACTERICIDA EM REGIÕES
PRÓXIMAS À SUPERFÍCIE DE TITÂNIO E AISI 304 PELA
INCORPORAÇÃO DE PRATA / Tatiana Pacheco Soares Zamboni. –
2017.
104 f.
Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2017.
Orientação: Cesar Aguzzoli.
Coorientação: Marcelo Giovanela.
1. Biomateriais. 2. ação bactericida. 3. implantação iônica a
baixas energias. 4. íons de prata. 5. titânio. I. Aguzzoli, Cesar, orient. II.
Giovanela, Marcelo, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

TATIANA PACHECO SOARES ZAMBONI

**ESTUDO DA AÇÃO BACTERICIDA EM REGIÕES PRÓXIMAS À
SUPERFÍCIE DE TITÂNIO E AISI 304 PELA INCORPORAÇÃO DE PRATA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Tese aprovada em 10 de março de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Aguzzoli (Orientador)
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Marcelo Giovanela (co-orientador)
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Marcos A. Z. Vasconcellos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rudinei Fiorio
Instituto Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Janaína S. Crespo
Universidade de Caxias do Sul

Prof^a. Dr^a. Jadna Catafesta
Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Dom da Vida, amor incondicional e pela capacitação em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Cesar Aguzzoli, pela oportunidade, orientação, cobrança, paciência e grande empenho que fizeram com que este trabalho fosse realizado. Pela enorme e fundamental contribuição, pelos ensinamentos e dedicação de tantas horas no laboratório e nas discussões de resultados.

Ao meu co-orientador Prof. Marcelo Giovanela, pelas excelentes contribuições para a execução deste trabalho. Pelo exemplo de professor e pesquisador que és.

À minha família pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo sempre que mais precisei.

Ao meu grande amor, meu esposo e melhor amigo Rafael pelo amor, carinho e compreensão nos momentos mais difíceis... sua contribuição para que eu chegasse até aqui é maior do que pode imaginar.

Às minhas amigas Aline Band, Ana Cláudia, Lílian e Rosiana pela amizade “Além do Tempo” - presentes que a engenharia me deu - pelas trocas de conhecimento (científicos e pessoais) e pelos momentos de descontração. A todos aqueles que estiveram comigo e me apoiaram neste caminho.

A secretária do PGMAT Margarida Henz Borges pela competência e dedicação mostradas sempre que dela precisamos.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para esta realização,

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Objetivos	5
2.1	<i>Objetivo geral.....</i>	5
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	5
3	Referencial teórico.....	7
3.1	<i>Biomateriais</i>	7
3.1.1	Titânio e suas ligas	8
3.1.2	Aço inoxidável	10
3.2	<i>Biofilmes.....</i>	11
3.2.1	Micro-organismos formadores de biofilmes	15
3.2.2	Staphylococcus aureus	16
3.2.3	Escherichia coli.....	17
3.2.4	Listeria monocytogenes	18
3.2.5	Salmonella enteritidis.....	19
3.2.6	Fatores que influenciam na adesão microbiana	19
3.3	<i>Engenharia de superfícies como estratégia para controle da adesão bacteriana e formação de biofilmes</i>	21
3.3.1	Implantação iônica	21
3.3.2	Ion plating.....	23
3.3.3	Implantação iônica a baixas energias por Ion Plating Diversified (IPD)	25
3.3.4	Prata como agente bactericida	27
3.3.5	Mecanismo de ação dos íons prata.....	28
3.3.6	Citotoxicidade dos íons Ag⁺	29
4	Materiais e métodos experimentais.....	31
4.1	<i>Substratos.....</i>	31

4.1.1	Titânio comercialmente puro (Ti cp)	31
4.1.2	Aço inox	31
4.2	<i>Pellets de Prata</i>	32
4.3	<i>Preparação das amostras</i>	32
4.3.1	Limpeza dos substratos	32
4.3.2	Implantação de íons Ag⁺ a baixas energias	32
4.4	<i>Caracterização físico-química</i>	35
4.4.1	Stopping and Range of Ions in Matter (SRIM)	35
4.4.2	Análise química elementar quantitativa	36
4.4.3	Quantificação de prata remanescente nas amostras após o tratamento do efluente industrial	37
4.4.4	Determinação do perfil de profundidade	37
4.5	<i>Caracterização biológica</i>	39
4.5.1	Avaliação das amostras de titânio	39
4.5.1.1	Teste de difusão em ágar	39
4.5.1.2	Tratamento do efluente industrial para reuso	40
4.5.1.3	Contagem de Escherichia coli	40
4.5.1.4	Utilização das amostras de titânio com prata implantada	41
4.5.1.5	Avaliação da molhabilidade das amostras de titânio	42
4.5.1.6	Avaliação da viabilidade celular	42
4.5.1.7	Ensaio MTT	43
4.5.1.8	GIEMSA: Ensaio de alteração morfológica	44
4.5.1.9	Determinação de parâmetros de adesão, distribuição topográfica e padrões morfológicos de MG-63 (osteossarcoma) depositadas nas amostras Ag/Ti₂_60 e Ag/Ti₄_60	45
4.5.2	Avaliação da adesão bacteriana nas amostras de AISI 304	46
4.5.2.1	Tratamento de desoxidação	46
4.5.2.2	Contaminação experimental dos corpos de prova (Ag/AISI) e avaliação da adesão bacteriana	47
4.5.2.3	Análise estatística	48

5	Resultados e discussão.....	49
5.1	<i>Implantação iônica a baixas energias de íons Ag⁺ em titânio</i>	<i>49</i>
5.1.1	Simulação de Monte Carlo	49
5.1.2	Análise química elementar quantitativa.....	50
5.1.3	Determinação do perfil de profundidade	53
5.1.4	Correlação entre os resultados de RBS e GD-OES e simulação	55
5.1.5	Avaliação da hidrofobicidade das amostras	56
5.1.6	Teste de difusão em ágar	57
5.1.7	Verificação da eficiência do tratamento do efluente industrial utilizando as amostras com Ag	58
5.1.8	Avaliação da quantidade de Ag lixiviada após o tratamento do efluente.....	62
5.1.9	Avaliação da citotoxicidade do tratamento	64
5.1.10	Correlação dos resultados de caracterização físico-química e biológicas	70
5.2	<i>Implantação iônica a baixas energias de íons Ag⁺ em aço inox AISI 304</i>	<i>71</i>
5.2.1	Análise da concentração de prata incorporada nas amostras de AISI 304	71
5.2.2	Perfil dos elementos em profundidade	72
5.3	<i>Avaliação do efeito da modificação superficial na adesão de bactérias.....</i>	<i>74</i>
5.4	<i>Quantificação da prata remanescente nas amostras após os ensaios biológicos</i>	<i>78</i>
6	Conclusão	81
7	Sugestões para trabalhos futuros	83
8	Referências	84

Lista de Figuras

Figura 1: (a) Haste intramedular tibial em titânio; (b) Pré-operatório de fratura distal tibial; (c) Pós-operatório [33].	9
Figura 2: Representação dos estágios de desenvolvimento dos biofilmes [adaptado de 51].	13
Figura 3: Diferenças entre as paredes celulares das bactérias (a) Gram-negativas e (b) Gram-positivas.	16
Figura 4: Micrografia eletrônica de varredura de <i>S. aureus</i> [adaptado de 60].	17
Figura 5: Micrografia eletrônica de varredura de <i>E. coli</i> [adaptado de 62].	18
Figura 6: Microscopia eletrônica de aglomerados de <i>L. monocytogenes</i> em <i>Acanthamoeba castellanii</i> . [74]	18
Figura 7: Micrografia eletrônica de <i>Salmonella</i> sp [82]	19
Figura 8: Esquema da divisão da engenharia de superfícies [96].	21
Figura 9: Representação de um equipamento de implantação iônica [adaptado de 14].	22
Figura 10: Esquemática dos processos de Ion Plating a plasma e em vácuo [adaptado de 100].	24
Figura 11: Representação esquemática das principais etapas do processo IPD.	26
Figura 12: Equipamento de Ion Plating utilizado para a modificação superficial das amostras de Titânio cp e aço inox AISI 304.	33
Figura 13: Imagem da placa 3M™ Petrifilm™ utilizada na contagem de coliformes e <i>E. coli</i>	41
Figura 14: Simulação dos perfis de concentração/profundidade de Ag ⁺ implantada a 2 e 4 keV em (a) titânio, e em (b) AISI 304.	50
Figura 15: Espectro de RBS da amostra Ag/Ti4_60 onde se identifica os elementos Ti e Ag que compõem a amostra.	51
Figura 16: Perfil dos elementos em profundidade obtido por GD-OES para as amostras de titânio com prata implantada a 4 keV por (a) 30 min e (b) 60 min.	54
Figura 17: Representação do alcance da profundidade da prata implantada no titânio para	

a amostra Ag/Ti4_60.....	55
Figura 18: Imagem do teste de difusão em ágar com E. coli: (a) titânio puro (Ti_cp) e (b) amostra Ag/Ti4_45.....	57
Figura 19: Imagem do teste de difusão em ágar (<i>Staphylococcus aureus</i>) para (a) titânio puro (Ti_cp) e (b) amostra Ag/Ti4_45.....	58
Figura 20: Contagem de E. coli em relação ao tempo de contato das amostras com o efluente industrial para (a) Ag/Ti4_30 (b) Ag/Ti4_45 e (c) Ag/Ti4_60.	59
Figura 21: Quantificação de prata presente na amostra Ag/Ti4_45 após sua utilização no tratamento do efluente industrial.....	63
Figura 22: Comparativo da morfologia das células MG63 sobre amostras de Ti_cp, Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 após 1 e 5 dias de incubação.....	66
Figura 23: Morfologia das células tratada durante 1, 5 e 7 dias em comparação com os controles negativos e positivos. As imagens foram obtidas por microscopia óptica (aumento de 200 vezes).....	68
Figura 24: Efeito citotóxico das amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 na viabilidade de células MG-63. As células foram tratadas durante 1, 5 e 7 dias. Controle positivo (células tratadas com DMSO a 5%). Os resultados foram obtidos a partir de três experiências independentes. Cada barra representa o percentual médio de viabilidade \pm DP em relação ao controle negativo (meio de cultura) que foi normalizada para 100%.	69
Figura 25: Espectro de RBS da amostra Ag/AISI2_60.....	72
Figura 26: Perfil de implantação de prata na amostra Ag/AISI2_60 e seus principais constituintes.....	73
Figura 27 – Representação do alcance da profundidade dos íons Ag ⁺ implantados no aço inoxidável AISI 304 com base nas informações obtidas na simulação de Monte Carlo.....	74
Figura 28: Avaliação das amostras Ag/AISI2_60 após os ensaios de adesão em 1h e 24h para as bactérias: (a) <i>L. monocytogenes</i> e (b) <i>S. enteritidis</i>	78

Lista de Tabelas

Tabela 1: Diferenciação da composição química da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Adaptado de [58].	15
Tabela 2: Composição do titânio comercialmente puro (Ti cp) utilizado neste trabalho..	31
Tabela 3: Composição do aço inox AISI 304	32
Tabela 4: Parâmetros do processo de implantação iônica a baixas energias	34
Tabela 5: Denominação das amostras utilizadas nesse trabalho	34
Tabela 6: Concentração de íons Ag ⁺ implantados nas amostras desse trabalho.	51
Tabela 7: Valores dos ângulos de contato para as amostras de titânio puro (Ti cp), Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60.....	56
Tabela 8 – Taxa de redução de <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i> em aço inoxidável AISI 304 tratado por implantação iônica de Ag ⁺ a baixas energias [139].	75

Resumo

A contaminação por biofilmes bacterianos tem um forte impacto negativo, especialmente quando aderidos na superfície de próteses, implantes, pinos e outros dispositivos médico-cirúrgicos. Neste trabalho foram produzidas amostras metálicas de titânio e AISI 304 com íons Ag^+ implantados por IPD a diferentes energias: 2 e 4 keV; e com diferentes tempos de implantação: 30, 45, 60 e 90 min visando a obtenção de superfícies com propriedades bactericidas. A profundidade e o perfil de distribuição dos íons implantados foram estimados por simulação de Monte Carlo utilizando o software SRIM 2008, juntamente com a determinação da concentração de prata incorporada nas amostras por técnicas espectroscópicas. A atividade bactericida das amostras de titânio com diferentes concentrações de prata foi avaliada por meio do tratamento de um efluente industrial líquido, que foi submetido à contagem de *Escherichia coli* antes e depois do contato do efluente com as amostras. O ângulo de contato foi medido para avaliação da molhabilidade das amostras de titânio que apresentaram as maiores concentrações de prata, fator determinante na adesão de bactérias e células humanas. A citotoxicidade foi avaliada através de teste de viabilidade celular e análise morfológica. Obteve-se uma redução de 27% de *E.coli* no efluente industrial tratado com a amostra implantada a 4 keV por 45 min, com concentração inicial de $3,35 \times 10^{15}$ átomos cm^{-2} . Não foi detectado efeito tóxico da prata para células humanas MG63, mesmo considerando as maiores concentrações prata, uma vez que não houve redução na adesão e proliferação celular em relação ao titânio não tratado. Para as amostras de AISI 304, os ensaios de adesão microbiana foram realizados para as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*, resultando em uma redução de 65,9 e 69,8%, respectivamente. Por fim, os resultados mostraram que o tratamento estudado para obtenção de materiais metálicos com ação bactericida é promissor para aplicações na área médica, no entanto é necessário uma avaliação em longo prazo para garantir a segurança de sua utilização.

Palavras-chave: Biomateriais, ação bactericida, implantação iônica a baixas energias, íons de prata, titânio, aço inoxidável.

Abstract

Contamination by bacterial biofilms has a strong negative impact, especially when given on the surface of prostheses, implants, pins and other medical-surgical devices. In this study metal samples of Titanium cp and AISI 304 were produced with Ag⁺ ions implanted by IPD at different energies: 2 and 4 keV and different implantation times: 30, 45, 60 and 90 min to obtain surfaces with bactericidal properties. The depth and the distribution profile of the implanted ions were estimated by Monte Carlo simulation using the SRIM 2008 software. The Ag⁺ ions concentration incorporated in the samples was determinate by spectroscopic techniques. Bactericidal activity of the titanium samples with different concentration of Ag⁺ ions was evaluated by the treatment of a liquid industrial waste. It was submitted to *Escherichia coli* counting before and after the contact of the waste with the samples. The contact angle was measured to evaluate the wettability of the titanium samples that presented the highest silver concentration. Wettability is a determinant factor in the adhesion of bacteria and human cells. Cytotoxicity was evaluated by cell viability test and morphological analysis. A 27% reduction of *E. coli* in the industrial waste treated with the sample implanted at 4 keV was achieved for 45 min with an initial concentration of 3.35×10^{15} atoms cm². No toxic effect of silver was detected on human MG63 cells, even considering the higher concentration of silver, since there was no reduction in cell adhesion and proliferation c to untreated titanium. For the AISI 304 samples, the microbial adhesion assays were performed for the bacteria *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*, resulting in a reduction of 65.9 and 69.8%, respectively. Finally, the results showed that the treatment studied to obtain metallic materials with bactericidal action is promising for applications in the medical field, however a long term evaluation is necessary to guarantee the safety of its use.

Keywords: Biomaterials, bactericidal action, low energy ion implantation, ions of silver, titanium, stainless steel.

1 Introdução

Pesquisas científicas visando o controle de micro-organismos patogênicos constituem um campo de estudos que abrange diferentes áreas, não só da Biologia e da Saúde, mas também da Engenharia, na indústria alimentícia, ciência marinha e na biomedicina. Um dos maiores desafios, tanto na indústria alimentícia quanto na área médica, tem sido o combate às infecções causadas por micro-organismos que formam biofilmes aderidos a superfícies e que têm contato direto com alimentos, próteses e outros instrumentos cirúrgicos [1-3].

Dentre os materiais mais empregados nas áreas mencionadas anteriormente, destacam-se os aços inoxidáveis com excelente resistência à corrosão, fadiga e fratura. Esses materiais são empregados em instrumentos cirúrgicos, em implantes, e no processamento e armazenamento de alimentos e bebidas. Embora seja uma superfície lisa e de fácil higienização, comparada a de outros materiais, ela ainda está sujeita ao acúmulo de vários micro-organismos [1]. Bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli*, podem manter-se imóveis na superfície do material por um longo período de tempo até o seu desenvolvimento na forma de um biofilme [2-4].

O titânio, devido às suas excelentes propriedades, se destaca por aplicações na medicina, odontologia, e também na indústria aeronáutica [5]. Por ser um metal altamente reativo e apresentar grande afinidade pelo oxigênio, quando em contato com uma atmosfera oxidante (incluindo fluidos corpóreos), à temperatura ambiente, tende a formar em sua superfície e de forma espontânea e instantânea uma fina camada aderente e protetora de óxido de titânio (TiO₂). Essa camada confere ao titânio alta resistência à corrosão, sendo também responsável pela biocompatibilidade do material, pois protege o meio biológico dos efeitos tóxicos da dissolução de elementos oriundos do interior do

metal [6,7]. Quando a camada de TiO_2 é danificada pode se recompor rapidamente, estando exposta a um meio oxidante [8].

Na área médica, a adesão de bactérias apresenta, geralmente, um caráter nocivo, uma vez que está associada a um grande número de problemas de saúde. As contaminações cruzadas de pacientes são associadas à formação de biofilmes bacterianos em instrumentos e dispositivos médicos, como a superfície de implantes (contaminados) que são transferidos ao tecido do hospedeiro (não contaminado). Há também grande risco de complicações pós-cirúrgicas pela utilização de instrumentos cirúrgicos contaminados por micro-organismos, devido a falhas no processo de esterilização desses materiais. Nesses casos, surge a necessidade de reintervenções médico-cirúrgicas extensas e dispendiosas, cujo tratamento pode durar meses, inclusive com o risco de levar o paciente à morte [9].

Outra área que demanda formas de evitar a formação de biofilmes é a indústria de alimentos, pois a contaminação microbiana em qualquer parte do processo produtivo representa um risco potencial que pode comprometer a qualidade dos alimentos e da saúde pública [10]. A acumulação de biofilmes em equipamentos pode ainda causar efeitos indesejados como perdas de eficiência em permutadores de calor, perdas de carga em dutos e tubulações, assim como a aceleração da corrosão de materiais [10,11].

Sendo assim, a contaminação por micro-organismos faz com que o controle das propriedades de superfície dos materiais ocupe uma posição de destaque na ciência moderna, pois é crucial a influência que as características físico-químicas de interfaces exercem na concepção e no desempenho de materiais inovadores. A engenharia de superfícies se ocupa de um desafio científico e tecnológico com grande potencial em áreas estratégicas, como microeletrônica, energia, biotecnologia e biomateriais. Surge assim, a busca pelo desenvolvimento de materiais que combinem características como biocompatibilidade, excelente capacidade de osteointegração e, ao mesmo tempo, que

sejam capazes de inibir a adesão bacteriana inicial em sua superfície, evitando a formação de biofilmes, responsáveis pelos diversos problemas já mencionados anteriormente [9-11].

O desafio consiste em desenvolver processos que viabilizem a modificação superficial e o controle dos mecanismos de interação entre materiais dissimilares, enquanto as propriedades de volume são preservadas. Implantação iônica, nitretação a plasma e revestimento por deposição de filmes finos são algumas das técnicas disponíveis para a modificação da superfície e/ou de uma região próxima da superfície dos materiais [3,6]. A implantação iônica consiste em introduzir espécies de elementos químicos em regiões relativamente próximas à superfície desses materiais, ao mesmo tempo em que preserva o volume e as propriedades físico-químicas do material original [12-15]. Esses elementos, como Ag, Cu, Au, Zn e Sn, apresentam ação contra uma ampla faixa de microorganismos. Dentre todas as espécies metálicas, o íon Ag^+ é o primeiro candidato utilizado em pesquisas para efeito bactericida, sem efeito tóxico aparente para as células humanas, quando em baixas concentrações, em comparação com os outros íons de metais pesados [16-19]. De acordo com a literatura, a concentração máxima de implantação iônica pode atingir até $3,0 \times 10^{17}$ átomos cm^{-2} a uma profundidade de aproximadamente 30 nm quando aplicada uma energia de 100 keV. Condições semelhantes a estas constataram um efeito bactericida de 99,5% na superfície de aços inoxidáveis [3,4,17-20].

No entanto, as limitações encontradas no método de implantação iônica tornam inatingível a produção industrial em larga escala, onde, em dados mais otimistas, a área superficial implantada pode ser algo em torno de 4 cm^2 e com tempo de duração de 12 a 14 h. Além disso, os íons implantados requerem uma energia mínima de 30 keV para atingir concentrações de $1,0 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2} em regiões próximas da superfície. Esses fatores elevam o custo total do processo, inviabilizando a aplicação prática baseada nesse

método [13,15].

Embora existam diversos trabalhos com o propósito de modificação superficial pela técnica de implantação iônica de média energia (30 a 500 keV) e alta energia (> 500 keV), não há muitos estudos que relatam o seu emprego a baixas energias (0,1 a 10 keV) [2,3]. Dessa forma, a implantação iônica a baixas energias surge como uma alternativa de processo industrialmente viável, pois para sua implementação exige poucas adaptações em equipamentos de *Ion Plating*, que são amplamente utilizados na indústria para deposição de filmes finos. Por se tratar de um processo reprodutível e que permite *upscale*, de um processo em nível de bancada para escala industrial, destaca-se como um diferencial em relação à maioria dos estudos relatados na literatura [21].

Considerando que a adesão bacteriana inicial é um passo crucial na formação do biofilme, que precede a infecção clínica, pode-se dizer que esta é a fase mais crítica durante a colonização bacteriana de um implante. Portanto, a abordagem utilizada nesse trabalho pode, eventualmente, resultar em uma maior taxa de sucesso em cirurgias e em uma menor taxa de contaminação na indústria de alimentos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é estudar a correlação entre os parâmetros de implantação e a ação bactericida em amostras metálicas através da modificação da superfície de aço inoxidável e titânio cp por meio do processo de *Ion Plating Diversified (IPD)*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Implantar íons Ag^+ (numa região próxima da superfície) em dois metais: aço inox AISI 304 e titânio cp:
 - a.1) Titânio cp: variando a energia de implantação (2 e 4 keV) e o tempo de processo (30, 45, 60 e 90 min);
 - a.2) AISI 304: energia de implantação (2 e 4 keV) e tempo de processo de 60 min.
- b) Caracterizar as amostras implantadas por meio das técnicas de Simulação de Monte Carlo, RBS e GD-OES;
- c) Avaliar se a prata implantada está de fato abaixo da superfície do titânio e AISI 304, bem como determinar a concentração de prata obtida;
- d) Avaliar o desempenho das amostras de titânio quanto à sua ação bactericida, por meio do tratamento de um efluente industrial, utilizando amostras com diferentes concentrações de prata;
- e) Avaliar o efeito de lixiviação da prata após o tratamento do efluente quantificando a prata incorporada nas amostras, antes e depois da sua utilização nos testes de eficiência bactericida;

- f) Avaliar as concentrações de prata utilizada nos tratamentos das amostras de titânio quanto à citotoxicidade, por meio do teste de "*in vitro*" com células humanas.
- g) Avaliar a ação bactericida das amostras de aço inoxidável AISI 304 através do teste de adesão bacteriana.

3 Referencial teórico

3.1 Biomateriais

Conceitualmente, biomaterial é qualquer material usado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável [22,23].

Para desempenhar de maneira adequada a função de substituir, aumentar ou suportar uma estrutura, o implante deve ser compatível com as características do tecido. Existem diferentes tipos de enxertos ósseos utilizados em implantes: autólogo (provém do mesmo indivíduo); homólogo (de um indivíduo de mesma espécie do receptor) e heterólogo (quando a espécie do doador e do receptor não coincidem – bovinos, por exemplo) [24]. No entanto, essas possibilidades apresentam certos inconvenientes, tais como intervenção em uma área sadia do organismo do paciente, morbidade da área doadora, maior período de convalescença, susceptibilidade a infecções, e reabsorção progressiva e constante. Desta forma, implantes em biomateriais sintéticos como metais, cerâmicas e polímeros vêm sendo amplamente estudados, desenvolvidos e aplicados. Uma vez que as necessidades em biomateriais aumentam com o envelhecimento da população e o desejo de manter saúde e bem-estar, o mercado global de biomateriais deve investir de 88,4 bilhões de dólares até o fim de 2017, com uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 15% [25].

Alguns metais são utilizados como substitutos de tecidos duros, como em substituições totais de quadril e joelho, por exemplo, placas e parafusos para fixação de fraturas, dispositivos de fixação de coluna e implantes dentários, devido às suas excelentes propriedades mecânicas e de resistência à corrosão. Um metal utilizado na construção de próteses ortopédicas, dispositivos de osteossíntese ou implantes dentários deve possuir como características principais: limite de resistência da ordem de, ou maior

que 800 MPa; resistência à corrosão, geral e localizada; e, principalmente, biocompatibilidade [23,26].

O termo biocompatibilidade refere-se a uma gama de processos envolvendo mecanismos de interação diferentes, mas interdependentes entre material e tecido. É a habilidade do material em desempenhar uma função específica no organismo sem que provoque efeitos tóxicos ou prejudiciais aos sistemas biológicos [27]. Essas características são tão restritivas que apenas uma pequena parcela das classes de materiais metálicos pode ser usada com sucesso.

3.1.1 Titânio e suas ligas

Descoberto em 1791 por William Gregor, mineralogista britânico [28], o titânio, e mais recentemente suas ligas, tem sido utilizado por décadas na fixação de fraturas e reconstrução de articulações. A escolha se justifica, pois o titânio atende os requisitos necessários às aplicações biomédicas, como resistência à corrosão, biocompatibilidade, bioadesão (indução do crescimento ósseo), módulo de elasticidade (quanto mais próximo ao do osso humano – 10 a 30 GPa –, melhor), resistência à fadiga, e boa processabilidade [23,29,30].

O titânio apresenta uma estrutura cristalina hexagonal compacta (hcp – *hexagonal closed packed*) referente à fase alfa, que pode sofrer uma modificação alotrópica a 881 °C para a estrutura cúbica de corpo centrado (bcc – *body centered cubic*) conhecida como fase beta. A manipulação dessas características cristalográficas por adição de ligantes e processos termomecânicos permite a obtenção de ligas com as mais variadas propriedades [31].

As classes de titânio que inicialmente foram introduzidas como biomateriais foram o ASTM F67 (titânio comercialmente puro nos graus 1, 2, 3 e 4), ASTM F136 (liga Ti-

6Al-4V *Extra Low Intersticial*) e ASTM F1472 (liga Ti-6Al-4V padrão) [5].

Parte da resistência à corrosão observada no titânio e suas ligas se deve à formação de uma camada de óxido passivo constituída primariamente de TiO_2 que adere à superfície do metal e o protege, além de ser em grande parte responsável pela biocompatibilidade do material [23,29].

Os implantes de titânio são especialmente indicados, em função de suas propriedades [23], no caso de traumas severos na estrutura facial que requerem um grande número de placas e parafusos disponíveis em diversas configurações para adequar o sistema à anatomia do paciente.

Outra aplicação que demonstra a versatilidade do titânio se configura nas hastes intramedulares para fratura exposta e fechada de tibia, [32] onde o implante (Figura 1) é indicado para fraturas de ossos de maior dimensão e sujeito a esforços mecânicos maiores (tibia).

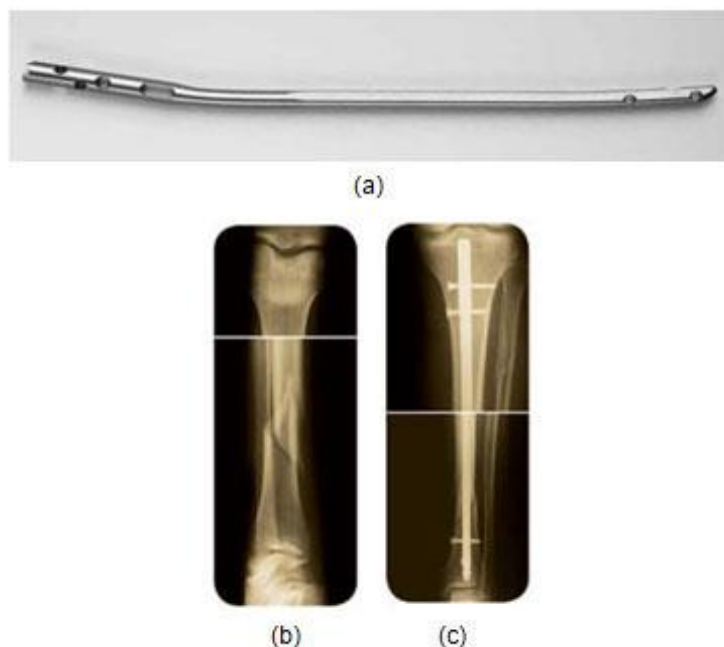


Figura 1: (a) Haste intramedular tibial em titânio; (b) Pré-operatório de fratura distal tibial; (c) Pós-operatório [33].

3.1.2 Aço inoxidável

Sabe-se que os aços inoxidáveis são os materiais mais utilizados na fabricação de equipamentos e utensílios para a indústria de alimentos e na área médica, devido às suas excelentes propriedades como resistência à corrosão e oxidação. Além disso, apresentam maior durabilidade, processos de fabricação e acabamentos de baixa complexidade, e também maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção quando comparados ao cobre, alumínio e aos polímeros [34,35].

Os aços inoxidáveis são divididos de acordo com a sua microestrutura, sendo as principais: austeníticos, ferríticos e martensíticos. O que diferencia uns dos outros é a composição química, sendo a do austenítico composta basicamente por ferro, cromo e níquel. Os aços inoxidáveis com as especificações *American Iron and Steel Institute* AISI 304 e AISI 316 são os mais utilizados na fabricação dos mais diversos tipos de equipamentos para a indústria de alimentos e na área médica (instrumentos cirúrgicos, pinos de fixação, implantes permanentes e temporários, e utensílios para centros cirúrgicos) [36]. A liga 304 de aço inoxidável é um aço austenítico, pois possui um mínimo de 18% em massa de cromo, 8% de níquel e até 0,08% de carbono [36,37]. O que essencialmente distingue o tipo de aço inoxidável 316 do AISI 304 é a adição de molibdênio. Esse componente aumenta a resistência à corrosão em vários ambientes (salmouras, branqueamento, fluidos biológicos, etc.), e, em particular, reduz ou inibe a corrosão localizada induzida por cloretos [36]. Apesar dessa maior resistência química, o custo mais elevado do AISI 316 faz com que esse aço seja menos utilizado na fabricação de equipamentos para alimentos, tornando o aço inoxidável AISI 304 o mais utilizado pelos fabricantes de equipamentos para indústria alimentícia [38].

Por exigirem mais alto grau de pureza, além da resistência à corrosão, não permitindo sua deterioração quando exposto aos fluidos corpóreos, o AISI 316 é utilizado

na produção de *stents* (tubo minúsculo, expansível em forma de malha, feito de um metal como o aço inoxidável ou uma liga de cobalto, usados para devolver um ritmo próximo ao normal ao fluxo sanguíneo da artéria coronariana). Para isso, os *stents* são eletropolidos a fim de se obter uma superfície lisa que é essencial para melhorar o seu desempenho, reduzindo a probabilidade de produção de um coágulo de sangue.

A microtopografia dos aços inoxidáveis demonstra a presença de ranhuras e fendas, ao contrário de sua aparência macroscópica [39-41]. Em virtude disso, e outras propriedades, diversos estudos têm demonstrado a adesão e formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável [39,42-44].

As principais limitações da utilização de aço inox AISI 304 para produção de implantes são corrosão e troca iônica. Este aço pode sofrer corrosão *in vivo* e liberar íons Ni^{2+} , Cr^{3+} e Cr^{6+} capazes de causar efeitos locais (irritação, inflamação nas áreas adjacentes à interface implante-tecido) e sistêmicos (efeito tóxico sobre o organismo). Por isso, na área médica as principais aplicações do aço inoxidável AISI 304 são dispositivos temporários como placas, parafusos e pinos [45,46].

3.2 Biofilmes

Os biofilmes são definidos como sistemas biológicos altamente organizados, onde diversos tipos de micro-organismos (predominantemente as bactérias) estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas, que se aderem a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica). Esta forma de organização representa a maior parte de toda a vida microbiana (estima-se que mais de 90% dos micro-organismos vivam sob a forma de biofilmes), tanto em quantidade como em termos de atividade [47]. Os micro-organismos dentro de um biofilme vivem em microcolônias e representam somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme (menos de 10%). As microcolônias

estão encapsuladas numa matriz composta de substâncias poliméricas extracelulares, frequentemente denominadas de EPS (do inglês *extracellular polymeric substances*). Estas substâncias formam uma estrutura porosa e altamente hidratada com canais de água entre as microcolônias. Estes pequenos canais de água abertos atuam como um sistema pseudocirculatório para o fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos metabólicos [47-49].

Os biofilmes formam-se naturalmente em qualquer superfície sólida em contato com água não esterilizada, como tecidos vivos, dispositivos médicos e sistemas de água. Na maior parte das superfícies sólidas, os biofilmes se formam com espessuras da ordem dos milímetros ou mesmo micrômetros; entretanto, a espessura de alguns biofilmes pode atingir vários centímetros, como no caso dos tapetes de algas [48].

A densidade populacional é um fator importante que influencia no crescimento de um biofilme. O aumento da densidade populacional gera alterações na estrutura do biofilme, elevando a complexidade e a resistência microbiológica contra agressões externas. Os biofilmes são responsáveis por mais de 60% das infecções bacterianas humanas [47,50]. Portanto, o crescimento do biofilme tem consequências importantes na indústria e na saúde humana, e deve ser tratado como uma nova forma de vida que merece enfoque diferenciado em relação à abordagem adotada pela microbiologia tradicional.

O processo de formação dos biofilmes bacterianos é composto por uma sequência de estágios mostrados esquematicamente na Figura 2 e descritos logo a seguir.

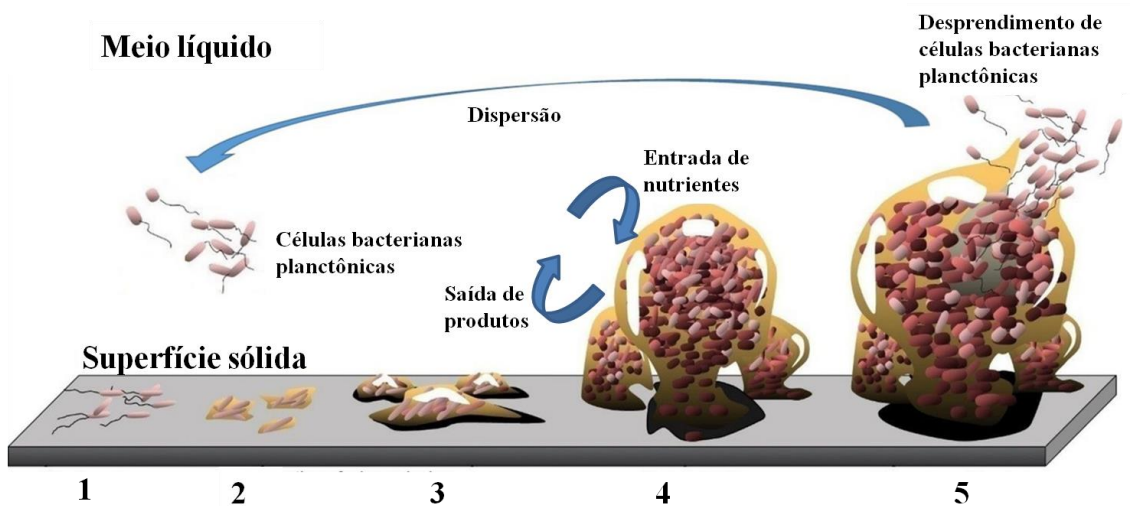


Figura 2: Representação dos estágios de desenvolvimento dos biofilmes [adaptado de 51].

1. Adesão reversível: transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e posterior fixação. Essa adesão é considerada reversível, pois é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico. As principais forças atuantes nesse estágio são as ligações de hidrogênio, Van der Waals; também atuam os conceitos de ácido-base de Lewis e hidrofobicidade. Os fatores que podem influenciar esse processo são pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, presença de compostos orgânicos e inorgânicos, autoindutores do *quorum sensing* (QS) e temperatura [48,52-54];

2. Adesão irreversível: caracteriza o início da presença de microcolônias (aglomerado de células aderidas entre si e a uma superfície) e da produção de exopolissacarídeos (EPS). A adesão completa ou irreversível ocorre, aproximadamente, 2 h após a adesão inicial. A principal força de ligação célula-superfície é conferida pela matriz tridimensional e insolúvel de EPS através da comunicação célula-célula [53];

3. Início da maturação: crescimento, divisão e agregação de células fixas, umas às outras, à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS, formando a estrutura do biofilme. Nessa etapa, muitas

células alteram os seus processos fisiológicos em resposta às condições nos seus nichos [48,52];

4. Maturação: fixação de células microbianas e outras partículas flutuantes, contribuindo para a acumulação de microcolônias. As células dentro da matriz de EPS começam a se multiplicar, emitindo sinais químicos que lhes permite intercomunicar com todas as células microbianas. O biofilme maduro, com alta densidade populacional, é caracterizado por uma arquitetura complexa que inclui canais, poros e ainda uma redistribuição das bactérias por locais afastados do substrato. O aumento da espessura do biofilme fornece estabilidade às comunidades microbianas contra a flutuação do ambiente [48,53,54];

5. Dispersão de células: liberação de material celular, segundo dois mecanismos diferentes: (*a*) erosão (perda de células individuais) ou (*b*) descamação (perda de células agregadas). O desprendimento é um fator importante para o desenvolvimento do biofilme, pois parece ser um evento fisiológico regulado. Após a maturação do biofilme, os níveis da matriz de EPS aparentam diminuir, provavelmente devido ao metabolismo, com subsequente liberação de células individuais ou agregadas de um biofilme. A causa no desprendimento de células do biofilme deve estar relacionada ao aumento da concentração de moléculas, responsável pela liberação de enzimas que degradam a matriz polimérica. As células desprendidas se apresentam móveis e assemelham-se às células planctônicas, podendo disseminar uma contaminação no alimento e uma infecção no hospedeiro, ou formar um novo biofilme na linha de produção [52-54].

Além dos fatores mencionados durante as etapas de desenvolvimento do biofilme, existe um fator biológico mais complexo, cuja relevância foi constatada pela adaptação dos micro-organismos às mudanças das condições naturais. As mudanças fisiológicas sofridas pelas células dependem da sua capacidade de perceber e responder ao ambiente externo, assim como a de modular a expressão do gene em conformidade [55].

3.2.1 Micro-organismos formadores de biofilmes

Dentre todos os micro-organismos, são as espécies bacterianas que mais comumente produzem biofilmes em condições favoráveis, ainda que algumas apresentem naturalmente uma maior aptidão que outras. A maioria das bactérias apresenta elevada taxa de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias, e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante. Essas características as tornam excelentes organismos capazes de colonizar qualquer superfície, até mesmo em condições extremas, tais como altas concentrações salinas, temperaturas ótimas de crescimento de 80 °C ou superior, podendo chegar a 121 °C [47,56].

As espécies bacterianas são divididas em dois grupos distintos: as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esta classificação distingue as diversas estruturas das membranas celulares das bactérias, como mostra a Tabela 1. As bactérias Gram-negativas como, por exemplo, a *Escherichia coli* (*E. coli*), normalmente têm uma parede celular bem definida, composta por peptidoglicano e uma bicamada de fosfolipídios abaixo da membrana citoplasmática. Ao contrário, as bactérias Gram-positivas, como a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), têm uma camada fina de 1 a 2 nm de espessura e uma camada alternada de peptidoglicano entre a parte interna e externa da membrana citoplasmática [57,58].

Tabela 1: Diferenciação da composição química da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Adaptado de [58].

Componentes	Bactéria	
	Gram-positiva	Gram-negativa
Peptidoglicano	+	+
Ácidos lipoteicóicos	+	-
Polissacarídeos	+	-
Proteínas	+ ou -	+
Lipopolissacarídeos	-	+
Lipídios	- ou +	+

As diferentes estruturas entre as paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem ser vistas na Figura 3.

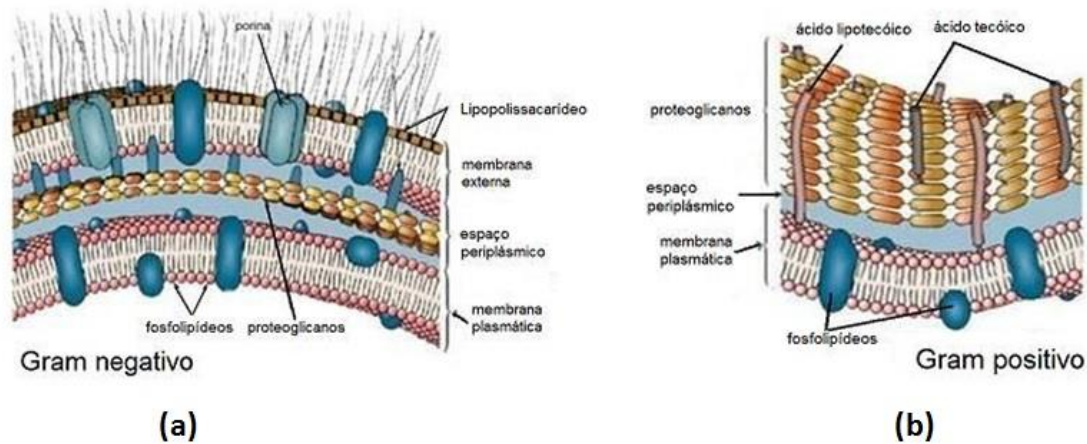


Figura 3: Diferenças entre as paredes celulares das bactérias (a) Gram-negativas e (b) Gram-positivas.

3.2.2 *Staphylococcus aureus*

A *S. aureus* é a mais virulenta espécie do seu gênero pela alta produção de exotoxinas, e é uma das espécies patogênicas mais comuns, juntamente com a *E. coli*. Apresenta-se na forma esférica (cocos) com cerca de 1 μm de diâmetro que formam grupos com aspecto de cachos de uvas com cor amarelada, devido à produção de carotenoides, conforme ilustra a Figura 4. Essa bactéria merece uma atenção considerável, já que é a principal causa da osteomielite (infecções ósseas) associadas a corpos estranhos, como próteses e dispositivos osteosintéticos. Cerca de 40 a 60% das infecções associadas a *S. aureus* adquiridas via nosocomial, são agora consideradas endêmicas em hospitais [59]. As infecções são frequentemente causadas por pequenos cortes na pele (aproximadamente 15% da população), sendo que 60% são portadores transitórios deste tipo de bactéria na pele ou flora nasal [56,57].

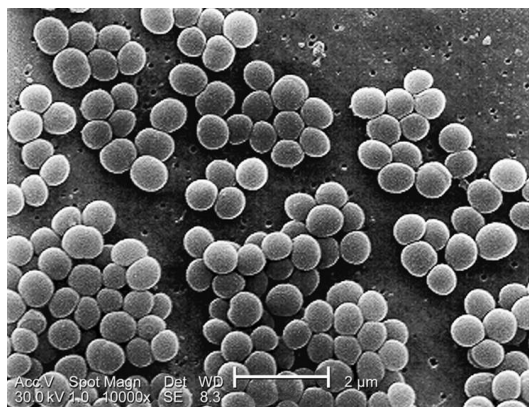


Figura 4: Micrografia eletrônica de varredura de *S. aureus* [adaptado de 60].

3.2.3 *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa (Figura 5) que se encontra normalmente no trato gastrointestinal inferior dos organismos de sangue quente (endotérmicos). Por ser uma bactéria anaeróbica facultativa, não necessita de oxigênio para formar um biofilme, embora se desenvolva mais rapidamente em ambientes ricos em oxigênio. Essa bactéria é proveniente da flora intestinal e apresenta-se na forma de um bacilo, sendo que cada indivíduo mede aproximadamente 0,5 µm de largura por 2 µm de comprimento [56]. Geralmente, a bactéria em questão habita o trato gastrintestinal de humanos e outros animais endotérmicos, sem causar problemas de saúde. No entanto, ao se direcionar para a circulação sanguínea ou demais regiões do corpo, é capaz de provocar doenças e infecções no próprio hospedeiro. Também pode se manifestar pela ingestão de água ou alimentos contendo cepas da bactéria, liberadas juntamente com as fezes de indivíduos contaminados, assim como pelo contato com animais doentes e instrumentos médicos contaminados. A *E. coli* causa infecções no trato urinário que afetam aproximadamente 7 milhões de pessoas anualmente, sendo essas infecções uma das mais comuns adquiridas por humanos [61].

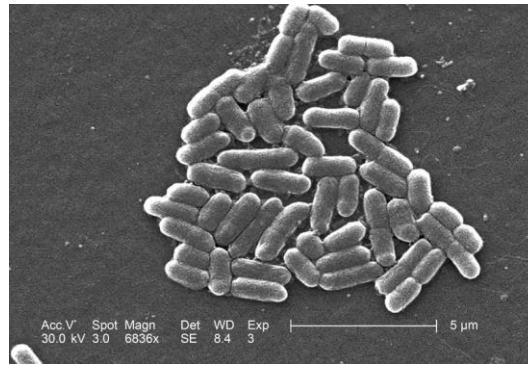


Figura 5: Micrografia eletrônica de varredura de *E. coli* [adaptado de 62].

3.2.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) é um micro-organismo Gram-positivo, mesófilo, com características psicrotróficas [63], com forma de bacilos pequenos, anaeróbios facultativos, e que pode aparecer isolado ou agrupado em pares ou cadeias curtas (Figura 6) [64,65]. Esse micro-organismo possui concentração infectante baixa e pode causar altas taxas de mortalidade, variando de 20% a 30% [66,67]. Esse patógeno tem ganhado importância na última década devido à ocorrência de muitos surtos em todo o mundo [68,69] e tem sido isolado em diversos locais dentro de indústrias de alimentos [70-72]. Muitas pesquisas têm demonstrado a capacidade dessa bactéria em aderir e formar biofilme em vidro, aço inoxidável e borracha [41-43,68,73,92].

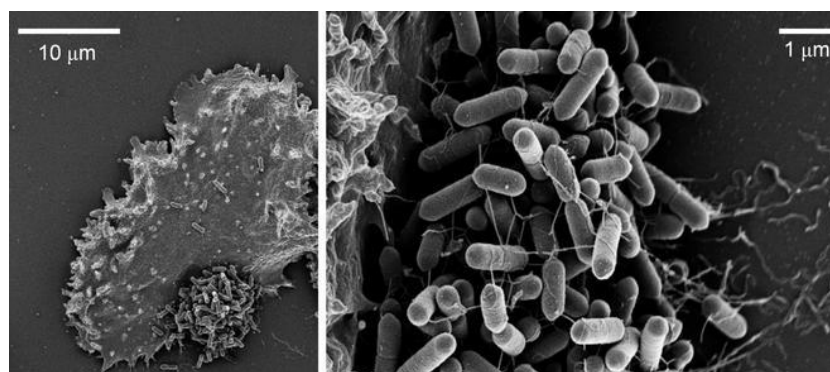


Figura 6: Microscopia eletrônica de aglomerados de *L. monocytogenes* em *Acanthamoeba castellanii* [74].

3.2.5 *Salmonella enteritidis*

Salmonella é um gênero de bactérias, vulgarmente chamadas salmonelas, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo conhecida há mais de um século. São bactérias Gram-negativas, em forma de bacilo (Figura 7), na sua maioria móveis (com flagelos peritríquios), não esporulado, não capsulado, sendo que a maioria não fermenta a lactose. As salmonelas são um gênero extremamente heterogêneo, composto pelas espécies: *Salmonella subterranea*, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta última possuindo, atualmente, 2610 sorotipos. É um patógeno alimentar mesófilo que tem sido identificado como o principal causador de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em vários países [75-77]. Durante a última década, a salmonelose tem sido relatada como a doença de origem alimentar mais frequente no Brasil e é o principal agente causador de DTA no Rio Grande do Sul desde 1997 [78-80]. Mais de 90% das cepas causadoras de salmoneloses alimentares no Rio Grande do Sul, de 1999 a 2008, foram sorotipificadas como *Salmonella enteritidis* com o mesmo perfil genotípico [81].

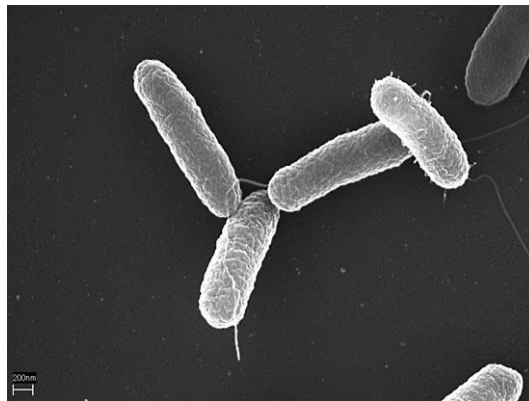


Figura 7: Micrografia eletrônica de *Salmonella sp* [82].

3.2.6 Fatores que influenciam na adesão microbiana

A adesão de micro-organismos nas superfícies é influenciada por fatores como a fase metabólica da célula, a presença de matéria orgânica, o tipo e as propriedades do

material, o pH, a temperatura do meio, a hidrofobicidade do micro-organismo e a presença de EPS [55,83-86].

A hidrofobicidade celular pode afetar a taxa e a extensão da adesão microbiana nas superfícies, já que interações hidrofóbicas tendem a aumentar com o aumento da natureza não polar das superfícies envolvidas na etapa de adesão [55]. Dessa forma, as superfícies hidrofóbicas parecem propiciar a colonização, provavelmente porque essas superfícies favorecem a aproximação do micro-organismo pela eliminação da camada de água presente na interface [87]. Para a maior parte dos micro-organismos, a taxa de adesão em superfícies sólidas é influenciada pela hidrofiliabilidade da superfície: superfícies mais hidrofílicas dificultam a adesão dos micro-organismos [88,89]. A adesão de células humanas, por sua vez, é favorecida à medida que a superfície se torna menos hidrofóbica.

A presença de estruturas celulares como flagelo, pili ou glicocálix pode auxiliar no processo de adesão dos micro-organismos nas superfícies [55]. Isso se deve ao fato da célula microbiana, uma vez aderida à superfície, ter a capacidade de superar a força repulsiva comum a todos os materiais, e, assim, essas estruturas celulares habilitam a célula a aderir e permanecer fixa [90]. As propriedades aderentes da célula bacteriana são influenciadas pelo envelope celular, cuja composição química se altera de acordo com estímulos ambientais [84].

A disponibilidade de nutrientes tem grande influência na estrutura do biofilme e na composição da comunidade microbiana [91]. A aderência em superfícies durante a limitação de nutrientes pode ser uma forma de sobrevivência da célula microbiana [83]. Sendo assim, a limitação de nutrientes e água é fundamental na formação dos biofilmes na indústria de alimentos [91].

A microtopografia da superfície também é importante, pois pode favorecer a adesão bacteriana, particularmente se a superfície apresentar canais fundos, ranhuras e fendas [92-94].

3.3 Engenharia de superfícies como estratégia para controle da adesão bacteriana e formação de biofilmes

A engenharia de superfícies é uma área do conhecimento que estuda os fenômenos que ocorrem na superfície de materiais e em regiões próximas a ela. Trata-se de uma tecnologia que evolui acentuadamente com a modificação de superfícies de componentes de engenharia para cumprir funções específicas dentro de uma aplicação, em geral, sem modificar significativamente as dimensões dos componentes para a aplicação projetada [95].

Basicamente, a engenharia de superfícies divide-se em duas áreas: uma com formação de interfaces (revestimentos ou filmes), e outra sem formação de interfaces (modificação superficial), conforme pode ser observado na Figura 8. Dentro dessas áreas, existem subdivisões que compreendem processos que apresentam vantagens e desvantagens específicas, umas em relação às outras, para diversas aplicações [95-97].

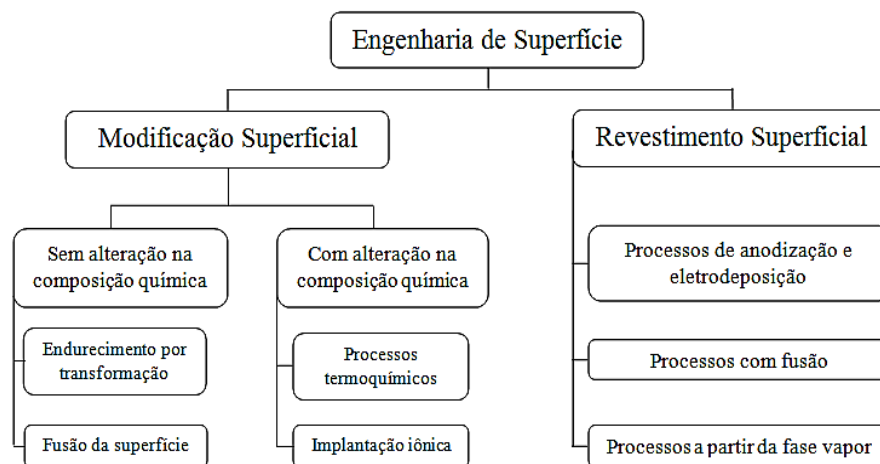


Figura 8: Esquema da divisão da engenharia de superfícies [96].

3.3.1 Implantação iônica

É uma técnica de modificação superficial que se caracteriza pela transferência de

massa, por meio do bombardeamento de um material com átomos ou moléculas ionizadas com energia suficiente para penetrar além das camadas superficiais no material alvo [12,13].

Em linhas gerais, é um processo em que os íons são gerados por meio da injeção de gás ou evaporação de material sólido, a partir de uma fonte aquecida a altas temperaturas. A extração da fonte de alimentação ocorre pela aplicação de um potencial negativo (15 a 40 kV). Durante esse percurso, um feixe energético de determinada espécie química é formado e, em seguida, os íons pré-acelerados pelo potencial de extração são injetados dentro de um eletroímã. Somente os íons com relação massa/carga desejada serão defletidos no ângulo correto e selecionados por uma fenda. Esses íons são acelerados a uma determinada velocidade através de um potencial uniformemente distribuído dentro de um tubo linear (campo elétrico). Por fim, esses íons são direcionados por lentes eletrostáticas e incididos em uma superfície alvo, como esquematizado na Figura 9 [12-15,20,98]. Todo o processo ocorre em alto vácuo.

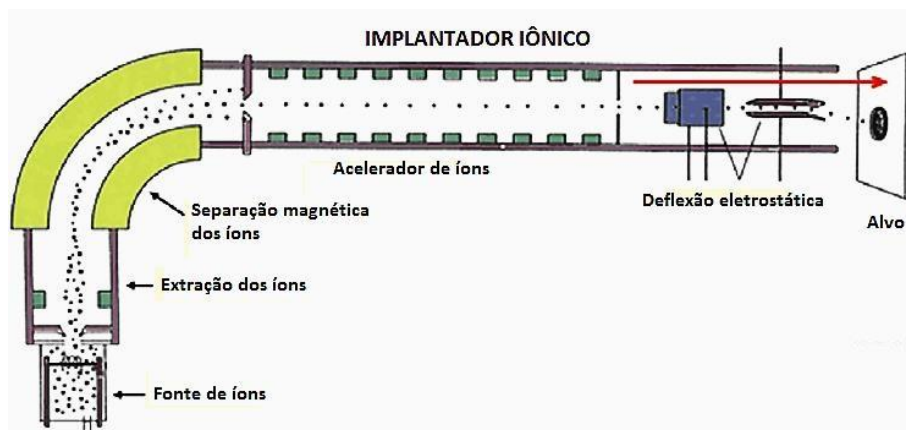


Figura 9: Representação de um equipamento de implantação iônica [adaptado de 14].

Na implantação iônica convencional, os íons são comumente acelerados a energias da ordem de 10 a 500 keV, com penetrações correspondentes que variam de 100 Å a 1 µm, dependendo da estrutura cristalina do material do alvo. Os íons que interagem com o substrato possuem energias cinéticas de 4 a 5 ordens de grandeza maiores do que a

energia de ligação do material sólido [15]. Contudo, os íons energizados, após penetrarem na superfície do substrato, perdem gradativamente sua energia. Esses íons tendem a se neutralizar e são considerados implantados ao transferirem toda sua energia cinética aos átomos do alvo, de forma a repousarem em sítios intersticiais ou substitucionais da rede cristalina do material [20].

A aplicação mais comum para a implantação iônica é direcionada ao processo químico de *doping* (adição de íons) de semicondutores, especialmente do silício. A dopagem controlada de dispositivos eletrônicos ou de semicondutores é feita pela introdução de perfis precisos de impurezas como B⁺, P⁺ e As⁺ [12]. Recentemente, essa técnica também é utilizada na modificação de superfícies de biomateriais [99]. Neste caso são utilizadas impurezas que melhoram a biocompatibilidade e que possuem propriedades bactericidas, como Ag⁺, Cu²⁺, Au³⁺ e Zn²⁺.

Dentre as vantagens da implantação iônica, em relação a outras técnicas, pode-se citar a inexistência de restrições termodinâmicas, tais como a exigência de uma temperatura elevada para difusão ou iniciação de uma reação química, além de não depender de limites de temperatura e solubilidade. A técnica não requer nenhum acabamento ou tratamento térmico da peça, após a modificação superficial, e o processo é rigorosamente controlado e monitorado [13,15].

Por outro lado, apresenta algumas desvantagens como o fato de requerer altas energias para acelerar os íons (energia mínima de 30 keV), sendo que a área superficial modificada e a complexidade da peça são bastante restritas. Além disso, é importante mencionar que o tempo de processo é elevado (às vezes, é superior a 20 h) [13].

3.3.2 Ion plating

O *Ion Plating*, também chamado de *Ion Assisted Deposition (IAD)* ou *Ion Vapor*

Como vantagens da técnica destacam-se a excelente capacidade de cobertura de superfície, em condições apropriadas; trata-se de uma técnica limpa, na qual se obtém um filme de alta pureza; as primeiras camadas atômicas do material são bastante aquecidas, o que acelera a reação de nucleação e difusão; e a flexibilidade na adaptação das propriedades do filme durante o bombardeio [104].

A existência de muitos parâmetros de processamento para serem controlados, o aquecimento no substrato que pode ser excessivo, a dificuldade de disponibilidade das espécies reativas e de bombardeamento uniforme sobre uma superfície complexa, são algumas das desvantagens apresentadas pela técnica [104].

3.3.3 Implantação iônica a baixas energias por *Ion Plating Diversified* (IPD)

A implantação iônica a baixas energias pela funcionalização do *Ion Plating* é vista como uma novidade na área de engenharia de superfícies. Essa técnica se baseia na fusão dos processos de implantação iônica e *ion plating*, e foi desenvolvida com o intuito de obter as propriedades bactericidas em materiais metálicos pela modificação em regiões próximas da superfície [21].

Esse método, em relação à implantação iônica convencional, apresenta algumas vantagens como alto grau de ionização, baixas energias de polarização (< 5 keV) na etapa de aceleração dos íons, redução no tempo de processo (menos do que 1 h) e aumento da área superficial do material a ser modificado (cerca de 200 cm²), podendo variar de acordo com a disponibilidade do reator. A versatilidade desse equipamento permite que o processo seja realizado em escala industrial sem restrições [12,103]. A Figura 11 mostra esquematicamente as principais etapas deste processo, que são descritas a seguir.

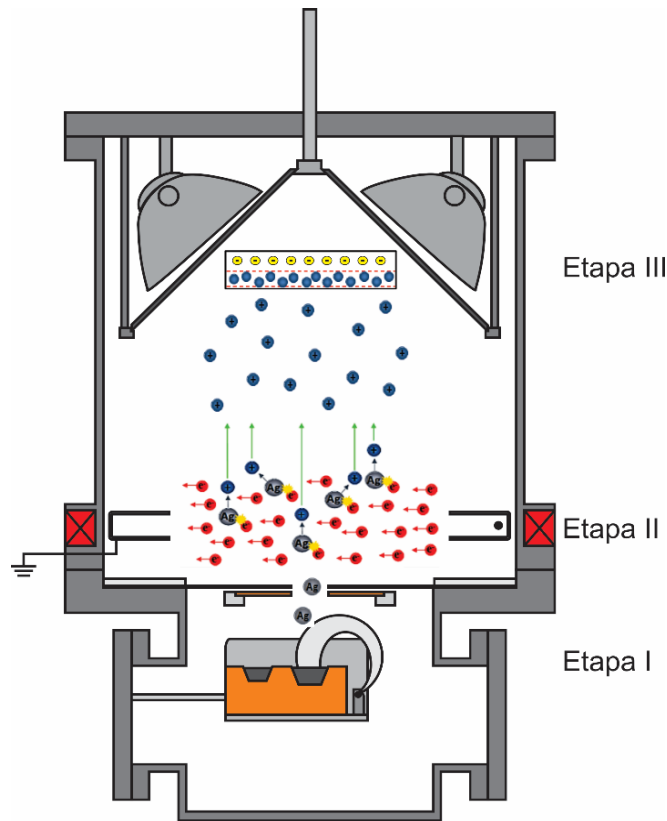


Figura 11: Representação esquemática das principais etapas do processo IPD.

I) Aplicando-se alta corrente e tensão na fonte do canhão de elétrons, o filamento de tungstênio-tório (catodo) é aquecido fazendo com que os elétrons livres recebam a energia requerida para conduzirem e difundirem para fora do metal. A emissão dos elétrons do filamento é denominada de efeito termiônico. O feixe de elétrons passa pela abertura do anodo, sofrendo deflexão ao atravessar as linhas de campo magnético que impulsionam os elétrons primários em direção ao centro do cadinho (recipiente que contém o material que se deseja implantar). A energia gerada na colisão é tal que promove a sublimação do material.

II) Um segundo feixe de elétrons é gerado e direcionado para induzir a ionização dos átomos metálicos evaporados na etapa anterior. Os elétrons, em seu percurso na câmara de vácuo, sofrem colisões com os átomos de gás residual ou átomos do material sublimado. Com isso, os elétrons das camadas eletrônicas externas são ejetados e os átomos são, portanto, convertidos em íons carregados positivamente.

III) O efeito de aceleração dos íons produzidos em direção ao substrato polarizado com um potencial negativo (BIAS) de até 20 kV se dá pela atração dos íons, devido à diferença de potencial (ddp) que é aplicada. Ao penetrar no substrato, o percurso dos íons é turbulento, devido às sucessivas colisões com os átomos do alvo. A energia cinética dissipada por íons pesados, como de prata, na colisão com o substrato é tão elevada que o caminho percorrido é reduzido. Os íons são neutralizados, de maneira a repousarem em sítios intersticiais ou substitucionais da rede cristalina do material.

É importante ressaltar que este método de implantação iônica a baixa energia é perfeitamente viável do ponto de vista industrial, uma vez que o processo é realizado num equipamento já existente e não requer o investimento em novos equipamentos.

O custo do processo, com base nas informações obtidas de uma empresa que presta serviços na área de revestimentos por PVD em Caxias do Sul, é de aproximadamente R\$ 0,90 a R\$ 1,00 por cm² tratado. Uma vez que o processo proposto neste trabalho não caracteriza um revestimento (necessidade de recobrir toda a área de superfície do material) e sim a incorporação de uma pequena quantidade de prata, pode-se considerar que não haverá diferença significativa de custo do processo.

3.3.4 Prata como agente bactericida

As propriedades bactericidas da prata e de seus compostos são historicamente reconhecidas pela eficácia contra uma ampla quantidade de micro-organismos. Desde a antiguidade, povos de diferentes culturas tinham como costume armazenar água, vinho e vinagre em recipientes de prata para evitar a deterioração. Sais de prata também eram usados terapêuticamente pela escola de medicina Mohammedian, no século VII. Em 1884, tornou-se comum administrar gotas de nitrato de prata aquoso nos olhos de recém-nascidos para evitar a transmissão de *Neisseria gonorrhoeae*, agente causador da

gonorreia: uma doença infecciosa do trato urogenital, bacteriana, transmitida quase que exclusivamente por contato sexual ou perinatal que é uma das principais causas de infertilidade feminina. Durante a 1ª Guerra Mundial, os compostos de prata foram usados para prevenir infecções e no tratamento de queimaduras graves, antes da utilização de antibióticos [99,105,106].

Com a disseminação do uso de antibióticos, o consumo de prata para aplicação medicinal foi reduzido drasticamente. No entanto, o aparecimento de estirpes resistentes aos antibióticos provocou, recentemente, um novo interesse na utilização de íons metálicos e de seus compostos como agentes bactericidas. As características bactericidas de vários íons metálicos, principalmente Ag^+ , foram reconhecidas na área científica por indústrias têxteis, farmacêuticas e hospitalares [4,99].

3.3.5 Mecanismo de ação dos íons prata

As propriedades bactericidas da prata e de seus compostos são historicamente reconhecidas pela eficácia contra uma ampla relação de micro-organismos. Entretanto, o mecanismo de ação não está totalmente elucidado [107]. A atividade bactericida da prata depende da forma sob a qual ela é aplicada. A prata metálica ou na sua forma não ionizada é parcialmente inerte. O efeito de toxicidade da prata em micro-organismos ocorre quando a mesma se encontra em seu estado ionizado, mesmo em concentrações relativamente baixas da ordem 10^{17} átomos cm^{-2} [106]. A ação oligodinâmica é totalmente desenvolvida, muitas vezes, somente depois de um longo período de tempo [108]. A energia de ionização da prata é baixa, uma vez que até mesmo o contato com a umidade ou com o fluido corpóreo proporciona a lixiviação de íons Ag^+ [106].

O potencial do seu efeito bactericida, incluindo espécies multirresistentes e fungos, assim como a baixa toxicidade para as células humanas (em concentrações na ordem de

$7,0 \times 10^{-4}$ % v/v), justifica o grande interesse no emprego dos íons Ag^+ em materiais e produtos para cuidados com a saúde [17,109]. A literatura apresenta algumas hipóteses para explicar o mecanismo de ação da prata que faz com que atue como agente bactericida.

Na primeira hipótese, íons Ag^+ são capazes de interagir com grupos tióis de proteínas, o que resulta na inativação de enzimas respiratórias do metabolismo microbiano e conduzem a síntese de espécies de oxigênio reativas. Estudos também revelam uma segunda hipótese, na qual os íons Ag^+ evitam a replicação do DNA, afetam a estrutura e permeabilidade da membrana celular, além de serem compostos foto-ativos na presença de radiação UVA e UVC, o que promove o aumento da inativação de vírus e bactérias por UV. Por fim, a terceira hipótese sugerida é a interação dos íons Ag^+ com os ácidos nucleicos das células bacterianas. É possível que os íons Ag^+ acessem o interior das células através de proteínas transmembranas que normalmente funcionam como transportadoras de outras partículas semelhantes. Ao serem transportados, os íons atravessam a membrana hidrofóbica celular e penetram no citoplasma, levando à desintegração da célula [99].

Biocidas, como prata, e antibióticos apresentam diferentes modos de ação. Diferentemente dos antibióticos que têm sítio de ação específico e são empregados em concentrações próximas à inibitória mínima, os biocidas apresentam espectro de ação mais amplo, muitos alvos na célula microbiana para sua ação bactericida e são empregados em concentrações superiores à mínima concentração inibitória. Por isso, a resistência à sua ação é bem menor do que a encontrada para os antibióticos [110].

3.3.6 Citotoxicidade dos íons Ag^+

Citotoxicidade é a característica que faz com que um meio, material ou composto

seja tóxico para as células. O contato de células com o composto citotóxico pode resultar em diferentes destinos celulares. As células podem sofrer necrose, na qual elas perdem a integridade da membrana e morrem rapidamente (lise celular), elas também podem parar de crescer e proliferar ativamente (a diminuição na viabilidade celular), ou ainda, podem ativar um mecanismo de controle celular conhecido “morte celular programada” (apoptose) [111].

Células em necrose normalmente apresentam inchaço rápido, perdem a integridade da membrana, podendo desligar o metabolismo e libertar os seus conteúdos no ambiente. Células que sofrem necrose rápida *in vitro* não têm tempo ou energia suficiente para ativar mecanismos apoptóticos e não expressam marcadores apoptóticos [111]. A apoptose é caracterizada por eventos citológicos e moleculares bem definidos, incluindo uma mudança no índice de refração da célula, encolhimento citoplásmico, condensação nuclear e clivagem do DNA em fragmentos de tamanho regular [112]. Células apoptóticas cultivadas *in vitro* irão eventualmente sofrer necrose secundária na qual, após incubação prolongada, as células apoptóticas encerram o metabolismo, perdem a integridade da membrana e liberam seu conteúdo citoplasmático no meio de cultura. [111,112]

Da preocupação com o impacto potencial de nanopartículas de prata (AgNPs) quanto a citotoxicidade em indivíduos no nível celular resultam diversos estudos recentes que buscam elucidar seus efeitos em células humanas. Destacam-se os principais efeitos mediados pelas AgNPs sobre a célula, tais como captação celular e distribuição intracelular, citotoxicidade, genotoxicidade e respostas imunológicas, bem como alguns dos principais fatores que influenciam esses efeitos *in vitro* e *in vivo*, tais como concentração, tempo de exposição, tamanho, forma, química de superfície, e tipo de célula. [109,113,114].

4 Materiais e métodos experimentais

4.1 Substratos

4.1.1 Titânio comercialmente puro (Ti cp)

O titânio usado nesse trabalho foi obtido da Sandinox Comércio, Importação e Exportação Ltda (Sorocaba - SP), empresa autorizada a produzir biometais utilizados para implantes ortopédicos e odontológicos. O material foi produzido a partir da composição química padrão, de acordo com as especificações do fabricante e estabelecida pela norma ASTM F67 Grau 1, conforme Tabela 2 [115]. Os corpos de prova foram cortados em peças de 20 × 20 mm e 0,3 mm de espessura.

Tabela 2: Composição do titânio comercialmente puro (Ti cp) utilizado neste trabalho.

Elemento	Composição
	(%) (massa / massa)
	Gr1
Nitrogênio (max)	0,03
Carbono (max)	0,08
Hidrogênio (max)	0,015
Ferro (max)	0,20
Oxigênio (max)	0,18
Titânio	Saldo

4.1.2 Aço inox

Os substratos de aço inox AISI 304 foram fornecidos pela Metalúrgica Ralf Winter (Alvorada - RS). A composição dos materiais utilizados atende as normas ASTM A240, conforme mostra a Tabela 3 [116]. Os corpos de prova foram cortados em peças de 20 × 20 mm e 2 mm de espessura.

Tabela 3: Composição do aço inox AISI 304

Elemento	Composição (%) (massa / massa)
Carbono (max)	0,08
Manganês (max)	2,00
Fósforo (max)	0,045
Enxofre (max)	0,030
Silício (max)	0,75
Cromo	18,00 – 20,00
Níquel	8,00 – 10,50
Nitrogênio	0,10

4.2 Pellets de Prata

A prata (99,99% de pureza) utilizada para evaporação foi fornecida na forma de *pellets* pela empresa Kurt J. Lesker Company (Jefferson Hills, PA - USA).

4.3 Preparação das amostras

4.3.1 Limpeza dos substratos

As placas metálicas, tanto de titânio quanto de aço inox AISI 304, foram cortadas na forma de quadrados de $2,0 \times 2,0$ cm. A limpeza dos substratos foi realizada por imersão em acetona P.A. (Vetec Química Fina Ltda, São Paulo - SP) em banho ultrassônico durante 30 min. Em seguida, as placas foram acondicionadas na câmara de vácuo e submetidas ao tratamento de modificação superficial descrito a seguir.

4.3.2 Implantação de íons Ag^+ a baixas energias

O processo de Implantação Iônica a Baixas Energias (IIBE) utilizado nesse trabalho foi realizado em um equipamento do tipo *Ion Plating Diversified* (IPD) [19,85,99]. Esse

equipamento foi projetado, construído e adaptado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos (LESTT) da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

O equipamento é composto por uma câmara de vácuo construída em aço inoxidável AISI 304 com diâmetro de 600 mm e altura de 900 mm, um sistema de alto vácuo e um painel de controles (Figura 12).



Figura 12: Equipamento de *Ion Plating* utilizado para a modificação superficial das amostras de Titânio cp e aço inox AISI 304.

O método foi escolhido por permitir que as modificações químicas e físicas promovidas pelas espécies implantadas ocorressem em regiões próximas à superfície tratada [21]. Além disso, existe a possibilidade de se utilizar esse processo na indústria, uma vez que diversas empresas possuem equipamentos de *Ion Plating* que poderiam ser facilmente adaptados para implantação a baixas energias.

O porta-amostra, que permite acomodar até cinco amostras, foi acondicionado na câmara de vácuo e o sistema evacuado até uma pressão de base de $1,0 \times 10^{-7}$ mbar. Durante o processo de implantação, a pressão foi mantida em $5,0 \times 10^{-7}$ mbar. A ventilação da câmara, assim como o resfriamento das amostras, foi feito com gás nitrogênio comercial (AirProduct, Allentown, Pensilvânia - EUA).

Os parâmetros fixados e variados no processo de implantação iônica a baixas energias estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros do processo de implantação iônica a baixas energias

Parâmetro	
Tensão na fonte de elétrons (kV)	6
Corrente de emissão (mA)	25
Corrente do filamento (A)	15,0
Energia BIAS (keV)	2 e 4
Tempo de processo (min)	30, 45, 60 e 90

Para fins de identificação, as amostras foram nomeadas levando-se em consideração a energia e o tempo de processo utilizados durante a implantação iônica. Assim, o acrônimo Ag/Ti2_30 representa a amostra de titânio com prata implantada, utilizando uma energia de 2 keV e um tempo de processo de 30 min, enquanto Ag/AISI2_60 representa a amostra de aço inoxidável AISI 304 com prata implantada, utilizando uma energia de 2 keV e um tempo de processo de 60 min. A denominação de todas as amostras encontra-se sumarizada na Figura 5.

Tabela 5: Denominação das amostras utilizadas nesse trabalho

Denominação das amostras		
Nome	BIAS (keV)	Tempo de processo (min)
Ag/Ti2_30	2	30
Ag/Ti2_45	2	45
Ag/Ti2_60	2	60
Ag/Ti2_90	2	90
Ag/Ti4_30	4	30
Ag/Ti4_45	4	45
Ag/Ti4_60	4	60
Ag/Ti4_90	4	90
Ag/AISI2_60	2	60
Ag/AISI4_60	4	60

Além das amostras descritas na tabela acima, preparou-se outras séries de amostras onde foram incluídas etapas de *etching* químico e a plasma, com a finalidade de remover

a camada de óxido que se forma espontaneamente na superfície do titânio [23]. No entanto, como não houve uma remoção significativa da camada de óxido [117], optou-se por não dar continuidade aos testes com essas séries de amostras, uma vez que o acréscimo de uma etapa ao processo não seria justificado com uma melhora significativa nos resultados finais.

Visando obter uma camada de sacrifício com fraca adesão que protegesse a superfície tratada da oxidação, foi produzida uma nova série de amostras que, após a implantação, receberam a deposição de um filme fino de prata de aproximadamente 4 nm de espessura. No entanto, não foi possível remover completamente o filme da superfície antes dos testes biológicos, o que poderia prejudicar o desempenho da amostra nos testes para comprovar sua ação bactericida, e por isso, esta hipótese foi descartada.

4.4 Caracterização físico-química

4.4.1 *Stopping and Range of Ions in Matter (SRIM)*

A simulação das trajetórias e perdas de energia dos íons foi realizada através do programa *Stopping and Range of Ion in Matter (SRIM 2008)*, pelo método de Monte Carlo [118]. Como resultado foram obtidas estimativas do perfil de concentração/profundidade dos íons Ag^+ implantados em diferentes energias e substratos. A energia do feixe estabelecida foi determinante na distribuição decorrente das características da interação dos íons com a matéria.

As simulações foram ajustadas com os padrões de baixa energia de aceleração do feixe de íons de prata de 2 e 4 keV, tanto para um alvo de titânio quanto para aço inoxidável AISI 304 austenítico.

As informações resultantes da simulação de Monte Carlo serviram de base para definir parâmetros da execução da implantação de íons prata em titânio e aço inoxidável

AISI 304.

4.4.2 Análise química elementar quantitativa

As análises quantitativas e elementares foram determinadas através da espectrometria de retro-espalhamento Rutherford (*Rutherford Backscattering Spectrometry* - RBS) em um acelerador de íons tipo Tandem de 3 MeV, utilizando feixe de íons monoenergético de He⁺ de 2 MeV e um ângulo de detecção de retro-espalhamento de 165°, do Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Através da detecção da energia das partículas retro-espalhadas foi possível determinar o espectro da composição elementar e também a quantidade de átomos presentes por centímetro quadrado da amostra, obtendo-se a densidade areal ou densidade de átomos (átomos cm⁻²) dos elementos presentes nas amostras. Nesse trabalho, a técnica permitiu determinar a quantidade de prata implantada nas amostras de titânio e aço inoxidável AISI 304, bem como a quantidade de prata remanescente após os testes de imersão das amostras em efluente industrial por tempos variados.

A quantificação do espectro de RBS, embora possa ser feita de forma absoluta, geralmente é realizada pela comparação das áreas dos picos de um padrão e da amostra que está sendo medida. Usualmente, utiliza-se um padrão de bismuto (Bi) implantado em silício, com uma quantidade conhecida de átomos de Bi. No caso de um filme fino revestindo a superfície do material, conhecendo a quantidade de átomos por centímetro quadrado e a densidade do material que está sendo analisado, consegue-se estimar a espessura do filme. A quantificação foi realizada, utilizando-se as áreas dos picos correspondentes a cada elemento de interesse, comparadas à área do pico de um padrão de Bi implantado em silício ($1,44 \times 10^{16}$ átomos cm⁻²).

A quantidade de átomos do material que se deseja conhecer é dada pela Equação 1 [119]:

$$Q_A = Q_{Bi} \cdot \frac{A_A}{N_A} \cdot \frac{N_{Bi}}{A_{Bi}} \cdot \frac{Z_{Bi}^2}{Z_A^2} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

Q = quantidade de átomos cm^{-2} do elemento;

A = área embaixo do sinal correspondente no espectro medido;

N = número total de íons incidentes;

Z = número atômico.

4.4.3 Quantificação de prata remanescente nas amostras após o tratamento do efluente industrial

Após serem retiradas do meio líquido (efluente industrial), as amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. A determinação da quantidade de prata presente nas amostras após os diferentes tempos de imersão foi realizada por RBS, seguindo o mesmo procedimento da quantificação inicial das amostras. Os efeitos citotóxicos de íons Ag^+ e AgNPs já foram relatados em diferentes linhagens celulares [109,113]. Juntamente com efeitos citotóxicos promissores de nanomateriais de prata, tem sido recentemente levantada muita preocupação sobre a questão de segurança destes compostos devido aos efeitos tóxicos indesejáveis de AgNPs e íons Ag^+ , tanto na saúde humana como no meio ambiente [109].

4.4.4 Determinação do perfil de profundidade

A espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (*Glow discharge optical emission spectroscopy* - GD-OES) é uma técnica muito poderosa que permite a

análise elementar qualitativa e quantitativa de sólidos homogêneos, além de realizar análises da profundidade para amostras em que se deseja uma avaliação da região próxima da superfície, ou ainda, interfaces filme fino-substrato. Nesta técnica, íons de argônio acelerados a tensões de 600 e 1500 V, colidem com alta energia cinética na amostra causando o *sputtering* de partículas atômicas da superfície da amostra. A energia transmitida para essas partículas atinge um nível tal que leva a estados excitados de uns poucos eV, sendo que o estado de equilíbrio dessas partículas é restabelecido pela emissão de um fóton de energia específica para cada elemento. Esses fótons são então analisados através de um espectrômetro óptico, onde é realizada a medida das intensidades das linhas emitidas [120].

A área analisada em GD-OES é relativamente grande (tipicamente 4 mm de diâmetro), mas a técnica pode ser aplicada até a profundidade aproximada de 100 µm. A resolução em perfil de profundidade por esta técnica analítica é praticamente dominada pela rugosidade da superfície da amostra. Uma vantagem do GD-OES é o curto tempo de medição, que é a razão pela qual este método é adequado para a análise de materiais na indústria. Além disso, a composição quantitativa e espessura de um filme de superfície podem ser obtidas por GD-OES. Se uma fonte de alimentação RF é utilizada como fonte de descarga luminescente, um filme de material não condutor pode também ser analisado por este método. Apesar da ênfase dada às vantagens de se utilizar a técnica de GD-OES para análise perfis de profundidade, informações importantes da superfície da amostra são obtidas por outros métodos [121].

Os perfis dos elementos químicos que constituem as amostras foram determinados através da técnica de GD-OES, em um equipamento da Horiba Scientific, modelo GD-Profiler 2, localizado no Laboratório de Caracterização de Superfícies em NanoEscala (LaCaSuNE) da UCS. A análise foi realizada a uma pressão de 650 Pa e a superfície do titânio foi bombardeada por íons Ar^+ em função do tempo de pulverização com uma

potência RF de 15 W.

4.5 Caracterização biológica

A caracterização biológica das amostras de Ti cp e AISI 304 foi realizada por diferentes testes e por esta razão, tanto a metodologia quanto os resultados são apresentados em seções diferentes para cada tipo de substrato.

4.5.1 Avaliação das amostras de titânio

A investigação do efeito de inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos sobre a superfície do titânio foi realizada em parceria com a equipe do Laboratório de Análise e Pesquisa em Alimentos (LAPA) da UCS.

Os micro-organismos selecionados para esse estudo foram as bactérias *E. coli* (ATCC – 25922) e *S. aureus* (ATCC – 25923). A escolha desses dois tipos de bactérias para o presente estudo se deve ao fato de ambas as espécies apresentarem alta virulência, tendo assim um elevado significado clínico [59,61].

A avaliação da modificação superficial quanto à sua toxicidade para as células humanas foi realizada pela equipe do Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA da UCS.

4.5.1.1 Teste de difusão em ágar

Os ensaios microbiológicos foram realizados em placas de Petri com ágar nutriente (Merck, São Paulo - SP). A eficiência bactericida das amostras de titânio tratadas com prata foi avaliada sobre a inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus*. As amostras das culturas dessas duas bactérias foram inicialmente diluídas em uma solução salina

peptonada 0,1% (m/v). Em seguida, foram adicionadas alçadas de cada micro-organismo em tubos separados, cada um contendo uma solução salina, até se obter uma turvação compatível à escala 0,5 de McFarland, de densidade celular bacteriana em torno de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). As suspensões das duas bactérias foram então espalhadas de forma homogênea no meio de cultura de cada placa de Petri com o auxílio de uma haste de algodão para que os filmes pudessem ser depositados na parte superior do ágar, sendo posteriormente incubados em uma estufa bacteriológica (Quimis Q-317B) a uma temperatura de 36 ± 1 °C, por um período de 48 h. Após o período de incubação, as placas de Petri foram analisadas com o objetivo de se avaliar visualmente a formação de *halos* ao redor e sob as amostras [122].

4.5.1.2 Tratamento do efluente industrial para reuso

O efluente industrial utilizado neste ensaio é proveniente de uma indústria metalúrgica da região da Serra Gaúcha, cuja composição é conhecida, mas não é apresentada devido ao sigilo industrial. As amostras de titânio e aço inoxidável AISI 304 tratadas com prata foram colocadas em contato com o efluente por diferentes períodos de tempo para avaliar a ação bactericida das mesmas ao longo do tempo.

4.5.1.3 Contagem de *Escherichia coli*

A contagem de coliformes e *E. coli* foi realizada com base no método 991.14 da *The Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (2012). A AOAC define coliformes como bacilos Gram-negativos produtores de ácido e gás, a partir da lactose durante a fermentação metabólica.

Esse método consiste na inoculação de 1 mL da amostra (sob a forma líquida) sobre uma placa 3M™ Petrifilm™ que posteriormente é incubada em uma estufa para cultura

bacteriológica, a 35 °C e por 24 h. A placa contém nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB), um agente geleificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glicuronidásica e um indicador de pH que facilita a enumeração da colônia. Colônias de coliformes que crescem na placa produzem ácido, fazendo com que o indicador de pH torne a cor do gel vermelho mais escuro.

As bactérias *E. coli*, por sua vez, produzem β -glicuronidase que formam um precipitado azul associado às colônias. Para isso, a placa onde foi realizada a identificação prévia dos coliformes deve ser novamente incubada em uma estufa, nas mesmas condições de temperatura e tempo.

O filme superior que recobre a placa retém o gás formado pelos coliformes, incluindo a *E. coli*, indicando a confirmação desses micro-organismos. Para fins de interpretação, a soma de ambas indica o número de coliformes totais presentes na amostra analisada (Figura 13).

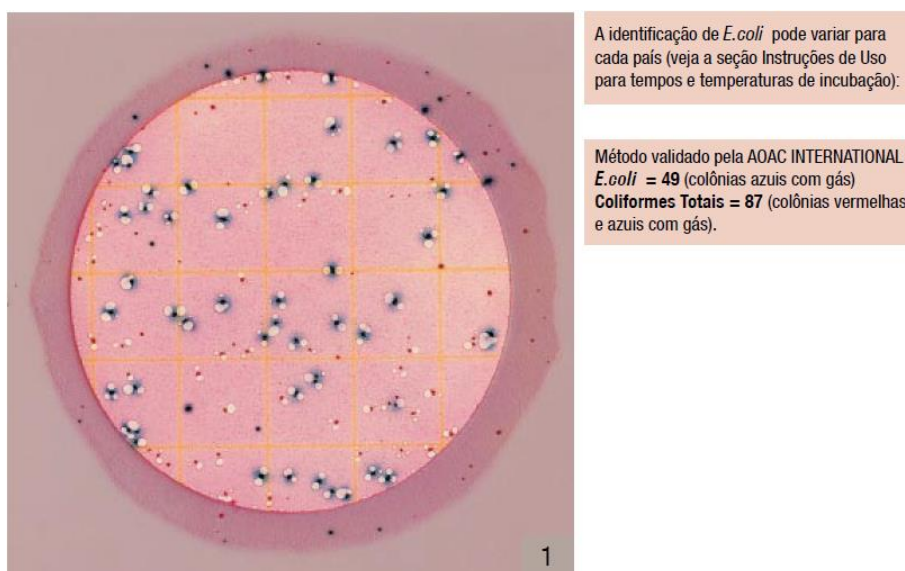


Figura 13: Imagem da placa 3M™ Petrifilm™ utilizada na contagem de coliformes e *E. coli*.

4.5.1.4 Utilização das amostras de titânio com prata implantada

A avaliação da eficiência bactericida das amostras de titânio com prata implantada,

frente a um efluente industrial para reuso, foi realizada utilizando-se apenas a amostra Ag/Ti4_45.

As amostras foram divididas/cortadas em partes iguais de 10×10 mm para promover uma maior superfície de contato com os micro-organismos presentes no efluente. Em seguida, as amostras cortadas e uma alíquota de 100 mL do efluente, devidamente homogeneizado, foram dispostos em Erlenmeyeres de 250 mL (3 partes da amostra em cada frasco). Os frascos foram identificados e acondicionados em uma mesa orbital para agitação. A agitação do sistema foi mantida constante em 150 rpm durante todo o ensaio. Nos intervalos de 5, 15, 30, 90 e 240 min, um Erlenmeyer foi coletado, do qual o efluente que ficou em contato com as amostras foi levada para a contagem de micro-organismos ainda presentes. As amostras de titânio com prata implantada retiradas do meio líquido foram encaminhadas para uma nova análise química elementar.

4.5.1.5 Avaliação da molhabilidade das amostras de titânio

O ângulo de contato foi medido pelo método da gota séssil, a partir de um aparato desenvolvido pelo Laboratório Pesquisa em Química dos Materiais (LPQM) da Universidade de Caxias do Sul, em que uma gota de água deionizada foi depositada sobre a das amostras de titânio por meio de uma microseringa. A gota foi observada por meio de uma lente de baixo aumento. O valor do ângulo de contato de uma gota de líquido depende da energia de superfície da amostra e da tensão superficial do líquido. O ângulo de contato foi determinado por meio de um programa de análise de imagens SurfTens 3.0.

4.5.1.6 Avaliação da viabilidade celular

Para determinar a citotoxicidade e a biocompatibilidade das amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 foram realizadas análises de contato indireto, de acordo com os métodos

descritos na norma ISO 10993-5-2009-2. Inicialmente, preparou-se a solução de extração utilizando as amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 ($3 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$), e meio de cultura DMEM (Dubelcco MEM - mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). O meio de cultura foi incubado em contato com as placas de Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 durante 24 h a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 para a obtenção da solução de extração.

4.5.1.7 Ensaio MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método indireto do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O método é baseado na redução do MTT pela enzima desidrogenase mitocondrial, na formação de cristais de formazan [123]. Resumidamente, as células MG-63 (osteossarcoma) foram semeadas a uma densidade de $5,0 \times 10^4$ células mL^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Após 24 h, as células foram tratadas com a solução de extração das amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 durante 1, 5 e 7 dias. Para o controle negativo, utilizou-se meio de cultura DMEM (10% de SFB e 1% P/S); para o controle positivo, utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) 5%, incubando-se a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 , no mesmo tempo citado acima. O meio de cultura foi removido e 1 mg mL^{-1} de MTT em meio isento de SFB e P/S foi adicionado aos poços. As amostras foram incubadas a 37°C durante 2 h em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 . Em seguida, retirou-se a solução de MTT e dissolveram-se os cristais de formazan em $100 \mu\text{L}$ de DMSO. Realizou-se a leitura espectrofotométrica a 570 nm em um leitor de microplacas (espectros Max190, Molecular Devices, EUA) e os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade. A

absorvância do controle negativo representou 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculadas como porcentagem do controle. As alterações na viabilidade celular analisadas pelo método indireto foram observadas e documentadas após 1, 5 e 7 dias de exposição às amostras tratadas (Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60).

A significância estatística foi avaliada utilizando *t*-teste e análise de sentido único de variância (ANOVA) com o teste de comparação de múltiplas médias (Turkey) para avaliar as diferenças estatísticas no caso da distribuição normal. Significância foi aceita para *p* inferior a 0,05 utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 19.0) para Windows.

4.5.1.8 GIEMSA: Ensaio de alteração morfológica

As células de osteossarcoma (MG-63) foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $5,0 \times 10^4$ células mL⁻¹ com 100 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Após 24 h, as células foram tratadas com a solução de extração das placas de Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 durante 1, 5 e 7 dias. Para o controle negativo, utilizou-se meio de cultura DMEM (10% de SFB e 1% P/S); para o controle positivo, utilizou-se DMSO 5%, incubando-se a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, no mesmo tempo citado acima. O meio foi removido e fixaram-se as células com metanol durante 5 min, adicionando-se solução de Giemsa (corante) durante 10 min na mesma placa. Por fim, visualizou-se a placa em microscópio óptico com ampliação de 200 vezes.

Os controles, positivo e negativo, servem para que se tenha uma base de comparação para as amostras de interesse, uma vez que esses controles constituem as condições extremas do ensaio. O controle negativo é realizado numa condição totalmente favorável à adesão e proliferação das células, sem qualquer indício de toxicidade. Já o

controle positivo utiliza um agente permeabilizante de membrana, que representa o máximo de danos que a célula pode sofrer. Com base nesses controles (positivo e negativo), quando se analisa as células distribuídas sobre as amostras com prata implantada, a avaliação é feita comparando se as morfologias se assemelham mais às células saudáveis ou se apresentam danos, que nesse caso indicariam efeito tóxico do tratamento das amostras.

4.5.1.9 Determinação de parâmetros de adesão, distribuição topográfica e padrões morfológicos de MG-63 (osteossarcoma) depositadas nas amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60

As células MG-63 (osteossarcoma) foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de $5,0 \times 10^4$ células mL⁻¹ para as análises de 1 e 5. Utilizou-se 1000 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) sobre as amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 durante 1 e 5 dias. Posteriormente, fixou-se as células com solução de glutaraldeído 3% em PBS (v/v) durante 15 min e com etanol 30, 50, 70, 90 e 100% (v/v) durante 10 min para cada concentração, para permitir seu manuseio no interior do microscópio eletrônico de varredura.

Após o ensaio e fixação das células, todas as amostras foram mantidas em dessecador até a realização da análise. Por fim, as amostras foram revestidas com ouro por *sputtering* por 1 min, a fim de torná-las condutoras para posteriormente serem observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A avaliação morfológica das células foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SuperScan SSX-550 em modo de alto vácuo com tensão máxima do feixe em 15 kV para não danificar as células fixadas no Laboratório Central de

Microscopia “Professor Israel Baumvol” da Universidade de Caxias do Sul.

4.5.2 Avaliação da adesão bacteriana nas amostras de AISI 304

A investigação do efeito de inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos sobre a superfície do titânio com prata implantada foi realizada pela equipe do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS.

Os micro-organismos selecionados para esse estudo foram as bactérias *Salmonella enteritidis* (SE86), isolada de repolho envolvido em surto alimentar no Rio Grande do Sul, e *Listeria monocytogenes* (J11), isolada de abatedouro frigorífico com inspeção federal (SIF) do Rio Grande do Sul. A escolha dessas cepas de bactérias para o presente trabalho se deve ao fato de ambas terem sido responsáveis por importantes incidentes de contaminação alimentar [78].

Previamente aos ensaios de adesão bacteriana, as amostras AgAISI2_60 foram autoclavadas a 121 °C, por 15 min, e, então, secas a 60 °C, por 2 h [adaptado de 124]. As amostras foram mantidas em frascos individuais esterilizados e identificados para cada corpo de prova, à temperatura ambiente, até o momento dos experimentos.

4.5.2.1 Tratamento de desoxidação

O tratamento de desoxidação foi realizado nas amostras implantadas com prata, a fim de reduzir a ação do oxigênio sobre esse elemento químico. Isso foi realizado para preservar a ação bactericida dos íons Ag^+ , pois a energia de ligação não permite que a prata se ionize tão facilmente.

As amostras de aço inoxidável AISI 304, sem e com a incorporação de prata, foram adicionados a tubos contendo uma solução à base de hidróxido de sódio (15% de acetona

e 85% de NaOH 0,1 mol L⁻¹). Em seguida, eles foram submersos na solução e, então, aquecidos em banho-maria, durante 15 min, com os tubos destampados. Por fim, os corpos de prova foram retirados dos tubos com auxílio de uma pinça e secos com papel toalha não reciclável [21].

4.5.2.2 Contaminação experimental dos corpos de prova (Ag/AISI) e avaliação da adesão bacteriana

Os corpos de prova (aço inoxidável AISI 304) com prata implantada foram imersos em 100 mL de meio de cultura BHI (do inglês *brain heart infusion*) (OXOID, Basingstoke, Inglaterra) contendo culturas individuais das bactérias na concentração de aproximadamente 10⁶ UFC mL⁻¹, à temperatura ambiente e mantidos em contato com a cultura por 1 h para avaliar a inibição bacteriana e também 24 h para avaliar as células em biofilme [adaptado de 125].

Em seguida, as amostras foram lavadas com 1 mL de água destilada para remover as células pouco aderidas. Posteriormente, foram imersos em 25 mL de água peptonada 0,1% e imediatamente tratados em banho ultrassônico, por 10 min, para que as células aderidas se soltassem da superfície [38]. Diluições da solução de cada amostra foram preparadas, sendo que 20 µL das mesmas foram semeados em TSA (Tryptic Soy Agar, OXOID, Basingstoke, Inglaterra) e TSA adicionado de 0,6% de extrato de levedura (para *S. enteritidis* e *L. monocytogenes*, respectivamente), pelo método da gota [126]. Após, foram incubados a 37 °C, por 18 h e 48 h, para *S. enteritidis* e *L. monocytogenes*, respectivamente, para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

A taxa de redução bacteriana (RB) foi determinada através da Equação 2

$$RB(\%) = \frac{100(N1 - N2)}{N1} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde:

N1: número de bactérias aderidas nas superfícies não tratadas;

N2: número de bactérias aderidas nas superfícies tratadas.

Os experimentos foram realizados em duplicata e cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes.

4.5.2.3 Análise estatística

Para a avaliação estatística dos dados obtidos com os testes de adesão (UFC cm⁻²), os valores foram convertidos em log₁₀ UFC. Em todos os casos, amostras em duplicata foram utilizadas e o experimento repetido pelo menos duas vezes. Para analisar os dados obtidos com os testes de adesão, foi realizada análise de variância com o *software* SPSS versão 21 e utilizado Teste de *Turkey's* para comparar as médias, e uma $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

5 Resultados e discussão

5.1 Implantação iônica a baixas energias de íons Ag^+ em titânio

5.1.1 Simulação de Monte Carlo

As simulações de Monte Carlo foram cruciais na definição dos parâmetros empregados no processo de implantação. A trajetória e as perdas de energias dos íons Ag^+ durante a implantação ocorrem de forma gradual dentro do material alvo via colisões com átomos do alvo (o que causou uma transferência abrupta de energia) ou via interações entre o íon acelerado e os orbitais eletrônicos dos átomos do material alvo, sendo esse segundo efeito considerado um processo contínuo de perda de energia [118].

Os resultados das simulações encontram-se nas Figura 14 (a) e (b), onde pode ser observado que com o método de implantação deste trabalho se atinge uma modificação de até 10 nm, abaixo da superfície. Para uma energia de 4 keV a maior concentração de íons Ag^+ implantados encontra-se em aproximadamente 4 nm de profundidade, e para 2 keV, em torno de 3 nm. Para ambas energias avaliadas o perfil de implantação é representado por uma curva Gaussiana. É possível observar que as aproximações dos perfis de concentração/profundidade dos íons Ag^+ implantados são fortemente dependentes da energia de implantação, da espécie inserida e da composição do substrato. Quanto maior a tensão de polarização aplicada, maior é a energia com que os íons colidem com os átomos do material alvo, e conseqüentemente, o alcance de penetração das espécies implantadas estende-se alguns nanômetros da superfície.

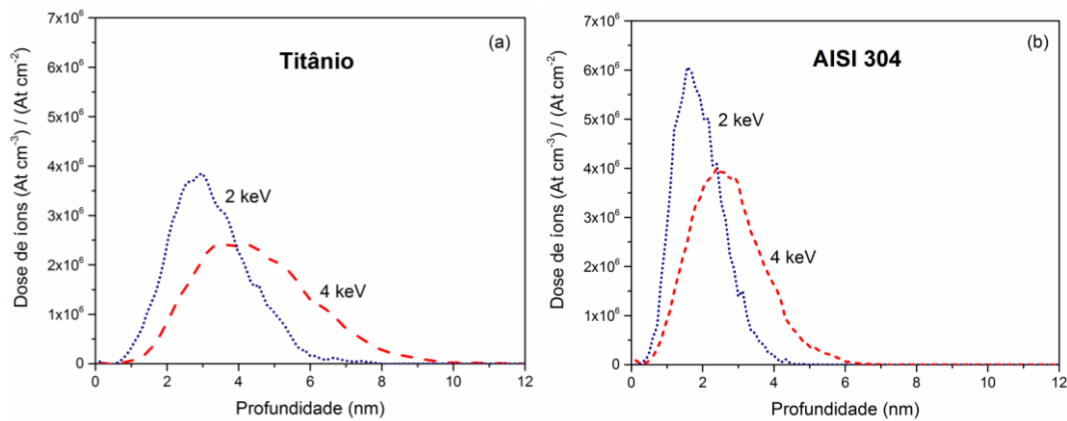


Figura 14: Simulação dos perfis de concentração/profundidade de Ag^+ implantada a 2 e 4 keV em (a) titânio, e em (b) AISI 304.

Com base nestas informações supõe-se que devido ao fato da maior quantidade da prata implantada estar numa região bem próxima da superfície, poderia ser mais facilmente ionizada. E dessa forma, migrar do material para o meio de maneira mais espontânea, favorecendo a inibição parcial ou total da adesão de microrganismos.

5.1.2 Análise química elementar quantitativa

Através da análise por RBS foi possível determinar a quantidade de átomos de prata por centímetro quadrado (átomos cm^{-2}) implantados em cada amostra. Na Figura 15, é possível observar o espectro de RBS para a amostra Ag/Ti4_60, o qual é constituído por sinais característicos de titânio (substrato) e de prata. Além de identificar os constituintes da amostra, observando o espectro não foi detectado nenhum pico característico de outro elemento químico. Dessa forma é possível afirmar que não há contaminantes na amostra ou caso exista, a sua quantidade é inferior ao limite de resolução da técnica que é de aproximadamente $2,24 \times 10^{15}$ átomos cm^{-2} .

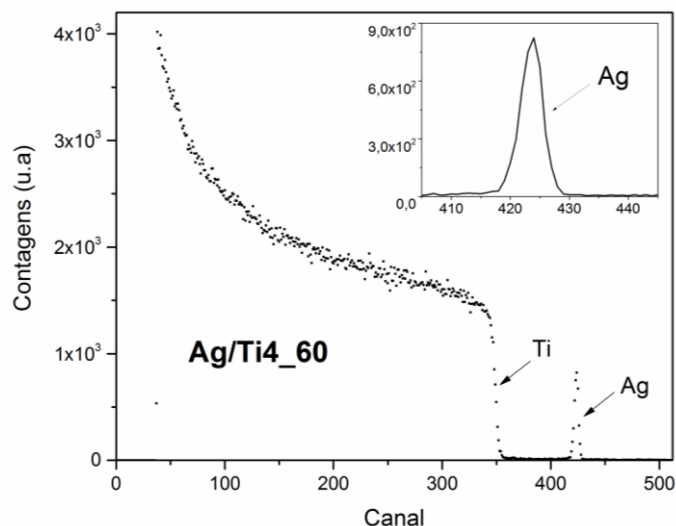


Figura 15: Espectro de RBS da amostra Ag/Ti4_60 onde se identifica os elementos Ti e Ag que compõem a amostra.

No detalhe do gráfico está representada uma aproximação do perfil do pico de prata para facilitar a visualização. É possível observar que o perfil de implantação de prata está representado por uma curva semelhante a uma Gaussiana, a qual é equivalente a uma distribuição normal, e Lorentziana onde esta é equivalente a uma distribuição relativa de *Cauchy-Lorentz* para a concentração de prata na superfície do titânio.

Os valores da densidade areal das amostras, ou concentração de íons Ag^+ implantados, obtidos para cada condição de energia e tempo de processo estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6: Concentração de íons Ag^+ implantados nas amostras desse trabalho.

Amostra	Concentração de íons implantados (átomos $\cdot \text{cm}^{-2}$)
Ag/Ti2_30	$2,24 \times 10^{15}$
Ag/Ti2_45	$8,99 \times 10^{15}$
Ag/Ti2_60	$3,92 \times 10^{15}$
Ag/Ti2_90	$2,10 \times 10^{15}$
Ag/Ti4_30	$4,24 \times 10^{15}$
Ag/Ti4_45	$3,35 \times 10^{15}$
Ag/Ti4_60	$1,13 \times 10^{16}$
Ag/Ti4_90	$6,70 \times 10^{15}$
Ag/AISI2_60	$5,61 \times 10^{16}$
Ag/AISI4_60	-

Os valores encontrados indicam que as concentrações implantadas dependem do tempo e da energia de implantação, que influencia diretamente na profundidade de implantação, e conseqüentemente na concentração obtida. Ou seja, maior o tempo de processo e maior a energia aceleração dos íons, estão associados a concentrações maiores. A tendência observada de que a concentração aumenta com o tempo e após um determinado intervalo apresenta um decréscimo será discutida a seguir.

As amostras de aço inox (Ag/AISI) foram caracterizadas primeiramente quanto à sua atividade bactericida e devido ao fato da amostra Ag/AISI4_60 não ter apresentado eficiência significativa (testes não exibidos neste trabalho), optou-se por não realizar sua caracterização físico-química.

Alguns pesquisadores investigaram propriedades bactericidas do carbono pirolítico implantado com íons Ag^+ utilizando *S. aureus* e *E. coli*. A implantação foi realizada a uma energia de 70 keV com a concentração variando de $5,0 \times 10^{14}$ a $5,0 \times 10^{18}$ átomos cm^{-2} . Os resultados mostraram que a eficiência bactericida para *S. aureus* e *E. coli* aumenta com a concentração de prata até a saturação em $5,0 \times 10^{17}$ átomos cm^{-2} , quando a ação bactericida se mantém em 97%, mesmo com concentrações superiores [127].

A literatura apresenta um estudo preliminar sobre mecanismos antibacterianos envolvendo a prata em aço inoxidável AISI 420, no qual verificou-se que a prata encontram-se no estado metálico ajustado pelas funções gaussianas na camada implantada, com a concentração máxima de 3,3% atômico. A maior concentração de prata encontra-se em aproximadamente 45 nm sob a superfície com alcance máximo em torno de 80 nm com tensão de extração de 50 kV. O aço inoxidável implantado com prata apresentou excelente atividade bactericida contra *E. coli* na concentração de implantação superior a $1,0 \times 10^{17}$ átomos cm^{-2} . A taxa de redução de bactérias contra *E. coli* melhora com o aumento da concentração de implantação de prata, de 77,7% a 5×10^{15} átomos cm^{-2}

² para 98,4% a $1,0 \times 10^{18}$ átomos cm^{-2} [20].

Todas as amostras produzidas no presente estudo apresentam concentrações implantadas na ordem de $1,0 \times 10^{15}$ a $5,0 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2} , valores que se encontram bem abaixo daqueles reportados pela literatura (acima de $1,0 \times 10^{17}$ átomos cm^{-2}) [3,127]. No entanto, nesses trabalhos os autores utilizaram energias muito mais altas na implantação (na ordem de dezenas de keV) em comparação aos 2 e 4 keV utilizados nesse estudo.

Em todos ensaios realizados (com 2 keV e 4 keV) observou-se que a maior concentração de prata implantada ocorreu para as amostras tratadas por 60 min. A concentração aumenta à medida que o tempo de processo aumenta; no entanto, quando submetidas ao processo de implantação por 90 min obteve-se uma concentração menor. Este resultado pode ser atribuído ao fato que talvez tenha sido atingido o limite de saturação de prata na taxa em que está ocorrendo a implantação. De acordo com a literatura, a prata implantada em silício com energia de 30 a 80 keV atinge a saturação com concentrações de $6,0$ a $7,0 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2} [128]. Desta forma, os parâmetros adotados para as implantações realizadas no presente trabalho sugerem que, por se tratar de uma região mais próxima da superfície, a saturação é atingida com concentrações de aproximadamente $4,0 \times 10^{15}$ átomos cm^{-2} para 2 keV e $1,0 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2} para 4 keV.

5.1.3 Determinação do perfil de profundidade

A caracterização por GD-OES corroborou para uma análise qualitativa, representando um perfil de profundidade para cada elemento que compõe as amostras. Os perfis dos elementos químicos presentes na amostra a uma determinada profundidade são estabelecidos pela tensão aplicada e o tempo de ensaio (tempo de pulverização).

As Figura 16 (a) e (b) mostram o detalhe ampliado da análise de GD-OES para as

amostras que apresentaram, respectivamente, a menor e a maior concentração de prata implantada. Para ambas, é possível observar que os perfis de prata e titânio se sobrepõem e também que o perfil de titânio tem início antes do perfil de prata, confirmando que a prata está implantada na superfície do titânio. O perfil de titânio não apresentou um crescimento abrupto, o que indicaria a presença de um filme, mas um crescimento gradual, sendo este mais um indício de que a houve a implantação.

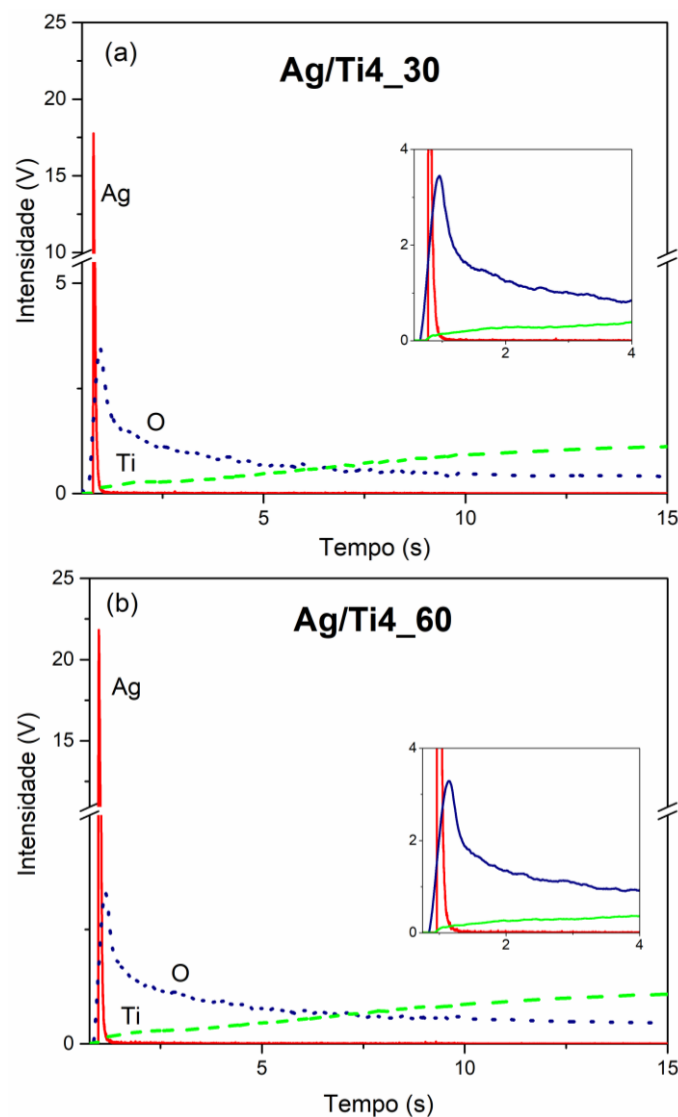


Figura 16: Perfil dos elementos em profundidade obtido por GD-OES para as amostras de titânio com prata implantada a 4 keV por (a) 30 min e (b) 60 min.

Comparativamente, observa-se uma maior intensidade do pico de prata na Figura

16 (b), indicando maior concentração em relação à Figura 16 (a) que foi tratada com metade do tempo de implantação da primeira.

O perfil de implantação da prata é representado por uma curva semelhante a uma Gaussiana e Lorentziana, semelhante ao que foi observado nos resultados de RBS.

O oxigênio detectado nas amostras possivelmente se encontra na forma de óxidos de prata e titânio, o que se deve ao fato da prata apresentar uma baixa energia de ionização e de o titânio formar uma camada passiva de óxido quando exposto a um meio oxidante à temperatura ambiente [23].

Foi proposta uma relação do tempo de sputtering com a profundidade estimada através da simulação de Monte Carlo. A representação do alcance da profundidade da prata no titânio para esse estudo está ilustrada na Figura 17.

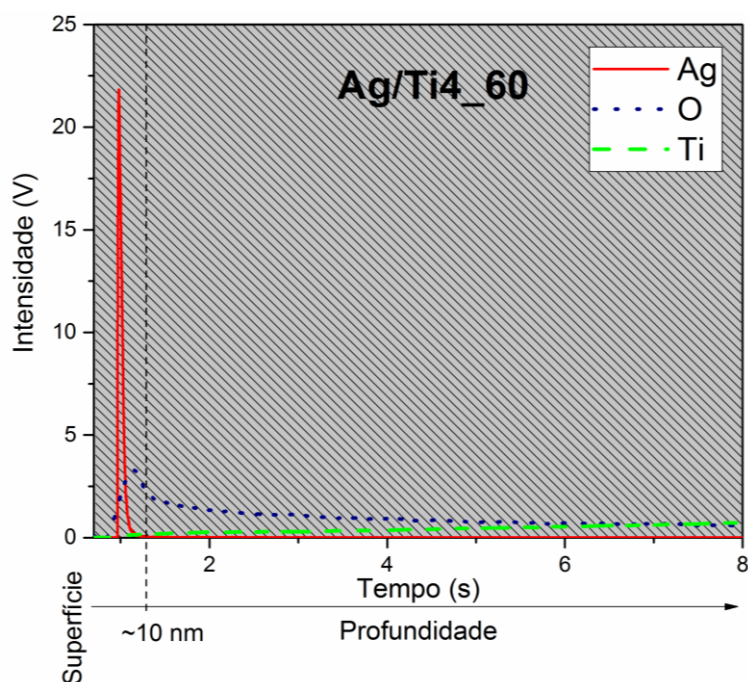


Figura 17: Representação do alcance da profundidade da prata implantada no titânio para a amostra Ag/Ti4_60.

5.1.4 Correlação entre os resultados de RBS e GD-OES e simulação

Conforme foi possível verificar, visivelmente há uma correlação entre as análises

de RBS e GD-OES propostas nesse estudo, apresentando uma complementação entre os resultados das caracterizações físico-químicas.

Na análise por RBS, a distribuição da quantidade de prata foi representada por uma curva Gaussiana. Essa mesma característica também foi observada nos resultados de GD-OES, ou seja, em ambas é possível inferir que a distribuição de prata na superfície do titânio é uma distribuição normal.




Essa correlação está de acordo com o resultado obtido na simulação de Monte Carlo, comprovando também que a prata está implantada no titânio a uma profundidade de 1 a 10 nm.

A veracidade da correlação dos resultados apresentados até então corrobora com dados da literatura para afirmar que a utilização da simulação de Monte Carlo para definir previamente parâmetros de processo é perfeitamente viável [21,98].

5.1.5 Avaliação da hidrofobicidade das amostras

Na Tabela 7 são apresentados os valores dos ângulos de contato para as amostras de titânio puro (Ti cp), Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60:

Tabela 7: Valores dos ângulos de contato para as amostras de titânio puro (Ti cp), Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60

Amostra	Ângulo de contato	Imagem
Ti cp	$107,6^\circ \pm 1,01$	
Ag/Ti2_60	$97,3^\circ \pm 0,48$	
Ag/Ti4_60	$102,7^\circ \pm 0,55$	

As amostras tratadas com prata apresentam ângulo de contato menor do que a do substrato puro, o que indica que a superfície do titânio após a implantação de prata torna-se menos hidrofóbica [129], ou seja, a superfície apresenta maior facilidade para a formação de uma camada fina de água capaz de dificultar a ancoragem inicial de bactérias que poderiam iniciar a formação de um biofilme [87]. Por outro lado, a redução da hidrofobicidade favorece a adesão de células e, conseqüentemente, a osteointegração do biomaterial [129].

O ângulo de contato obtido para a amostra cuja implantação foi feita com 2 keV (Ag/Ti2_60) é menor do que aquele obtido na amostra com 4 keV (Ag/Ti4_60), o que pode ser explicado pelo fato de que com menor energia a maior quantidade de prata implantada encontra-se numa região mais próxima da superfície, resultando possivelmente numa maior modificação na topografia da superfície da amostra [130,131].

5.1.6 Teste de difusão em ágar

O aspecto visual das placas (Ag/Ti4_45) analisadas sugere que houve uma inibição discreta no crescimento da bactéria *E. coli* que é um micro-organismo Gram-negativo.

Nas Figuras 18 (a) e (b) são apresentados os resultados de inibição para amostra de titânio puro (Ti cp) e para a amostra Ag/Ti4_45, na qual foi possível perceber visualmente a formação de um *halo* ao redor da placa, que constituiria um indício de que essa amostra apresenta propriedades bactericidas.

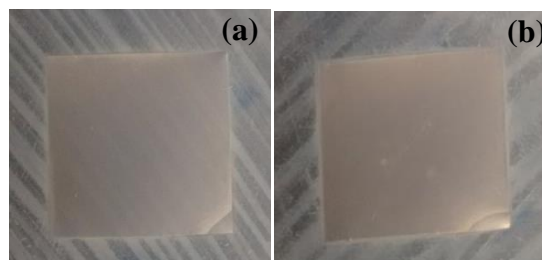


Figura 18: Imagem do teste de difusão em ágar com *E. coli*: (a) titânio puro (Ti_cp) e (b) amostra Ag/Ti4_45.

O segundo conjunto de ensaios mostrou que a amostra Ag/Ti4_45 apresenta também ação inibitória contra a *S. aureus*, que é uma bactéria Gram-positiva. A Figura 19 mostra o resultado para essa amostra, na qual foi possível perceber visualmente a formação de um pequeno *halo* ao redor da placa, que constituiria um indício de que a amostra apresenta igualmente propriedades bactericidas em relação a esse outro micro-organismo.

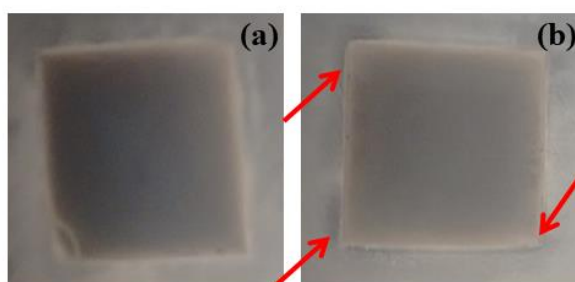


Figura 19: Imagem do teste de difusão em ágar (*Staphylococcus aureus*) para (a) titânio puro (Ti_cp) e (b) amostra Ag/Ti4_45.

Outra observação importante é que sob as placas não houve crescimento algum, pois caso isso tivesse ocorrido, as placas teriam se deslocado para os lados. Uma vez que a área de contato dos substratos de titânio com o ágar é muito pequena, devido à sua fina espessura, os *halos* formados ao redor das amostras nas placas de Petri são discretos [132].

5.1.7 Verificação da eficiência do tratamento do efluente industrial utilizando as amostras com Ag

A amostra Ag/Ti4_45 foi escolhida para o teste de tratamento do efluente por ter apresentado indícios de ação bactericida no teste de difusão em Agar. Já as amostras Ag/Ti4_30 e Ag/Ti4_60 foram escolhidas apresentarem a menor e a maior quantidade de prata implantada, respectivamente.

As amostras foram imersas em 100 mL de efluente industrial por diferentes intervalos

de tempo. No final do tratamento, procedeu-se à contagem de *E. coli* em cada um dos ensaios realizados. A contagem de *E. coli* em função do tempo de contato para as três condições é mostrada nas Figuras 20 (a), (b) e (c).

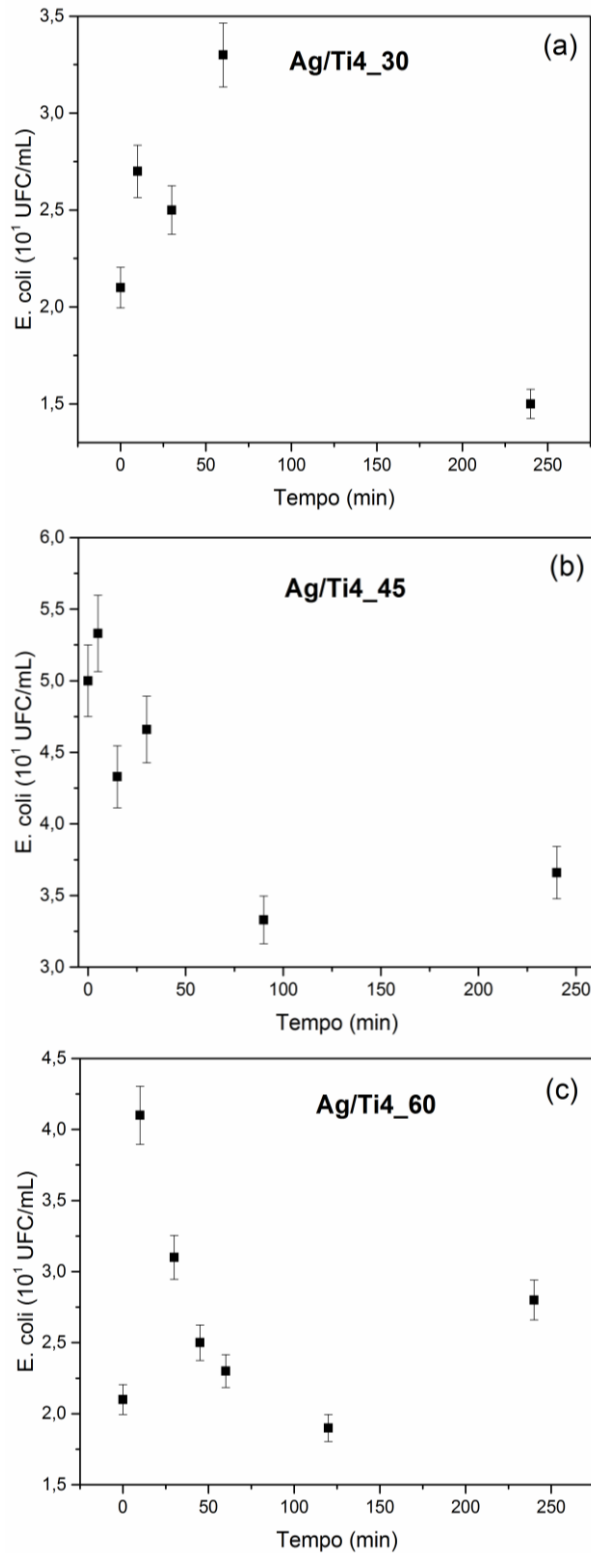


Figura 20: Contagem de *E. coli* em relação ao tempo de contato das amostras com o efluente industrial para (a) Ag/Ti4_30 (b) Ag/Ti4_45 e (c) Ag/Ti4_60.

A tendência observada em todos os ensaios é que: a população de *E. coli* do efluente industrial aumenta rapidamente nos primeiros minutos em contato com amostras tratadas com prata até atingir um máximo e então começa a decrescer. A concentração máxima de *E. coli* é atingida em cerca de 5 min para a amostra Ag/Ti4_45 (Figura 20 (b)), cerca de 10 min para Ag/Ti4_60 (Figura 20 (c)) e 60 min ou mais para Ag/Ti4_30 (Figura 20 (a)).

Isto indica que o efeito bactericida existe (devido à diminuição da população de *E. coli* após um determinado período), mas não ocorre imediatamente a partir do contato. De fato, é compreensível que a lixiviação de íons Ag^+ da região abaixo da superfície para o efluente não seja instantânea e que, uma vez liberados para o meio, o processo de eliminação pode levar alguns minutos (de 5 a 60 min dependendo dos parâmetros experimentais). Esse suposto retardamento da ação bactericida das amostras teoricamente dependeria da distância das partículas de prata à superfície, e da densidade ou quantidade de partículas. Isso pode explicar, por exemplo, por que para o processo de implantação, a fase de diminuição do número de *E. coli* ocorre mais cedo para a amostra implantada por 60 min (Figura 20 (c)) do que para a implantada por apenas 30 min (Figura 20 (a)). De fato, quanto maior o tempo de implantação, maior o número de partículas implantadas e, conseqüentemente, maior a densidade de partículas perto da superfície, que supostamente podem ser lixiviadas para o meio e ter ação bactericida.

Devido a este período latente em que as partículas de prata ainda não estão ativas e ao ambiente favorável para a multiplicação das bactérias durante o teste (temperatura de incubação de 25 °C), observa-se uma fase de expansão bacteriana nos primeiros minutos, até que a prata comece a agir eliminando-as. Nessas condições favoráveis à multiplicação, a única explicação para a diminuição da concentração de *E. coli* no efluente é a ação da prata, que constitui um indício das propriedades bactericidas de todas as amostras avaliadas.

No gráfico da amostra Ag/Ti4_60 (Figura 20 (c)), que contém mais informações, uma vez que uma maior quantidade de amostras com esses parâmetros foi elaborada, é possível verificar que a população de *E. coli* atinge um mínimo de cerca de 120 min após o início da incubação, antes de iniciar lentamente um novo aumento. Essa recuperação da atividade bactericida pode ser devida, se não a um erro experimental, ao consumo de toda a prata disponível. Na verdade, o aumento da população bacteriana sugere que a taxa de multiplicação seja maior do que a taxa de bactérias mortas. O aumento da taxa de multiplicação bacteriana é improvável, uma vez que a população bacteriana foi reduzida à metade em menos de 2 h (entre 10 e 120 min), o que permite supor que nessa fase ocorre a exaustão de partículas de prata ativas. Isso pode ser atribuído ao fato de que as partículas de prata já estão ativas, atuando na morte das primeiras bactérias e precisam de algum tempo para atacar outras bactérias, ou simplesmente não há partículas de prata suficientes no substrato e após um determinado tempo de eficiência, as partículas de prata ficam em menor número. A tensão de aceleração na implantação deve ser suficientemente baixa para que as partículas de prata sejam implantadas muito próximas da superfície e sejam capazes de se desprender facilmente do substrato, mas também suficientemente altas para garantir certa dispersão em profundidade das partículas para permitir uma liberação contínua.

Nesse caso, seria importante avaliar o comportamento dessas amostras em outros tempos, a fim de verificar se o aumento da população bacteriana é definitiva ou temporária. Se for definitiva, isso significa que o substrato precisa de uma maior concentração de partículas de prata perto da superfície. Entretanto, também poderia existir algum tipo de ciclo, onde a taxa de crescimento das bactérias e a taxa de ação da prata estariam em um equilíbrio, periodicamente desestabilizado pelo atraso da ação da prata sobre as bactérias sucessivas.

Também não é impossível que as outras duas amostras avaliadas Ag/Ti4_30 e

Ag/Ti4_45 apresentem um comportamento semelhante, uma vez que há intervalos de tempo maiores. Além disso, sem se conhecer os dados nesses intervalos não se pode afirmar com certeza qual é o comportamento desses gráficos. Essas curvas podem apresentar um mínimo neste período e aumentar novamente para os resultados obtidos em 240 min. Após 4 h de contato com as amostras tratadas, o efluente contém mais bactérias do que no início em todos os casos, com exceção da amostra Ag/Ti4_30. Sendo assim, ou não há partículas de prata disponíveis, pelas possíveis razões explanadas anteriormente, e há um aumento na população de bactérias; ou a concentração de bactérias tende a diminuir, mas a uma taxa muito lenta. Por isso torna-se necessário uma maior quantidade de dados em intervalos menores de tempo, inclusive acima de 4 h, a fim de conseguir traçar uma curva mais precisa da quantidade de bactérias no efluente tratado em função do tempo de contato com as amostras contendo prata.

Devido ao fato de os testes de desinfecção do efluente industrial terem sido realizados como uma das últimas etapas do trabalho, não houve tempo hábil para produção de quantidade suficiente de amostras para repeti-lo e obter os dados estatísticos necessários para resultados mais conclusivos.

5.1.8 Avaliação da quantidade de Ag lixiviada após o tratamento do efluente

A amostra Ag/Ti4_45 utilizada no tratamento do efluente industrial foram novamente analisadas por RBS, a fim de se traçar um perfil da quantidade de prata remanescente em função do tempo que estas permaneceram em contato com o efluente. Esse perfil encontra-se representado na Figura 21.

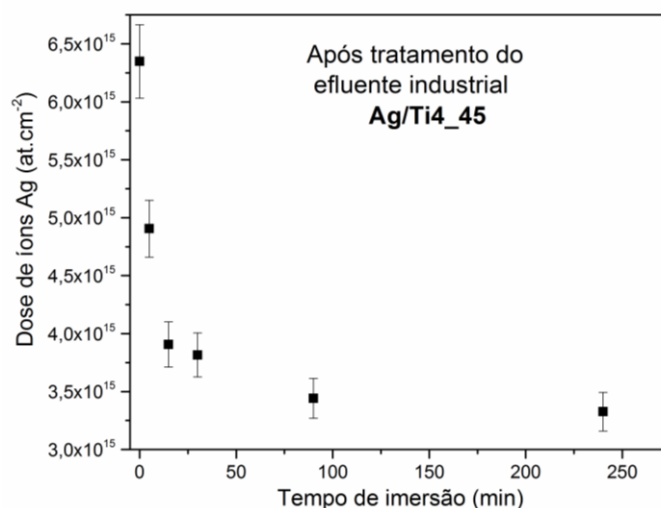


Figura 21: Quantificação de prata presente na amostra Ag/Ti4_45 após sua utilização no tratamento do efluente industrial.

Como pode ser constatado, para todas as amostras utilizadas no tratamento do efluente a concentração de prata é menor do que a inicial (no tempo zero e que corresponde à densidade areal obtida após 45 min de implantação), sendo que quanto maior o tempo que estas permaneceram imersas, menor a quantidade de prata remanescente.

Nos primeiros 5 min foi lixiviada cerca de 22,7 % da concentração inicial de prata implantada e ao final dos 240 min a redução devido a lixiviação foi de 47,6%. Ou seja, apenas 52,4% da concentração inicial de prata permanece incorporada no substrato de titânio.

De acordo com a literatura, a concentração de íons Ag^+ lixivados de amostras de aço inox aumenta à medida que a concentração de íons Ag^+ nas amostras é maior. Um estudo de 2013 mostrou uma lixiviação de 35 ± 16 ppb quando a concentração implantada era de $5,0 \times 10^{15}$ átomos cm^{-2} até 255 ± 20 ppb para a concentração implantada de $1,0 \times 10^{18}$ átomos cm^{-2} . O material estudado exibiu atividade bactericida duradoura (taxa de remoção > 90%) após exposição ao ar ou imersão em água da torneira por mais de um ano [15].

Considerando a hipótese levantada no item 4.5.1.2 de que após um determinado tempo não haja quantidade suficiente de íons Ag^+ para continuarem eliminando as bactérias, esses dados indicam que mesmo com mais da metade da concentração inicial de prata nas amostras, talvez a profundidade das partículas de prata remanescentes em relação à superfície seja tal que a energia necessária para ionizá-las e fazer com que se desprendam do substrato seja maior do que a energia disponível no sistema.

Para se comprovar essa hipótese seria necessário realizar novos testes com as amostras implantadas a 2 keV, nas quais a maior concentração de prata encontra-se numa região ainda mais próxima da superfície do que as implantadas com 4 keV.

Outra possível justificativa para as taxas de remoção não serem tão eficientes quanto o que é reportado pela literatura seria a presença de oxigênio nas amostras, conforme foi verificado pela análise de GD-OES. Quando os átomos de prata se encontram ligados, formando AgO , por exemplo, a energia necessária para que ocorra a ionização é muito maior do que quando está disponível no estado Ag^0 [106].

5.1.9 Avaliação da citotoxicidade do tratamento

Visando à obtenção de titânio com propriedades bactericidas que possa ser utilizado como implantes para o corpo humano e levando-se em consideração o que já foi explanado ao longo desse trabalho, avaliou-se a utilização $\text{Ag}/\text{Ti}_2_{60}$ e $\text{Ag}/\text{Ti}_4_{60}$ (por serem as amostras cujo tratamento resultou na maior quantidade de prata implantada) quanto às suas características bioativas. Entretanto, para a obtenção dessas características, entende-se que a morfologia, bem como parâmetros de superfície são extremamente relevantes para o comportamento biológico e conseqüentemente para a resposta de implantes de titânio com prata implantada na superfície. Os comportamentos celulares tais como adesão, alteração morfológica, alteração funcional e proliferação são muito

afetados pelas propriedades de superfície, incluindo hidrofobicidade, rugosidade, textura e morfologia [133,134].

De acordo com a literatura, a adesão celular sobre titânio é influenciada principalmente pela rugosidade e pela natureza química da superfície. Usando ataque ácido, os autores pretendiam modificar a textura de superfície do titânio, melhorando a topografia superficial e a biocompatibilidade da superfície. Para isso, as amostras foram tratadas com uma solução mista de HCl-HF-H₃PO₄ em diferentes concentrações, tempo de tratamento e adição de cloreto de cálcio. Os resultados revelaram que as variações de concentração de ácido na solução mista têm um efeito significativo na morfologia e na rugosidade da superfície. A rugosidade da superfície apresentou um aumento significativo quando o tempo de exposição aumentou. Nesse estudo, os autores observaram uma correlação positiva entre as propriedades superficiais dos materiais (rugosidade superficial e química superficial) e respostas biológicas. Foi comprovada a presença de elemento fósforo nas superfícies das amostras. A incorporação desses elementos na estrutura do titânio poderia induzir à formação de apatita e melhorar o contato osso-implante. Esses resultados sugerem que a presença de fósforo e cálcio na superfície do titânio afeta positivamente a sua biocompatibilidade. Além disso, a topografia em nanoescala é uma forma eficaz de alterar interações proteicas com uma superfície [135].

Nesse contexto, sabe-se que a adesão e proliferação celular são preferencialmente favorecidas sobre superfícies hidrofílicas, devido ao favorecimento da adsorção de proteínas, tais como fibronectina e vitronectina, que possuem papel fundamental na adesão celular [135,136].

Um estudo publicado anteriormente avaliou o comportamento de adesão em células MG63 sobre titânio contendo diferentes concentrações de cobre na sua composição, concluindo que a adesão e proliferação celular não foi prejudicada pela adição de um

elemento (cobre) ao titânio, em relação ao titânio puro [137].

As amostras modificadas Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 e analisadas nesse trabalho apresentaram crescimento celular superior ao comportamento de adesão que é verificado sobre o titânio puro (Ti_cp), conforme pode ser constatado visual e comparativamente na Figura 22, com um aumento de 500x. Nas micrografias a parte mais clara com ranhuras corresponde ao substrato de titânio e as células são observadas como estruturas prolongadas e mais escuras nas imagens. Na superfície da amostra Ag/Ti2_60 de 5 dias houve aumento no número de células em relação à de 1 dia e também na comparação com o titânio puro (Ti_cp). Especialmente na análise da amostra Ag/Ti4_60, é possível observar que em 5 dias houve um crescimento capaz de recobrir praticamente toda superfície do titânio.

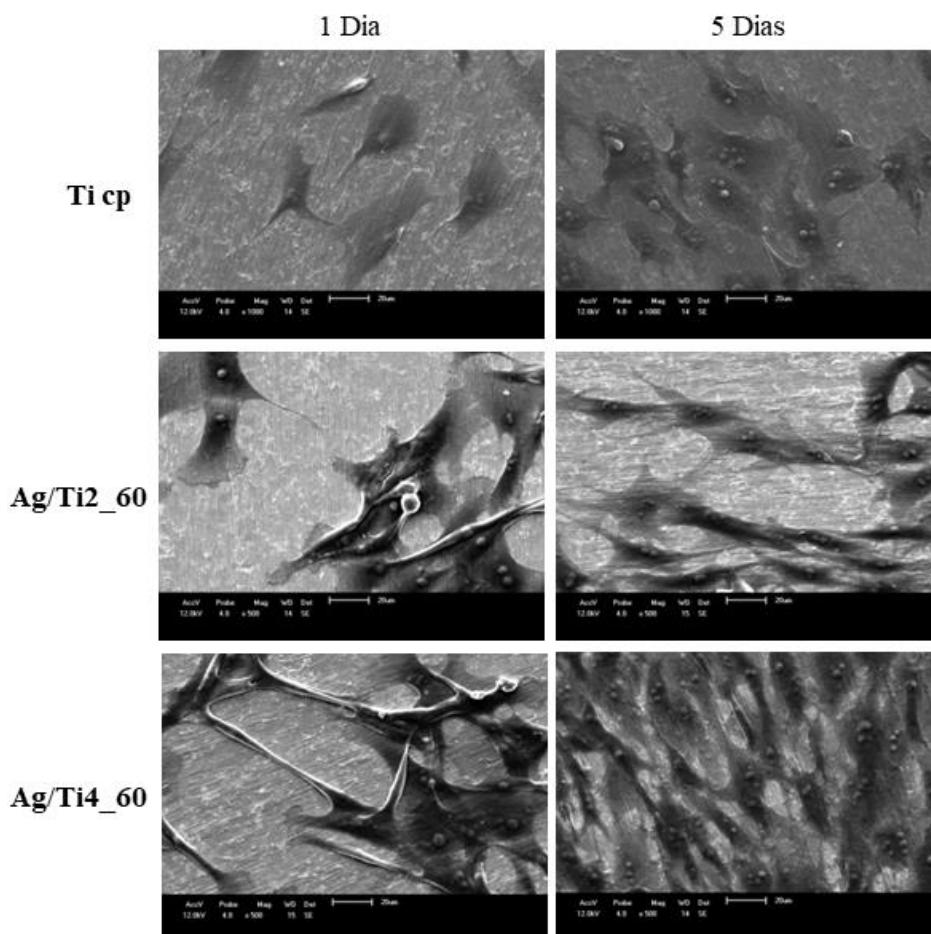


Figura 22: Comparativo da morfologia das células MG63 sobre amostras de Ti_cp, Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 após 1 e 5 dias de incubação.

Com base em estudos anteriores, pode-se explicar o aumento da adesão celular nas amostras tratadas por uma possível redução na hidrofobicidade e alteração da rugosidade das amostras provocado pelo processo de implantação da prata [134,135]. No entanto, a amostra implantada com 2 keV e que concentra a prata implantada mais próximo da superfície, que poderia apresentar uma maior modificação superficial, apresentou menor adesão celular do que a implantada com 4 keV.

O grau de citotoxicidade dos íons Ag^+ e de outros metais não depende apenas da concentração, mas do tempo de exposição das células [109]. Sendo assim, é possível que a amostra cuja maior concentração de prata se encontra numa condição mais favorável à ionização ($\text{Ag}/\text{Ti}_2_{60}$) tenham apresentado essa lixiviação de íons Ag^+ num intervalo de tempo menor do que a amostra $\text{Ag}/\text{Ti}_4_{60}$. Consequentemente, fez com que estes íons ficassem mais tempo em contato com as células, prejudicando sua capacidade de proliferação. Possivelmente devido à maior distância da superfície e maior energia necessária para ionizar os átomos de prata, nas amostras $\text{Ag}/\text{Ti}_4_{60}$ a lixiviação dos íons Ag^+ ocorre de forma mais moderada. Ou seja, a concentração de íons Ag^+ no meio é aumentada gradativamente, possibilitando que as células tenham um maior tempo de proliferação se arranjando de forma mais complexa, o que diminui a sensibilidade das células aos efeitos tóxicos da prata [109].

Pelos resultados obtidos, e considerando a finalidade do teste, verifica-se que a energia de implantação é um dos parâmetros-chave para o tratamento proposto, pois influencia diretamente no comportamento celular obtido, uma vez que é determinante na profundidade de implantação da prata.

Dentre essas amostras, a $\text{Ag}/\text{Ti}_4_{60}$ destaca-se por ser mais favorável para a adesão celular, já que apresentou maior proliferação das células no período avaliado. Some-se a isto o fato de que essa amostra pertence ao grupo das que foram testadas quanto a sua eficácia bactericida no tratamento do efluente industrial, com um resultado de redução na

contagem de bactérias.

Através da análise das imagens obtidas pela coloração de Giemsa, observou-se que a morfologia das células MG-63 em contato com os extratos de Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 durante o período de 1, 5 e 7 dias apresentaram-se arredondadas ou com prolongamentos, envoltas em citoplasma abundante, bem definido e íntegro, caracterizando uma cultura de células saudável (Figura 23). Em contrapartida, no controle positivo, observou-se que as células MG-63 em contato com agente permeabilizante de membranas (5% de DMSO) durante o período de 1, 5 e 7 dias apresentaram perda dos filamentos de colágeno e refringência, número reduzido de células, com morfologia alterada, sugerindo atividade citotóxica do controle positivo significativa em comparação aos extratos de Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 (Figura 23).

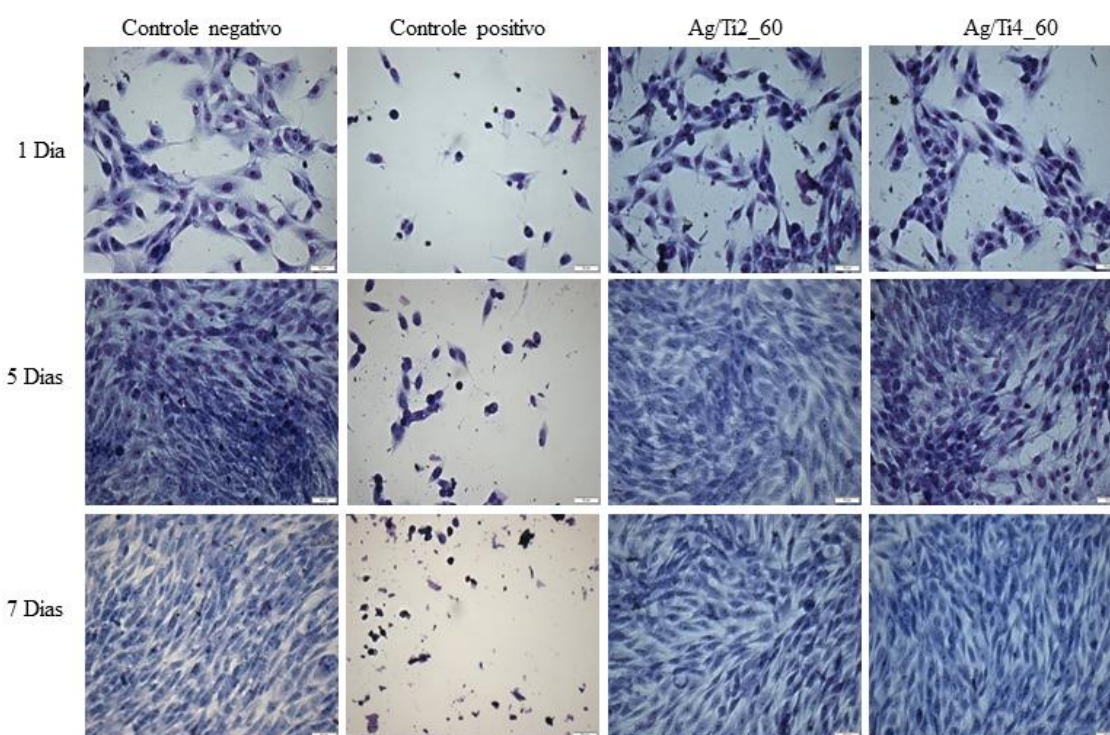


Figura 23: Morfologia das células tratada durante 1, 5 e 7 dias em comparação com os controles negativos e positivos. As imagens foram obtidas por microscopia óptica (aumento de 200 vezes).

Para melhor elucidar o efeito dos parâmetros (energia de implantação) de obtenção das amostras de titânio com prata implantada próxima à superfície, a serem utilizados na

área biomédica, utilizou-se o ensaio de contato indireto (MTT) com as amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60, a fim de se obter maiores informações a respeito da atividade citotóxica desses materiais.

Assim, a análise de citotoxicidade das amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60, bem como a avaliação do seu processo de obtenção foi realizada pela metodologia de conversão de MTT em cristais de formazan por células viáveis. Esse ensaio é amplamente utilizado para medir o potencial citotóxico de drogas em linhagens celulares estabelecidas ou em culturas primárias e secundárias [138]. A Figura 24 apresenta um comparativo do efeito citotóxico entre as amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60.

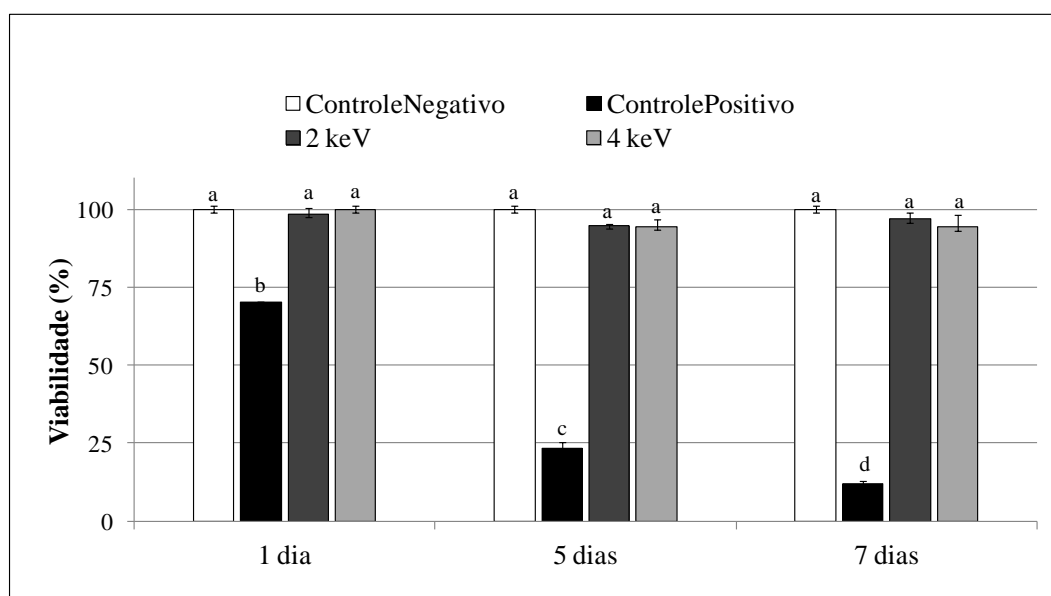


Figura 24: Efeito citotóxico das amostras Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60 na viabilidade de células MG-63. As células foram tratadas durante 1, 5 e 7 dias. Controle positivo (células tratadas com DMSO a 5%). Os resultados foram obtidos a partir de três experiências independentes. Cada barra representa o percentual médio de viabilidade \pm DP em relação ao controle negativo (meio de cultura) que foi normalizada para 100%.

Comparando-se os resultados de viabilidade celular obtidos nas amostras, observa-se que não houve redução da viabilidade celular durante o período de 1, 5 e 7 dias na presença do extrato das amostras tratadas em comparação ao controle negativo, onde utilizou-se somente meio de cultura DMEM suplementado. Em analogia ao que foi observado no ensaio de coloração de Giemsa, salienta-se que o controle positivo com 5%

de DMSO apresentou uma acentuada redução na viabilidade celular, quando comparado ao controle negativo e aos tratamentos feitos com o extrato das amostras de Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60.

Dentre as amostras avaliadas quanto à bioatividade, a amostra Ag/Ti4_60 se destaca indicando que reúne as melhores propriedades superficiais para a adesão celular, uma vez que apresenta maior viabilidade e proliferação celular. Além disso, esta amostra pertence ao grupo das que apresentaram ação bactericida comprovada no teste de tratamento do efluente industrial, já que houve uma redução na contagem de bactérias *E. coli*.

É importante ressaltar que as amostras utilizadas nessa avaliação são aquelas que apresentaram a maior concentração de prata implantada. Considerando especificamente a amostra Ag/Ti4_60 que não mostrou indícios de toxicidade para as células humanas, pode-se apontar o processo proposto nesse estudo como biologicamente viável. Pois, uma vez que, com concentrações menores de prata (Ag/Ti4_30 e Ag/Ti4_45) houve indícios de ação bactericida, logo essas concentrações encontram-se num intervalo seguro para utilização dos artefatos tratados como próteses ou implantes da área odontológica.

5.1.10 Correlação dos resultados de caracterização físico-química e biológicas

Os resultados mostram que o método de implantação iônica de prata a baixas energias por IPD permite controlar os parâmetros de processo e em conjunto com as simulações obter diferentes níveis de modificação superficial, visando à ação bactericida. Diferente do que se imagina, não apenas a concentração de prata implantada, mas também a topografia da superfície é determinante na ação contra micro-organismos. A topografia influencia sua molhabilidade e conseqüentemente modifica a resposta dessa superfície na adesão tanto de micro-organismos formadores de biofilmes indesejados, quanto de células (capacidade de osteointegração).

É necessário que se obtenha um conjunto de parâmetros que combine a concentração e a profundidade de implantação ideal para promover a redução da hidrofobicidade da superfície, e que dificulte a adesão inicial das bactérias, favorecendo a adesão e proliferação celular.

A combinação ideal desses parâmetros também é importante para que se obtenha uma taxa de lixiviação de íons Ag^+ conforme a aplicação desejada, pois uma concentração muito alta de Ag^+ liberada imediatamente quando em contato com o tecido biológico pode resultar em um efeito tóxico ao organismo hospedeiro. Já uma lixiviação gradual dos íons Ag^+ da superfície de uma prótese pode evitar a formação de um biofilme bacteriano a uma taxa na qual as células responsáveis pela osteointegração se organizem em arranjos mais complexos, e conseqüentemente tornam-se menos sensíveis aos efeitos tóxicos dos íons Ag^+ .

5.2 Implantação iônica a baixas energias de íons Ag^+ em aço inox AISI 304

Os dois conjuntos de amostras foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliar a adesão de bactéria; no entanto, as amostras do conjunto Ag/AISI2_60 apresentaram atividade bactericida mais eficiente e por este motivo foram escolhidas para as demais caracterizações.

5.2.1 Análise da concentração de prata incorporada nas amostras de AISI 304

A concentração e distribuição de implantação de prata na superfície no aço inoxidável foram determinadas por RBS. O espectro (Figura 25) mostra os sinais característicos de ferro (espécie química com maior percentual em peso encontrado no substrato) e de prata incorporada nas amostras. A concentração implantada, $5,61 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2} foi determinada utilizando-se a Equação 2.

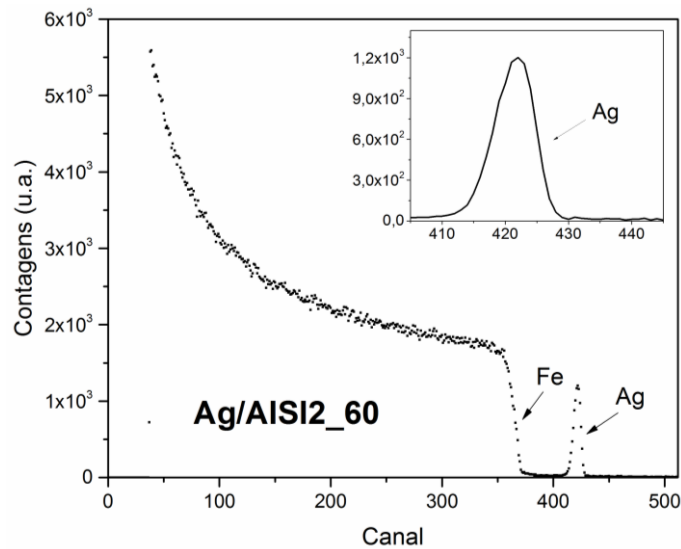


Figura 25: Espectro de RBS da amostra Ag/AISI2_60.

Da mesma forma que foi verificada nas amostras de Ti cp é possível observar que o perfil de implantação de prata está representado por uma curva semelhante a uma Gaussiana, equivalente a uma distribuição normal, e Lorentziana, equivalente a uma distribuição relativa de *Cauchy-Lorentz* para a concentração de prata implantada no aço inoxidável. No detalhe do gráfico está representada uma aproximação do perfil do pico de prata para facilitar a visualização, que confirma o que foi previsto pela simulação de Monte Carlo.

5.2.2 Perfil dos elementos em profundidade

Os resultados da análise de GD-OES (Figura 26) mostram os perfis dos elementos característicos do aço inoxidável que são ferro, cromo e níquel, e também da prata que foi incorporada pelo processo de implantação. Esses resultados são corroborados pelos resultados das simulações de Monte Carlo, pois as curvas dos elementos não apresentam um crescimento abrupto, o que indica que não há formação de uma película de prata na superfície do aço, mas sim que a prata está, de fato, implantada. Analisando melhor a Figura 26 também foi constatada a presença de oxigênio na superfície do aço inoxidável.

Esse oxigênio, que aparece na superfície das amostras, corresponde à camada de óxido que se forma pela exposição ao ambiente, bem como átomos adsorvidos à superfície das amostras.

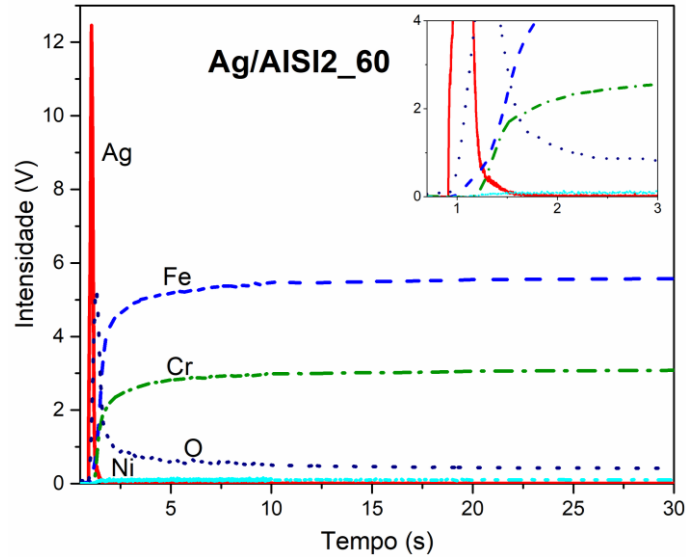


Figura 26: Perfil de implantação de prata na amostra Ag/AISI2_60 e seus principais constituintes.

O perfil da prata observado para a amostra Ag/AISI2_60 apresenta comportamento similar ao que foi visto para as amostras de titânio, e a representação do alcance da profundidade dos íons de prata no aço inoxidável para este estudo, com base nas informações obtidas na simulação de Monte Carlo, está ilustrada na Figura 27.

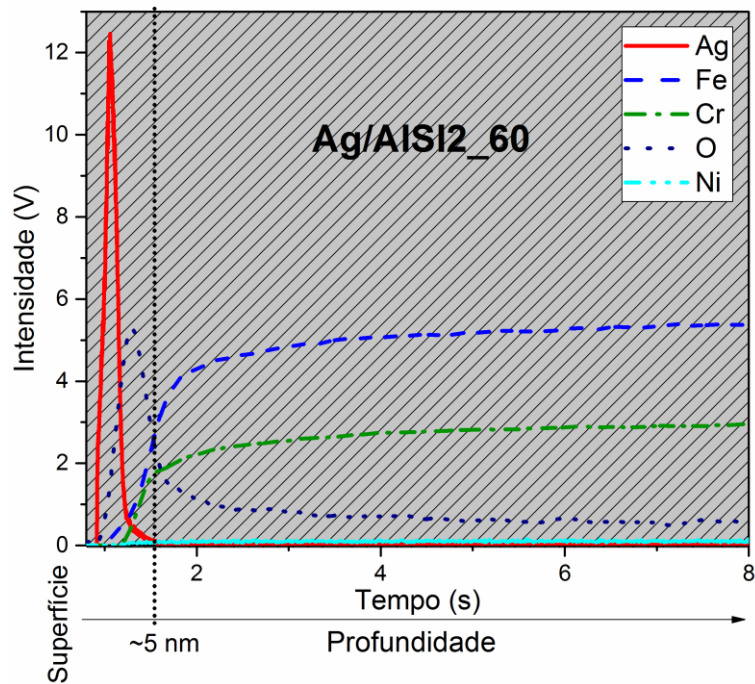


Figura 27 – Representação do alcance da profundidade dos íons Ag^+ implantados no aço inoxidável AISI 304 com base nas informações obtidas na simulação de Monte Carlo.

5.3 Avaliação do efeito da modificação superficial na adesão de bactérias

Os testes biológicos realizados para verificar a ação bactericida das amostras de aço inox AISI 304 com implantação de prata a baixas energias estão descritos no trabalho realizado em parceria com o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos [139].

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que houve uma redução para ambas as bactérias testadas ($\geq 50\%$). A taxa de redução variou de 53,8% a 65,9% para *L. monocytogenes* e 69,8% e 70% para *S. enteritidis* quando a densidade areal de prata implantada no aço inoxidável foi de $3,0 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2} . Em um trabalho prévio, os autores observaram que superfícies de aço inoxidável AISI 316 com adição de íons Ag^+ em uma concentração de 0,03% (peso/peso) implantados pelo método de derretimento repetido em forno (1050 °C) por uma fusão de indução a vácuo (VIM) por 5 min exibiram um efeito bactericida com uma taxa de redução de *E. coli* de 89,9% [140]. Já em um outro estudo, foi encontrada uma taxa de redução maior (99,9%) para *E. coli* e *S. aureus* com a mesma concentração de prata do estudo anterior ($3,0 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2}), porém, no aço

inoxidável AISI 304 preparado em um forno de indução de ar, sob uma atmosfera protetora a 1200 °C, durante 4 h. No presente trabalho, foram encontradas taxas de redução mais baixas do que nos trabalhos mencionados [17,140], o que pode ter ocorrido devido ao método e condições utilizadas para a implantação da prata na superfície.

Tabela 8 – Taxa de redução de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* em aço inoxidável AISI 304 tratado por implantação iônica de Ag⁺ a baixas energias [139].

Micro-organismo	% Redução	
	1h	24h
<i>S. enteritidis</i>	70,0 ± 3,58 ^{aA}	69,8 ± 3,22 ^{aA}
<i>L. monocytogenes</i>	53,8 ± 3,34 ^{aB}	65,9 ± 2,23 ^{bA}

Notas: Mesma letra minúscula dentro de uma linha não possui diferença estatística (P > 0,05).
Mesma letra maiúscula dentro de uma coluna não possui diferença estatística (P > 0,05).

Na Tabela 8 observa-se que para *S. Enteritidis* não houve diferença significativa entre os tempos de adesão de 1h e 24 h. Embora não seja possível afirmar que a prata não tenha inativado a *S. enteritidis* já em uma hora, o tratamento com prata foi suficiente para reduzir a adesão de *S. enteritidis* em 70%, porém não houve redução adicional desse micro-organismo após 24 h. Por outro lado, para *L. monocytogenes*, a taxa de redução foi significativamente maior ($p < 0,05$) após 24 h, indicando que houve inativação adicional da bactéria devido à ação da prata, após esse período. Isso pode ser explicado pelo fato das paredes celulares das bactérias Gram-positivas diferirem acentuadamente das Gram-negativas. O peptidoglicano na parede celular de bactérias Gram-positivas é muito mais espesso do que aquele em bactérias Gram-negativas [56]; com isso, a parede celular mais espessa da *L. monocytogenes* pode ser mais resistente contra a penetração de íons Ag⁺ na célula [2,108]. Isso corrobora os resultados obtidos em um trabalho onde foi avaliada a adesão com 24 h de contato e relatou-se que a prata implantada nas amostras de aço inoxidável AISI 420 mostrou excelente propriedade bactericida para *E. coli* com uma

concentração de implantação de $2,0 \times 10^{17}$ átomos cm^{-2} [141]. No entanto, a atividade bactericida em relação à *S. aureus* não foi satisfatória, com taxas de remoção de apenas 50%. Outra equipe de pesquisadores comprovou a eficácia do tratamento de implantação de prata ($1,0 \times 10^{17}$ átomos cm^{-2}), porém para as bactérias Gram-negativas (*E. coli*), a eliminação foi maior do que para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) [142].

Os resultados também demonstraram que a taxa de redução de *S. enteritidis* foi maior do que a de *L. monocytogenes* em 1h ($p < 0,05$). Os valores observados para o número de células aderidas aos aços inoxidáveis não tratados (dados não apresentados) mostraram que *S. enteritidis* também aderiu mais do que a *L. monocytogenes* nos aços inoxidáveis não tratados. Isto pode ocorrer devido à influência de outras características da *S. enteritidis*, como a presença de fímbrias, pilis e cápsula que podem estar envolvidas no processo de adesão.

No entanto, não houve diferença significativa de adesão entre as bactérias avaliadas quando os testes foram feitos em 24 h, sugerindo que o tempo não foi fator determinante para a ação da prata (efeito residual) em bactérias Gram-negativas. Por outro lado, foi observada diferença significativa entre os dois tempos (1 h e 24 h) para *L. monocytogenes*, e isso pode ser devido às características da estrutura celular, indicando que o tempo tem influência na ação da prata em bactérias Gram-positivas. Cabe ressaltar que para ambas as bactérias, os íons Ag^+ foram capazes de inibir as células aderidas inicialmente e no biofilme maduro.

Resultado semelhante ao deste trabalho é descrito na literatura onde foi observada atividade bactericida contra *E. coli* em aço inoxidável AISI 420 (77,7%), no qual a prata foi implantada utilizando um equipamento de implantação de íons, com uma concentração semelhante ao do presente estudo ($5,0 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2}). Contudo, quando foi aumentada a concentração de prata implantada ($1,0 \times 10^{18}$ átomos cm^{-2}), a atividade bactericida aumentou (98,4%) [20]. Em outro trabalho foi avaliada a

implantação de íons Ag^+ em dois materiais (aço inoxidável AISI 317 e titânio). A taxa de redução bacteriana para as amostras de aço inoxidável AISI 317 e titânio, tratadas com prata, foi de 80% e 83%, respectivamente, com uma concentração maior de íons do que a do presente estudo ($5,0 \times 10^{15}$ átomos cm^{-2}). Quando a concentração de íons Ag^+ foi aumentada para $1,5 \times 10^{17}$ átomos cm^{-2} , constatou-se um excelente efeito bactericida (de 99,9% e 100%, para as amostras de aço inoxidável e titânio, respectivamente) [3].

De acordo com a literatura, amostras de aço inoxidável AISI 304 com a implantação de prata apresentaram uma alta redução bacteriana (> 95%) em relação às amostras não tratadas para *E. coli* e *S. aureus*, sendo que a concentração usada foi maior do que a usada no presente estudo ($1,0 \times 10^{17}$ átomos cm^{-2}). Portanto, é compreensível que o efeito bactericida aumente com o aumento da concentração de íons implantados na superfície. A prata, ao ser lixiviada da superfície, ioniza-se e, ao se ligar às proteínas das células bacterianas, possivelmente danifica a estrutura da parede celular, ocasionando a morte das mesmas [21].

Contudo, essas considerações são questionadas pela ocorrência e predominância das células aderidas irreversivelmente à superfície. É provável que essas células se tornem uma barreira contra a ação dos íons Ag^+ . Nessas circunstâncias, o biofilme poderia se desenvolver sobre as células aderidas, estando elas mortas ou vivas, sem sofrer os efeitos dos íons Ag^+ [21].

O presente estudo sugere que o aço inoxidável AISI 304, tratado por implantação de íons Ag^+ a baixas energias, pode ser utilizado como alternativa aos aços inoxidáveis tradicionais para ajudar a reduzir a ocorrência de contaminação. Contudo, este trabalho revelou uma redução de bactérias em aços inoxidáveis tratados com Ag^+ de aproximadamente 1 log (uma ordem de grandeza), e, embora seja considerada uma baixa redução, isso já pode ser suficiente para prevenir surtos alimentares, principalmente quando considera-se *L. monocytogenes*, que apresenta concentrações infectantes muito

baixas (<102 células) [54].

No entanto, algumas microcolônias bacterianas podem ser formadas mesmo em superfícies tratadas com prata, em períodos de incubação mais longos. Por isso, caso a superfície de aço inoxidável tratada seja utilizada em áreas relacionadas com higiene e saúde (onde é necessário prevenir o crescimento e multiplicação de bactérias) as práticas de higienização apropriadas precisam ser aplicadas [140].

5.4 Quantificação da prata remanescente nas amostras após os ensaios biológicos

Após a realização dos ensaios para avaliar a adesão das bactérias nas amostras tratadas, a quantificação de prata incorporada nas mesmas foi realizada novamente por RBS e os dados obtidos estão mostrados nas Figuras 28 (a) e (b).

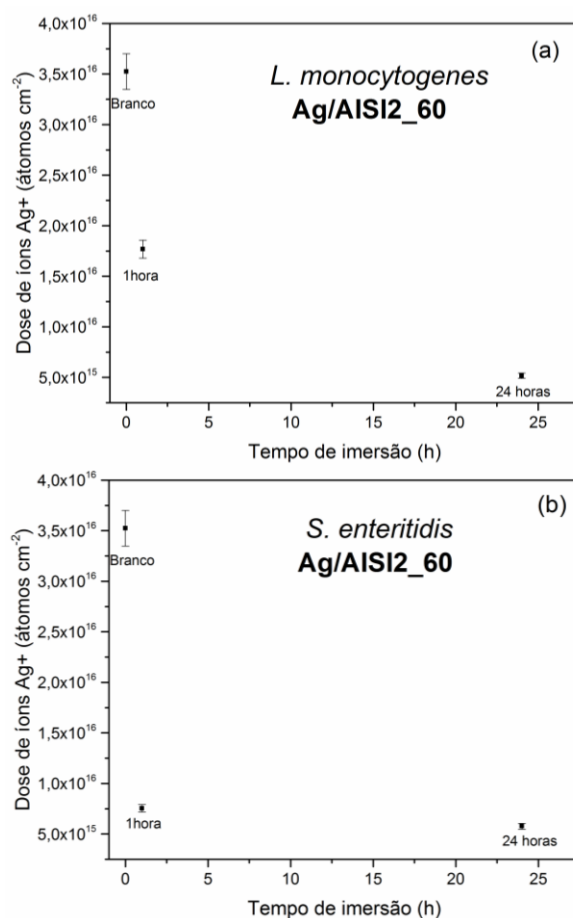


Figura 28: Avaliação das amostras Ag/AISI2_60 após os ensaios de adesão em 1h e 24h para as bactérias: (a) *L. monocytogenes* e (b) *S. enteritidis*

Observando os gráficos pode-se dizer que em ambos os casos a maior lixiviação de íons Ag^+ para o meio líquido ocorre na primeira hora de contato, sendo de 50% para *L. monocytogenes* e 78% para *S. enteritidis*. Após 24 h de contato das amostras com o meio nos ensaios com as duas bactérias, a quantidade de prata presentes nas amostras é de aproximadamente 15% em relação à quantidade inicial. Estes resultados podem ser utilizados para entender o porquê de não haver diferença significativa para os resultados de 1h e 24h na redução de *S. enteritidis*: a quantidade de prata disponível após 1h é de apenas 20% do valor inicial. Após 1h a redução de *L. monocytogenes* é de 53,4% restando aproximadamente metade da concentração inicial de prata e ao final de 24h 65,9% de redução com aproximadamente 15% da concentração de prata inicial disponível.

De acordo com a literatura, uma amostra de aço inox contendo concentração $2,0 \times 10^{16}$ átomos cm^{-2} de prata (implantada com uma tensão de aceleração de 50 kV a uma profundidade de 45 nm) libera em torno de 70 ppb de íons Ag^+ . O material estudado exibiu atividade bactericida duradoura (taxa de remoção > 90%) após exposição ao ar ou imersão em água da torneira por mais de um ano [20]. As amostras estudadas no presente trabalho não foram avaliadas em longo prazo para verificar em que momento perdem sua atividade bactericida, devido à lixiviação completa da prata implantada. Mas, é provável que essa diferença de resultados seja devido à diferença na profundidade de implantação.

A lixiviação de grande quantidade de prata implantada na primeira hora de contato das amostras com o meio líquido pode ser atribuída à profundidade de implantação. Como já foi mencionado ao longo deste estudo, a baixa energia de implantação (2 keV) faz com que a maior densidade dos átomos de prata esteja localizada a uma profundidade de 2 nm, ou seja, muito próxima da superfície. Desta forma, a ionização de grande parte desses átomos ocorre imediatamente a partir do momento em que as amostras entram em contato com o meio líquido.

As características verificadas com a análise dos resultados permitem identificar que a utilização deste conjunto de parâmetros para o tratamento de aço inox AISI 304 na fabricação de equipamentos e utensílios da indústria de alimentos é prejudicada pelo fato de que a lixiviação não ocorre de forma constante. No entanto, uma possível aplicação do aço inox AISI 304 com prata está na área médica, como placas de fixação, pinos e parafusos, por exemplo. A aplicação apresenta-se viável por se tratarem de artefatos que serão implantados em procedimentos cirúrgicos, o momento crítico que exige o material esteja livre de contaminação pela adesão de micro-organismos é justamente aquele em que o material é colocado em contato com o tecido biológico.

6 Conclusão

Neste trabalho foram produzidas amostras metálicas (Ti cp e AISI 304) com íons Ag^+ implantados a baixas energias por IPD numa região próxima da superfície, visando desenvolver materiais cuja superfície seja capaz de inibir a adesão de bactérias podendo ser aplicado como biomateriais.

Os resultados teóricos e experimentais mostraram que existe uma correlação clara entre as caracterizações físico-químicas. As simulações de Monte Carlo estimaram os perfis de profundidade e concentrações de íons Ag^+ que foram encontrados em ambas as técnicas subsequentes: RBS e GD-OES. A simulação de Monte Carlo é uma ferramenta valiosa para a definição de parâmetros para processos de IPD. Foi possível verificar que a concentração implantada de íons Ag^+ varia com o tempo de processo e também com a energia utilizada para acelerar os íons.

Dentre as amostras de Ti cp produzidas, as amostras Ag/Ti4_30, Ag/Ti4_45 e Ag/Ti4_60 apresentaram indícios de ação bactericida. Para a condição Ag/Ti4_45 a verificação se deu tanto pelo teste de difusão em ágar, no qual houve discreta inibição do crescimento de bactérias, quanto no tratamento de um efluente industrial líquido, promovendo uma redução em torno de 27 % para a bactéria *E. coli*. As amostras de Ti cp nas quais foram detectadas as maiores concentrações de Ag^+ (Ag/Ti2_60 e Ag/Ti4_60) foram avaliadas quanto à sua toxicidade em células humanas e nenhuma delas foi prejudicial na adesão e proliferação das células avaliadas.

A escolha dos parâmetros para obtenção do biomaterial desejado deve levar em consideração que a combinação “energia + concentração de íons” promove alterações na topografia da superfície, que por sua vez influencia a molhabilidade e conseqüentemente modifica a resposta dessa superfície na adesão tanto de micro-organismos indesejados, quanto de células humanas (capacidade de osteointegração). Sendo assim, a energia de 4

keV com 45 min de implantação se mostra uma condição promissora para implantar íons Ag^+ em Ti cp para produzir materiais com potencial de aplicações na área biomédica (implantes, pinos e placas de fixação).

A avaliação biológica das amostras de AISI 304 o tratamento apresentou-se como uma alternativa para a inativação de *S. enteritidis* e *L. monocytogenes*, promovendo redução de aproximadamente 70% num período de 24h de ensaio.

Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que a implantação iônica a baixas energias por IPD é um processo reprodutível que permite um amplo controle dos parâmetros de implantação que podem ser modificados conforme a necessidade. Essa versatilidade permite que o processo seja aplicado em escala industrial, onde as condições de processo (energia, tempo, manutenção) o tornam economicamente viável.

Finalmente, tendo em vista todos os pontos que devem ser considerados no desenvolvimento de um produto, o presente trabalho oferece valiosa contribuição para a indústria de biomateriais.

7 Sugestões para trabalhos futuros

- ❖ Verificar a forma como a prata se encontra no substrato e se há formação de AgO;
- ❖ Avaliar as amostras de titânio implantadas com energia 2 keV quanto à sua atividade bactericida (tratamento do efluente);
- ❖ Avaliar o comportamento das amostras com maior concentração de prata (2 e 4 keV) quanto a citotoxicidade, em tempos maiores do que 5 dias;
- ❖ Obter concentrações de prata mais altas e testar sua ação bactericida e se há efeito tóxico para células humanas;
- ❖ Testar a eficiência do tratamento na inibição da formação de biofilmes bacterianos (Gram-positivos e Gram-negativos).

8 Referências

- [1] An, Y. H. & Skowronski, P. General Considerations for Studying Bacterial Adhesion to Biomaterials. In: Y. H. An & R.J. Friedman, eds. **Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications**. Towa, NJ, Humana Press Inc., v. 8, pp. 121-131, 2000.
- [2] Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, Q.G.; Cui, F.Z.; Kim, T.N. and Kim, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52 (4), pp. 662-668, 2000.
- [3] Wan, Y. Z.; Raman, S.; Hea, F. & Huang, Y. Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper. **Vacuum**. v. 81, pp. 1114 - 1118, 2007.
- [4] Jung, W. K.; Koo, H. C.; Kim, K. W.; Shin, S.; Kim, S. H. & Park, Y. H. ; Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, pp. 2171-2178, 2008.
- [5] Brunette, D. M.; Tengvall, P.; Textor, M. & Thomsen, P. **Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, p. 28, 2001.
- [6] Textor, M.; Sittig, C.; Frauchiger, V.; Tosatti, S. & Brunette, D. M. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. In: Brunette, D. M.; Tengvall, Textor, M. & Thomsen, P. **Titanium in Medicine**, Springer Edited, Berlin-Heidelberg: pp. 172-224, 2001.
- [7] Eisenbarth, E.; Velten, D.; Schenk-Meuser, K.; Linez, P; Biehl, V.; Duschner, H.; Breme, J. & Hildebrandt, H. Interactions between cells and titanium surfaces. **Biomolecular Engineering**, v. 19, pp. 243-249, 2002.
- [8] 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**, v. 59, pp. 18-28, 2002.
- [9] Oréfice, R. L.; Pereira, M. M. & Mansur, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 538, 2006.
- [10] Brooks, J. D. & Flint, S. H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, pp. 2163-2176, 2008.
- [11] Kokare, C. R. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, pp. 159-168, 2009.
- [12] Hirvonen, J. K. Ion beam processing for industrial applications. **Materials Science and Engineering**, v. A116, pp. 167-175, 1989.
- [13] Sioshansi, P. & Tobin, E. J. Surface treatment of biomaterials by ion beam processes. **Surface and Coatings Technology**, v. 83, pp. 175-182, 1996.
- [14] Cui, F. Z. & Luo, Z. S. Biomaterials modification by ion-beam processing. **Surface and Coating Technology**, v. 112, pp. 278-285, 1999.
- [15] Jain, I. P. & Agarwal, G. Ion beam induced surface and interface engineering. **Surface Science Reports**, v. 66, pp. 77-172, 2011.

- [16] Knetsch, M. L. W. & Koole, L. H. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles, **Polymers**, v. 3, pp. 340-366, 2011.
- [17] Liao, K.-H; Ou, K.-L; Cheng H.-C; Lin, C.-T; Peng, P.-W; Effect of Silver on Antibacterial Properties of Stainless Steel. **Applied Surface Science**, v. 256, pp. 3642-3646, 2010.
- [18] Lemire, J. A. Harrison, J. J. & Turner, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, pp. 371-384, 2013.
- [19] Politano, A. D.; Campbell, K. T.; Rosenberger, L. H. & Sawyer, R. G. Use of Silver in the Prevention and Treatment of Infections: Silver Review. **Surgical Infections**, v. 14, pp. 8-20, 2013.
- [20] Chen, R; Ni, H.; Zhang, H.; Yue, G.; Weiting, Z. & Xionget, P. A preliminary study on antibacterial mechanisms of silver ions implanted stainless steel. **Vacuum**, v. 89, pp. 249-253, 2013.
- [21] Echeverrigaray, F.G.; Echeverrigaray, S.; Delamare, A.P.L.; Wanke, C.H.; Figueroa, C.A.; Baumvol, I.J.R.; Aguzzoli, C.; Antibacterial properties obtained by low-energy silver implantation in stainless steel surfaces, **Surface and Coatings Technology**, v. 307, Part A, pp. 345-351, 2016.
- [22] Park, J. & Lakes, R. S. **Biomaterials – An Introduction**. Springer. 3ª edição. p. 2, 2007.
- [23] Donatella, D.; Mussano, F. & Faga, M.G. Biomaterials for dental implants: current and future trends, **Journal of Material Science**, v. 50, pp. 4779-4812, 2015.
- [24] Gália, C. A.; Rosito, R.; Mello, T. M. & Macedo, C. Uso de enxerto homólogo e heterólogo em diáfise femoral de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia**. v. 40 (3), pp. 141-146, 2005.
- [25] Rohman, G. Materials Used in Biomaterial Applications. In: MIGONNEY, V. **Biomaterials**. London: ISTE, pp. 27-74, 2014.
- [26] Park, J. P. & Kim, Y. K. Metallic Biomaterials. In: WONG, J. Y & BRONZINO, J. D. **Biomaterials**. Taylor e Francis Group. Boca Raton: CRC Press. p. 1-1, 2007.
- [27] Donachie, M. **Metals Handbook Desk Edition**. 2ª edição, editada por Davis, J. R. ASM International. 1998..
- [28] Leyens, C. & Manfred, P. **Titanium and Titanium alloys: fundamentals and applications**. Wiley-VCH. First edition. p. 1, 2003.
- [29] Yaszemski, M. J.; Trantolo, D. J.; Lewandrowski, K. –U.; Hasirci, V.; Altobelli, D. E. & Wise, D. L. **Biomaterials in orthopedics**. Marcel Dekker Inc., New York, p. 2, 2004.
- [30] Lütjering, G. & Williams, J. C. **Titanium – Engineering Materials and Processes**. Springer-Verlag. Second edition. p. 399, 2003.
- [31] Brown, S. A. & Lemons, J. E. Medical applications of titanium and its alloys: the material and biological issues. Proceedings of a symposium held in 1994 in Phoenix, Arizona. STP 1272. ASTM. 1996.
- [32] Zimmer Sirius® – Intramedullary Nail System. Zimmer, 2007.
- [33] BIOFABRIS. Disponível em: <<http://projetogravar.org/biofabris/destaque02.php>> Acesso em: 10 de junho de 2015.

- [34] Hedberg, Y.; Karlsson, M. E.; Blomberg, E.; Wallinder, I. O. & Hedberg, J. Correlation between surface physicochemical properties and the release of iron from stainless steel AISI 304 in biological media. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 122, pp. 216-222, 2014.
- [35] Chen, M.; Yu, Q. & Sun, H. Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, 18488-18501, 2013.
- [36] Martins, C. M. B., Moreira, J. L. & Martins, J. I. Corrosion in water supply pipe stainless steel 304 and a supply line of helium in stainless steel 316. **Engineering Failure Analysis**, v. 39, pp. 65-71, 2014.
- [37] Baddoo, N. R. Stainless steel in construction: a review of research, applications, challenges and opportunities. **Journal of Constructional Steel Research**, v. 64, pp. 1199-1206, 2008.
- [38] Sinde, E. & Carballo, J. Attachment of *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17(4), pp. 439-447, 2000.
- [39] Whitehead, K. A. & Verran, J. The effect of surface topography on the retention on microorganisms. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84 (C4), pp. 253-259, 2006.
- [40] Malheiros, P. S.; Passos, C. T.; Casarin, L. S.; Serraglio, L. & Tondo, E. C. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, v. 21, pp. 298-301, 2010.
- [41] Chae, M.S. & Scharaft, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, pp. 103-111, 2000.
- [42] Casarin, L. S.; Casarin, F. O.; Soares, T. P.; Aguzzoli, C.; Figueroa, C. A.; Soares, G. V.; Brandelli, A. & Tondo, E. C. Effect of plasma nitriding surface modification on the adhesion of food pathogens to stainless steel AISI 316 and AISI 304. **Journal of Food Safety**, v. 36, pp. 341-347, 2016.
- [43] Casarin, L. S.; Brandelli, A.; Casarin, F. O.; Soave, P. A.; Wanke, C. H. & Tondo, E.C. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds. **International Journal of Food Microbiology**. v. 191, pp. 103-108, 2014.
- [44] Arciola, C. R.; Campoccia, D.; Speziale, P.; Montanaro, L. & Costerton J.W. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, pp. 5967-5982, 2012.
- [45] Oliveira, L. P. Análise química e estrutural de implantes ortopédicos de aço inoxidável, **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 39, pp. 123-131, 2004.
- [46] GIORDANO, E.J. & FALLEIROS, N.A, Comportamento eletroquímico de dois aços inoxidáveis usados como biomateriais, **Revista Escola de Minas**, v. 63(1), 2010.
- [47] Phillips, P. L.; Wolcott, R. D.; Fletcher, J.; Schultz, G. Biofilms Made Easy. In: **Wounds International**, v. 1, 2010.
- [48] Xavier, J. B.; Picioeanu, C.; Almeida, J. S. & van Loosdrecht, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Biomatemática - Boletim de Biotecnologia**. Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2002.
- [49] Sutherland, I. W. **The biofilm matrix** – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 5 (9), pp. 222-227, 2001.

- [50] Costerton, J. W.; Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, pp. 1318-1322, 1999..
- [51] Monroe, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biol**, v. 5 (11) p e307, 2007.
- [52] Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G. & Costerton, J.W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, pp. 187-209, 2002.
- [53] Behlau, I. & Gilmore, M. S. Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infections Disease. **Archives of Ophthalmology**, v. 126 (11), pp. 1572-1581, 2010.
- [54] Forsythe, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- [55] Simões, M.; Simões, L. & Vieira, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, pp. 573-583. 2010.
- [56] Tortora, G. J.; Funke B. R. & Case C. L. **Microbiologia**. Artmed, 2005.
- [57] Monteiro, D. R.; Gorup, L. F.; Takamiya, A. S.; Ruvollo-Filho, A. C.; Camargo, E. R. & Barbosa, D. B.; The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, pp. 103-110, 2009.
- [58] Parente, A. M. & Sousa, J. C. Características morfológicas e ultraestruturais dos micro-organismos procariotas. In: **Microbiologia**, v. I. Lisboa, Lidel-Eds. Técnicas, pp. 20-23, 1998.
- [59] Brady, R. A.; Leid, J. G.; Calhoun, J. H.; Costerton; J. W. & Shirtliff, M. E. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. **FEMS Immunology Medical Microbiol.**, v. 52, pp. 13-22, 2008.
- [60] Bacteria in photos. Disponível em:
<http://www.bacteriainphotos.com/Staphylococcus%20aureus%20electron%20microscopy.html>
Acesso em 19 de dezembro de 2016.
- [61] Boland, T.; Latour, R. A. & Stutzenberger, F. J. Molecular Basis of Bacterial Adhesion. In: AN, Y. H. e Friedman, R. J. eds. **Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications**. Totowa, NJ, Humana Press Inc., v. 2, pp. 29-41, 2000.
- [62] Manitoba Healthy. Disponível em:
http://www.gov.mb.ca/health/publichealth/diseases/escherichia_coli.html Acesso em 19 de dezembro de 2016.
- [63] Doijad, S. B.; Barbuddhe, S. B.; Garg, S.; Poharkar, K. V.; Kalorey, D. R.; Kurkure, N. V.; Rawool, D. B. & Chakraborty, T. Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. **PLoS ONE**, v. 10 (9), pp. 1-14, 2015.
- [64] Rivoal, K.; Queguiner, S.; Boscher, E.; Bougeard, S.; Ermel, G. & Salvat, G. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized liquid whole eggs and characterization by PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, pp. 56-62, 2010.
- [65] Takahashi, H.; Miya, S.; Igarashi, K.; Suda, T.; Kuramoto, S. & Kimura, B. Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood. **Journal of Food Protection**, v. 72 (7), pp. 1476-1480, 2009.
- [66] Szlavik, J.; Paiva, D. S.; Mørk, N.; Van Den Berg, F.; Verran, J.; Whitehead, K.; Knøchel, S. & Nielsen, D. S. Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow.

International Journal of Food Microbiology, v. 152, pp. 181-188, 2012.

[67] Buchanan, R.; Lindqvist, R.; Ross, T.; Smith, M.; Todd, E. & Whiting, R. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. In: **Microbiological Risk Assessment Series**, Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations. v. 4, pp. 5-14, 2004.

[68] Zhao, T.; Podtburg, T. C.; Zhao, P.; Chen, D.; Baker, D. A. & Cords, B. Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 76, pp. 601-607, 2013.

[69] Goulet, V.; Hedberg, C.; Le Monnier, A. & De Valk, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, pp. 734–740, 2008.

[70] Carpentier, B. & Cerf, O. Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, pp.1-8, 2011.

[71] Berrang, M. E.; Frank, J. F. & Meinersmann, R. J. *Listeria monocytogenes* biofilm formation on silver ion impregnated cutting boards. **Food Protection Trends**, v. 30, pp. 168-171, 2010.

[72] Ortiz, S.; López, V.; Villatoro, D.; López, P. D. J.; Carlos, M. S. & Joaquín, V. A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7(10), pp. 1177-1184, 2010.

[73] Lunden, J. M.; Autio, T. J. & Korkeala, H. J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, v. 65, pp. 1129-1133, 2002.

[74] Competence Center Environment and Sustainability. Disponível em <http://www.cces.ethz.ch/projects/feh/bactflow/WP2> Acesso em 19 de dezembro de 2016.

[75] Abdelhaseib, M. U.; Singh, A. K.; Bailey, M.; Singh, M.; Khateib & T. E.; Bhunia, A. K. Fiber optic and light scattering sensors: Complimentary approaches to rapid detection of *Salmonella enterica* in Food samples. **Food Control**. v. 61, pp. 135-145, 2016.

[76] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. **EFSA Journal**, v. 8(1), p. 1496, 2011.

[77] Chia, T. W. R.; Goulter, R. M., Mcmeekin, T.; Dykes, G. A. & Fegan, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v. 26, pp. 853-859, 2009.

[78] Tondo, E. C. & Ritter, A. C. *Salmonella* and Salmonellosis in Shouthern Brazil: A Review of the Last Decade. In: **Salmonella Classification, Genetics and Desease Outbreaks**. New York: New Science Publishers Inc. pp. 175-181, 2012.

[78] Mürmann, L.; Santos, M. C.; Longaray, S. M.; Both, J. M. C. & Cardoso, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, pp. 529-534, 2008.

[80] Oliveira, F. A.; Frazzon, A. P. G.; Brandelli A. & Tondo E. C. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 1, pp. 170-176. 2007.

- [81] Oliveira, F. A.; Geimba, M. P.; Pasqualotto, A. P.; Brandelli, A.; Paquali, G.; Silva, W. P. & Tondo, E. C. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**, v. 20, pp. 606-610, 2009.
- [82] Britannica. Disponível em: <https://media1.britannica.com/eb-media/24/123224-004-C1A4B848.jpg> Acesso em 19 de dezembro de 2016.
- [83] Jakubovics, N. S. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. **Molecular Oral Microbiology**, v. 25 (1), pp. 4-14, 2010.
- [84] Van Houdt R., Michiels C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal Applied Microbiology**, v. 109 (4), pp. 1117-1131, 2010.
- [85] Widgerow S. Persistence of the chronic wound – implicating biofilm. In: **Wound Healing Southern Africa**, v. 1 (2), pp. 05-07, 2008.
- [86] Palmer, J.; Flint, S. & Brooks, J. Bacterial cell attachment, the bedimming of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotecnology**, v. 34 (9), pp. 577-588, 2007.
- [87] Zeraik, A. N. & Nitschke, M. Biosurfactants as Agents to Reduce Adhesion of Pathogenic Bacteria to Polystyrene Surfaces: Effect of Temperature and Hydrophobicity. **Current Microbiology**, v. 61, pp. 554-559, 2010.
- [88] Nitschke, M.; Araújo, V.; Costa, S. G. V. A. O.; Pires, R. C.; Zeraik, A. E.; Fernandes, A. C. L. B.; Freire, D. M. G. & Contiero, J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surface. **Letters is Applied Microbiology**, v. 49 (2), pp. 241-247, 2009.
- [89] Shakerifard, P.; Gancel, F.; Jacques, P. & Faille, C. Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. **Biofouling**, v. 25, pp. 533-541, 2009.
- [90] Donlan, R. M. & Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15 (2), pp. 167-193, 2002.
- [91] Chmielewski, R. A. N. & Frank, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, pp. 22-32, 2003.
- [92] Bonsaglia, E. C. R.; Silva, N. C. C.; Fernandes Jr, A., Araújo Jr, J. P. & Tsunemi, M.H. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, pp. 386-391, 2014.
- [93] Marques, S. C.; Rezende, J. G. O. S. R.; Alves, L. A. F.; Silva, B. C.; Alves, E. & Abreu, R. L. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, pp. 538-543, 2007.
- [94] Chavant, P.; Martinie, B.; Meylheuc, T.; Bellon-Fontaine, M. N. & Hebraud, M. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, pp. 728-737, 2002.
- [95] Bell, T. Surface engineering: past, present and future. **Surface Engineering**, v. 6 (1), pp. 31-40, 1990.
- [96] PIANA, L. A., **Caracterização e Avaliação da Adesão de Filmes de Nitreto de Titânio Depositados Via PAPVD**. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Engenharia, PPGEM, UFRGS, 2001.

- [97] Martin, P. M. **Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings**. Elsevier, 3^o ed. Oxford, 2009.
- [98] Rautray, T. R.; Narayanan, R. & Kim, K. –H. Ion implantation of titanium based biomaterials. **Progress in Materials Science**, v. 56, pp. 1137-1177, 2011.
- [99] Feng, H.; Yu, Z. & Chu, P. K. Ion implantation of organisms. **Materials Science and Engineering Research**, v. 54, pp. 49-120, 2006.
- [100] Mattox, D. M. Ion Plating – Past, Present and Future. **Surface & Coatings Technology**, v. 133-134, pp. 517-521, 2000.
- [101] Mattox, D. M. **Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing**. Film formation, adhesion, surface preparation and contamination control. Noyes Publications, New York, 1998.
- [102] Pulker, H. K. Ion Plating as an Industrial Manufacturing Method. **Journal of Vacuum Science Technology A**, v. 10 (4), p. 1669, 1992.
- [103] Pezzagna, S. & Meijer, J. High-resolution Ion Implantation from KeV to MeV. In: Goorsky, M. **Ion implantation**, Rubion, Ruhr-Universität Bochum, 2012.
- [104] Ahmed, N. A. G. Ion plating: optimum surface performance and material conservation. **Thin Solid Films**, v. 241, pp. 179-187, 1994.
- [105] Secinti, K. D.; Özalp, H.; Attar, A. & Sargon, M. F. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 18, pp. 391-395, 2011.
- [106] Fontenoy, C. & Kamel, S. O. Silver in the medical devices/equipments: Marketing or real clinical interest? **Le Pharmacien hospitalier**, v. 46, pp. e1-e11, 2011.
- [107] Li, G.; Peng, Q.; Li, C.; Wang, Y.; Jgao, J.; Chen, S.; Wang, J. & Shen, B. Effect of DC plasma nitriding temperature on microstructure and dry-sliding wear properties of 316L stainless steel. **Surface and Coatings Technology**, v. 202, pp. 2749-2754, 2008.
- [108] Rai, M.; Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, pp. 76-83, 2009.
- [109] Poon, V. K. M. & Burd; A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. **Burns**. v. 30 (2), pp. 140–147, 2004.
- [110] Percival, S. L.; Bowler, P. G. & Russel, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, pp. 1-7, 2005.
- [111] Promega Corporation (2015) Protocols and Applications Guide. Cell Viability. Disponível em <http://www.promega.com.br/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/> Acesso em 21 de dezembro de 2016.
- [112] Promega Corporation (2015) Protocols and Applications Guide. Apoptosis. Disponível em <http://www.promega.com.br/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/apoptosis/> Acesso em 21 de dezembro de 2016.
- [113] Wataha, J. C., Lockwood, P. E. & Schedle, A. Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, pp. 360–364, 2000.
- [114] Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., & Chen, C. Cytotoxic Potential of Silver

- Nanoparticles. **Yonsei Medical Journal**, v. 55 (2), pp. 283–291, 2014.
- [115] ASTM F 67. Standard Specification for Unalloyed Titanium for Surgical Implant Applications. 2006.
- [116] ASTM A 240. Standard Specification for Chromium and Chromium-Nickel Stainless Steel Plate, Sheet, and Strip for Pressure Vessels and for General Applications. 2012.
- [117] Souza, A. V.; Soares, T. P.; Figueroa, C. A. & Aguzzoli, C. Oxygen reduction by plasma cleaning in low-energy ion implantation of silver ions in titanium. **Scientia cum Industria**, v. 3 (1), 2015.
- [118] Ziegler, J. P.; Ziegler, M. D. & Biersack, J. P. Srim 2013. Disponível em: <<http://www.srim.org>>. Acesso em: 18 de agosto de 2016.
- [119] Veprek, S.; Reiprich, S. & Shizhi, L.; Superhard nanocrystalline composite materials: The TiN/Si₃N₄ system, **Applied Physics Letters**, v. 66, pp. 2640-2642, 1995.
- [120] Weiss, Z. & Marshall, K. Elemental depth profiling of coated and surface modified materials by GD-OES: hard coatings on cutting tools, **Thin Solid Film**, v. 308-309, pp. 382-388, 1997.
- [121] Suzuki, S. & Kakita, K.; A comparative study of GDOES, SIMS and XPS depth profiling of thin layers on metallic materials, **Journal of Surface Analysis**, v. 12, pp. 174-177, 2005.
- [122] Zarpelon, F. **Preparação, Caracterização e Aplicação de Filmes Finos de PAH/PAA com Nanopartículas de Prata no Tratamento Microbiológico de Efluentes Industriais para Reuso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais), Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.
- [123] Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89(2), pp. 271-277, 1986.
- [124] Rossoni, E. M. M. & Gaylarde, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61 (1), pp. 81-85, 2000.
- [125] Kusumaningrum, H. D.; Riboldi, G.; Hazeleger, W. C. & Beumer, R. R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83 (3), pp. 227-236, 2003.
- [126] Milles, A. A.; Misra, S. S. & Irwin, J. O. Estimation of the bactericidal power of the bloods. **Journal of Hygiene**, v. 38 (6), pp. 732-749, 1938.
- [127] Tang, H. Q.; Feng, H. J.; Zheng, J.H. & Zhao, J. A study on antibacterial properties of Ag⁺-implanted pyrolytic carbon, **Surface & Coatings Technology**, v. 201, pp. 5633–5636, 2007.
- [128] Dhoubhadel, M. S.; Rout, B.; Lakshantha, W. J.; McDaniel, F. D. Investigation of the Saturation of Elemental Concentration in the Depth Profile of Low Energy Silver Ion Implants in Silicon, **Journal of Nuclear Physics, Material Sciences, Radiation and Applications**, v. 4 (1), pp. 251–264, 2016.
- [129] Strnad, G.; Petrovan, C. & Russu, O. Contact Angle Measurement on Medical Implant Titanium Based Biomaterials, **Procedia Technology**, v. 22, pp. 946-953, 2016.
- [130] Mekayarajjananonth, T. & Winkler, S. Contact Angle Measurement On Dental Implant Biomaterials, **Journal of Oral Implantology** v. XXV (4), pp. 230-236, 1999.

- [131] Lim, Y. J.; Oshida, Y.; Andres, C. J. & Barco, M. T. Surface Characterizations of Various Treated Titanium Materials, **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 16 (3), pp. 333-342, 2001.
- [132] Li, Z.; Lee, D.; Sheng, X.; Cohen, R. E. & Rubner, M. F. Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities, **Langmuir**, v. 22, pp. 9820-9823, 2006.
- [133] Lampin, M.; Warocquier-Clérout, R.; Legris, C.; Degrange, M. & Sigot-Luizard, M. F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 36 (1), pp. 99-108, 1997.
- [134] Chang, H.-I & Wang, Y. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds, In: **Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials**. Ed. INTECH Open Access Publisher. p.571, 2011.
- [135] Zareidoost, A.; Yousefpour, M.; Ghaseme, B. & Amanzadeh, A. The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 23 (6), pp.1479-1488, 2012.
- [136] Martínez-Ibáñez, M.; Juan-Díaz, M. J.; Lara-Saez, I.; Coso, A.; Franco, J.; Gurruchaga, M.; Suay Antón, J. & Goñi, I. Biological characterization of a new silicon based coating developed for dental implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, pp. 80, 2016.
- [137] Zhang, E.; Zheng, L.; Liu, J.; Bai, B. & Liu, C. Influence of Cu content on the cell biocompatibility of Ti-Cu sintered alloys, **Materials Science and Engineering: C**, v. 46, pp.148-157, 2015.
- [138] Meerloo, J. V.; Kaspers, G. J. L. & Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Clifton, N.J., **Methods in molecular biology**, Pubmed v. 731, pp. 237-245, 2011.
- [139] Zilio, R., **Modificação da superfície de aço inoxidável por implantação iônica de prata (Ag+) a baixas energias e nitretação a plasma: alternativas para redução de patógenos alimentares em superfícies metálicas**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- [140] Chiang, W. C.; Tseng, I. S.; Moller, P.; Hilbert, L. R.; Nielsen, T. T. & Wu, J. K. Influence of silver additions to type 316 stainless steels on bacterial inhibition, mechanical properties, and corrosion resistance. **Materials Chemistry and Physics**, v.119, pp. 123-130, 2010.
- [141] Ni, H. W.; Zhang, H.; Chen, R.; Zhan, W.; Huo, K. & Zuo, Z. Antibacterial properties and corrosion resistance of AISI 420 stainless steels implanted by silver and copper ions. **International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials**, v. 18, pp. 322-327, 2012.
- [142] Osés, J.; Palacio, J. F.; Kulkarni, S.; Medrano, A.; García, J. A. & Rodríguez, R. Antibacterial PVD coatings doped with silver by ion implantation. 2014. **Applied Surface Science**, v. 310, pp. 56-61, 2014.