

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Escola de Engenharia

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

PPGE3M

**Avaliação do uso de filme híbrido com deposição de titânio em substrato de aço
inoxidável AISI 316L para potencial aplicação como biomaterial**

MARIELEN LONGHI

Tese de Doutorado

Porto Alegre

2021

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Escola de Engenharia

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

PPGE3M

**Avaliação do uso de filme híbrido com deposição de titânio em substrato de aço
inoxidável AISI 316L para potencial aplicação como biomaterial**

MARIELEN LONGHI

Tese realizada no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, em colaboração com o Laboratório de Membranas e Materiais da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Porto Alegre

2021

MARIELEN LONGHI

**Avaliação do uso de filme híbrido com deposição de titânio em substrato de aço
inoxidável AISI 316L para potencial aplicação como biomaterial**

Esta tese foi analisada e julgada adequada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia, área de concentração Ciência e Tecnologia dos Materiais, sendo aprovada em sua forma final pela orientadora e pela banca examinadora do programa de pós-graduação.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jane Zoppas Ferreira (UFRGS)

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Venina dos Santos (UCS)

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Fernando Rodrigues Jr.

Prof.^a Dr.^a Claudia Trindade Oliveira

Prof.^a Dr.^a Lílian Rossa Beltrami

Prof. Dr. Afonso Reguly
Coordenador do PPGE3M

AGRADECIMENTOS

Gratidão é o segredo, a Deus e a todos que de algum modo contribuíram para a execução desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora, professora Dr^a. Jane Zoppas, pela grandiosa oportunidade, por todo o apoio dedicado. À professora Dr^a. Venina Santos pela co-orientação, auxílio e dedicação durante a realização deste trabalho.

Agradeço à UFRGS e a UCS pela concessão dos laboratórios e equipamentos, em especial ao LACOR-UFRGS, LAMEM-UCS e LCOR-UCS, ao programa de Pós-Graduação PGEPROTEC, e ao Prof. Dr. Ademir José Zattera e à Prof.^a Dr.^a Camila Baldasso.

Ao LESTT, ao Prof. Dr. Cesar Aguzzoli e aos mestrandos Ana Elisa Dotta Maddalozzo e Cristian Fontoura, pelo auxílio na preparação das amostras e execução de ensaios.

Agradeço à Dr.^a Patrícia Pranke e ao IPCT da Faculdade de Farmácia da UFRGS pela disponibilização do laboratório e equipamentos, e à querida Dr.^a Natasha Maurmann pela imensurável dedicação em me auxiliar na realização da caracterização biológica.

À empresa Esterilizare de Caxias do Sul, em especial à enfermeira Caroline Bellaver, pela doação de seus serviços de esterilização.

Ao CNPq e à CAPES pela bolsa de fomento para realização da pesquisa.

Ao meu querido Júlio César por estar sempre ao meu lado ao longo desta trajetória, me incentivando e encorajando.

Aos meus amados pais, Oscar e Sueli e meu irmão Ricardo, por toda força, amor, apoio e compreensão a mim dedicada.

À minha família do coração, Andressa e os pequeninos Caio e Davi, por estarem sempre por perto.

Ao amigo que a pesquisa fez irmão, Lucas, por estar sempre disposto a me auxiliar.

À minha amiga Suelem, pelas caronas divididas e lamentações compartilhadas.

Aos amigos que fiz ao longo do curso, especialmente aqueles da hora do café: Rosiana, Lilian, Joicei, Alessandra, Camila, Oscar.

A todos que de alguma forma estiveram presentes na realização desta pesquisa, deixo registrada minha gratidão.

*“O vencedor
não será o mais forte, será aquele que melhor se adaptar.”*
Charles Darwin

RESUMO

Os biomateriais metálicos são os materiais mais utilizados, devido às excelentes propriedades mecânicas quando comparados a outros materiais, como os cerâmicos e poliméricos. Dentre os metais mais aplicados em implantes, destacam-se os aços inoxidáveis ASTM F138, AISI 316L e o AISI 304L, além do titânio puro e suas ligas. Quando em contato com fluidos corpóreos, os biomateriais devem apresentar biocompatibilidade, especificamente para os biomateriais metálicos, além de não sofrerem degradação precipitadamente, e que não haja liberação de íons e desgaste a tal ponto de induzir processos inflamatórios patológicos. O aço inoxidável usualmente denominado AISI 316L apresenta boas propriedades mecânicas e características de material inerte, sendo amplamente utilizado como biomaterial. Entretanto, a presença do cromo e níquel na liga pode desencadear processos alérgicos e inflamatórios no corpo humano. Além disso, implantes de aço inoxidável podem sofrer o crescimento de uma película de tecido fibroso, já existente devido a micromovimentos que ocorrem na interface biomaterial-tecido e que aumentam o risco de afrouxamento do implante. Revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos têm sido utilizados nessa área com intuito de solucionar os problemas de corrosão ocorridos em materiais metálicos. Além de não serem tóxicos para o corpo humano, os filmes orgânicos formados promovem uma excelente adesão sobre substratos metálicos, podendo atuar efetivamente como um agente de acoplamento de partículas bioativas. Torna-se promissor o emprego de revestimentos híbridos orgânicos-inorgânicos, não somente pela proteção anticorrosiva, mas também para favorecer a adesão e proliferação celular, aprimorando a biocompatibilidade do metal, podendo, deste modo, minimizar efeitos negativos de implantes cirúrgicos em seres humanos. A utilização de revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos obtidos por sol-gel, bem como a deposição de filmes finos por *magnetron sputtering* para a proteção superficial e melhora de propriedades biocompatíveis de substratos metálicos, mostrou-se uma alternativa eficaz. Nesse contexto, o objetivo deste estudo é obter e caracterizar diferentes filmes híbridos à base dos precursores alcóxidos 3-(trimetóxisililpropil)metacrilato (MAP) e tetraetóxisilano (TEOS) com deposição de titânio por *magnetron sputtering* em substrato de aço inoxidável AISI 316L para potencial aplicação como biomaterial. As amostras foram preparadas em quatro variações: sendo FH a amostra com uma aplicação e FH_2 a amostra contendo duas aplicações superficiais de filme híbrido a base de MAP e TEOS, as amostras FH_Ti10 e FH_Ti20 receberam uma aplicação de filme híbrido e posterior deposição de titânio por *magnetron sputtering* por 10 e 20 minutos respectivamente. Dessa forma, as superfícies das amostras foram estudadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com mapeamento por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e análise da rugosidade. Também foi avaliada a molhabilidade dos filmes por medidas do ângulo de contato, além do comportamento eletroquímico das amostras em solução de fluido corpóreo simulado (SBF) por potencial de circuito aberto (OCP), polarização potenciodinâmica e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). As propriedades biocompatíveis foram analisadas por ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade, utilizando os resultados obtidos por redução de Tetrazólio (MTT), liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH), além da avaliação qualitativa da adesão celular por MEV e microscopia de fluorescência. Constatou-se que as amostras contendo uma aplicação de filme híbrido tiveram suas propriedades melhoradas em todos os quesitos quando comparadas à amostra sem revestimento. A amostra FH se mostrou bem aderido ao substrato e com desempenho eletroquímico significativamente superior às demais amostras.

Além disso, baseado nos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se afirmar que o revestimento MAP e TEOS, nos parâmetros da amostra FH, ofereceram um ambiente biocompatível para células-tronco mesenquimais. Portanto, a utilização de filmes híbridos a base de MAP e TEOS aplicados em substratos de aço inoxidável 316L pode ser indicada para a aplicação em biomateriais. Em contrapartida, as amostras contendo a deposição de titânio por *magnetron sputtering* não apresentaram variações expressivas em relação ao substrato e as demais amostras estudadas. Não foi observado melhora nas propriedades do material após deposição de titânio.

Palavras chaves: *AISI 316L, revestimentos híbridos, magnetron sputtering, biomateriais.*

ABSTRACT

Metallic biomaterials are the most used due to their excellent mechanical properties when compared to other materials, such as ceramic and polymeric ones. ASTM F138, AISI 316L and AISI 304L stainless steels are among the most used metals in implants, in addition to pure titanium and its ligands. Biomaterials, specifically metallic ones, must be biocompatible and not degrade hastily when in contact with bodily fluids, in addition to not releasing ions and wearing out, which may induce pathological inflammatory processes. Stainless steel so called AISI 316L has good mechanical properties and characteristics of inert material, which is widely used as biomaterial. However, the presence of chromium and nickel in the alloy can trigger allergic and inflammatory processes in the human body. Further, stainless steel implants can undergo the growth of a thin film of fibrous tissue, which already exists due to micromovements that occur at the biomaterial-tissue interface and increase the risk of loosening the implant. Hybrid organic-inorganic coatings have been used in this area in order to solve the corrosion problems that occur in metallic materials. Besides not being toxic to the human body, formed organic films promote excellent adhesion on metallic substrates, and can act effectively as a coupling agent for bioactive particles. The use of organic-inorganic hybrid coatings is promising, not only for anti-corrosion protection, but also to favor cell adhesion and proliferation, because they improve the biocompatibility of the metal and minimize the negative effects of surgical implants in humans. The use of organic-inorganic hybrid coatings obtained by sol-gel, as well as the deposition of thin films by magnetron sputtering for surface protection and improvement of biocompatible properties of metallic substrates, proved to be an effective alternative. Within this context, the aim of this study is to obtain and characterize different hybrid films based on the alkoxide precursors 3-(trimethoxysilylpropyl) methacrylate (MAP) and tetraethoxysilane (TEOS), with titanium deposition by magnetron sputtering on AISI 316L stainless steel substrate for potential application as biomaterial. The samples were prepared in four variations: the sample with one application (FH) and the sample containing two superficial applications of hybrid film based on MAP and TEOS (FH_2), samples FH_Ti10 and FH_Ti20 received an application of hybrid film and later deposition of titanium by magnetron sputtering for 10 and 20 minutes respectively. Thus, the surfaces of the samples were studied using scanning electron microscopy (SEM) with mapping by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and the evaluation of surface roughness. The hydrophobicity of the films was also evaluated by contact angle measurements. Electrochemical behavior of the samples in simulated body fluid solution (SBF) was performed by open circuit potential (OCP), potentiodynamic polarization and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Biocompatible properties were analyzed by cell viability and cytotoxicity tests, using the results obtained by reducing Tetrazolium (MTT) and release of Lactate Dehydrogenase (LDH). Cell adhesion was qualitatively assessed by SEM and fluorescence microscopy. The samples containing a hybrid film application had improved properties in all aspects when compared to the sample without coating. The film proved to be well adhered to the substrate and its electrochemical performance is significantly superior to the other samples. An excellent behavior was observed in terms of cell viability and adhesion. Therefore, the use of hybrid films based on MAP and TEOS applied on 316L stainless steel substrates can be indicated for application in biomaterials.

However, the samples containing the titanium deposition by magnetron sputtering did not show significant variations in relation to the substrate and the other studied samples. There was no improvement in the properties of the material after titanium deposition.

Keywords: *AISI 316L, hybrid coatings, magnetron sputtering, biomaterials.*

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2. OBJETIVO GERAL..... | 20 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 21 |
| 3.1. BIOMATERIAIS | 21 |
| 3.1.1. Biomateriais Metálicos..... | 24 |
| 3.1.2. Aço inoxidável como biomaterial..... | 26 |
| 3.1.3. Corrosão em biomateriais metálicos..... | 29 |
| 3.2. FILMES HÍBRIDOS..... | 31 |
| 3.2.1. Método sol-gel..... | 32 |
| 3.2.2. Precursores alcóxidos MAP e TEOS | 35 |
| 3.2.3. Deposição física de vapor (PVD)..... | 38 |
| 3.3. VIABILIDADE CELULAR | 40 |
| 3.4. ESTUDOS RELACIONADOS A DEPOSIÇÃO POR <i>MAGNETRON SPUTERRING</i> EM BIOMATERIAIS | 42 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 45 |
| 4.1. MATERIAIS..... | 45 |
| 4.2. MÉTODOS | 46 |
| 4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS REVESTIMENTOS | 49 |
| 4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) | 49 |
| 4.3.2. Aderência..... | 49 |
| 4.3.3. Corte Transversal..... | 50 |
| 4.3.4. Ângulo de Contato..... | 50 |
| 4.3.5. Perfilometria..... | 50 |
| 4.3.6. Microscopia de Força Atômica (AFM)..... | 51 |
| 4.3.7. Ensaios Eletroquímicos | 51 |
| 4.3.7.1. <i>Potencial de Circuito Aberto (OCP)</i> | <i>51</i> |
| 4.3.7.2. <i>Polarização Potenciodinâmica</i> | <i>52</i> |
| 4.3.7.3. <i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)</i> | <i>52</i> |
| 4.3.8. Ensaios <i>in vitro</i>..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.8.1. Obtenção das células-tronco mesenquimais (CTM)..... | 53 |
| 4.3.8.2. Cultivo Celular..... | 53 |
| 4.3.8.3. Viabilidade Celular..... | 54 |
| 4.3.8.4. Citotoxicidade..... | 54 |
| 4.3.8.5. Avaliação da presença de células com coloração por DAPI..... | 55 |
| 4.3.8.6. Avaliação da viabilidade celular por coloração com calceína e iodeto de propídio..... | 55 |
| 4.3.8.7. Análise estatística..... | 55 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 56 |
| 5.1. FILMES HÍBRIDOS A BASE DE MAP/TEOS..... | 56 |
| 5.1.1. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)..... | 56 |
| 5.1.2. Ângulo de Contato..... | 62 |
| 5.1.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)..... | 63 |
| 5.1.4. Ensaios Eletroquímicos..... | 64 |
| 5.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) após análise de EIE..... | 68 |
| 5.2. DEPOSIÇÃO DE FILMES FINOS DE TITÂNIO POR MAGNETRON SPUTTERING..... | 70 |
| 5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)..... | 70 |
| 5.2.2. Topografia de Superfície..... | 73 |
| 5.2.3. Ângulo de Contato..... | 75 |
| 5.2.4. Ensaios Eletroquímicos..... | 78 |
| 5.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) após EIE..... | 81 |
| 5.2.6. Ensaios <i>in vitro</i> | 83 |
| 5.2.6.1. Viabilidade Celular - MTT..... | 83 |
| 5.2.6.2. Citotoxicidade - LDH..... | 86 |
| 5.2.6.3. Micrografia de Fluorescência após crescimento celular..... | 87 |
| 5.2.6.4. Avaliação da viabilidade celular por coloração com calceína e iodeto de propídio..... | 88 |
| 5.2.6.5. Micrografia eletrônica de varredura (MEV-FEG) após crescimento celular... .. | 89 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 93 |
| 7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMAS PESQUISAS..... | 95 |
| REFERÊNCIAS..... | 96 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

| | |
|-------------------|--|
| a.C | Tempo antes de Cristo |
| AFM | Microscopia de Força Atômica |
| AISI | <i>American Iron and Steel Institute</i> |
| ASTM | <i>American Society for Testing and Materials</i> |
| Å s ⁻¹ | Ångström por segundo |
| BRANCA | Amostra de aço inoxidável AISI 316L sem revestimento |
| CFC | Cúbico de corpo centrado |
| CTMs | Células-tronco mesenquimais |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol |
| DC | Corrente contínua |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDS | Espectroscopia por Energia Dispersiva |
| E _{corr} | Potencial de Corrosão |
| ECS | Eletrodo de calomelano saturado |
| EIS | Espectroscopia de impedância eletroquímica |
| ETO | Óxido de etileno |
| FH | Amostra contendo uma aplicação de filme a base de MAP/TEOS |
| FH_2 | Amostra contendo duas aplicações de filme a base de MAP/TEOS |
| FH_Ti10 | Amostra FH com 10 min de deposição de Ti por <i>magnetron sputtering</i> |
| FH_Ti20 | Amostra FH com 20 min de deposição de Ti por <i>magnetron sputtering</i> |
| GPa | Giga Pascal |
| IP | Iodeto de propídio |
| IPCT | Instituto de Pesquisa com Células-Tronco |
| I _{corr} | Corrente de Corrosão |
| kHz | Quilo-Hertz |
| LACOR | Laboratório de Corrosão, Proteção e Reciclagem de Materiais |
| LAMEM | Laboratório de Membranas e Materiais |
| LCOR | Laboratório de Corrosão |

| | |
|-----------------------|--|
| LESTT | Laboratórios de Engenharia de Superfícies e Tratamentos |
| Térmicos | |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| μL | Microlitro |
| $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Micrograma por mililitros |
| MAP | Alcóxidos 3-(trimetóxisililpropil)metacrilato |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MTT | 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio |
| mV | Milivolt |
| mHz | Milihertz |
| nm | Nanômetro |
| OCP | Monitoramento do potencial de circuito aberto |
| PBS | Solução tampão fosfato-salino |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PVD | Deposição física de vapor |
| Ra | Rugosidade média |
| SAE | <i>Society of Automotive Engineers</i> |
| SBF | Solução de fluido corporal simulado |
| TEOS | Tetraetóxisilano |
| UNS | <i>Unified Numbering System for Metals and Alloys</i> |
| UCS | Universidade de Caxias do Sul |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| % (m/m) | Concentração percentual massa/massa |
| V | Volt |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Evolução dos biomateriais ao longo do tempo | 22 |
| Figura 2: Estrutura química dos precursores TEOS (a) e MAP (b)..... | 35 |
| Figura 3: Mecanismos de reação para filmes obtidos a partir de precursores MAP e TEOS .. | 37 |
| Figura 4: Processo de <i>magnetron sputtering</i> com fonte DC. | 39 |
| Figura 5: Publicações científicas divulgadas a partir de 2000 até 2020 utilizando a palavra-chave “biomaterial”, segundo a PubMed. | 42 |
| Figura 6: Publicações científicas divulgadas a partir de 2000 até 2020 utilizando as palavras-chave “ <i>magnetron sputtering</i> ; biomaterial”, segundo a PubMed..... | 43 |
| Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção das amostras. | 46 |
| Figura 8: Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG para: (a) Branca; (b) FH e (c) FH_2. Magnificação original de 1000× e 10.000×. | 57 |
| Figura 9: EDS pontual dos aglomerados presentes no filme híbrido da amostra FH_2. | 58 |
| Figura 10: Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG após o teste de adesão nos sistemas: (a) FH e (b) FH_2..... | 59 |
| Figura 11: Mapeamento de elemento químico por cor das amostras (a) FH e (b) FH_2..... | 59 |
| Figura 12: Imagem MEV-FEG da seção transversal das amostras estudadas: (a) FH e (b) FH_2. | 60 |
| Figura 13: EDS da seção transversal das amostras estudadas FH. | 61 |
| Figura 14: EDS da seção transversal das amostras estudadas FH_2. | 61 |
| Figura 15: Imagens 3D da superfície das amostras obtidas por AFM: (a) Branca; (b) FH e (c) FH_2..... | 63 |
| Figura 16: Monitoramento de (a) OCP das amostras BRANCA, FH e FH_2 em solução de SBF. | 65 |
| Figura 17: Diagrama de Bode para 24 e 120 horas de imersão em SBF das amostras estudadas. | 66 |
| Figura 18: Imagens de MEV-FEG nas magnificações 1000× e 10000× para FH (a) e FH_2 (b) após 120 horas de imersão em SBF..... | 69 |
| Figura 19: MEV das camadas de filme nas amostras FH_Ti10 (a) e FH_Ti20 (b)..... | 71 |
| Figura 20: EDS - mapeamento por cor dos elementos químicos ferro, silício e titânio para amostra FH_Ti10..... | 72 |
| Figura 21: EDS - mapeamento por cor dos elementos químicos ferro, silício e titânio para amostra FH_Ti20..... | 72 |
| Figura 22: Mapeamento de elemento químico em três pontos na amostra FH_Ti20..... | 73 |
| Figura 23: Topografia de superfície por AFM das amostras (a) FH_Ti10 e (b) FH_Ti20. | 74 |
| Figura 24: Relação entre Rugosidade (Ra) e Ângulo de Contato (AC)..... | 77 |
| Figura 25: Monitoramento de (a) OCP e (b) curvas de polarização das amostras estudadas em solução de SBF. | 78 |
| Figura 26: Diagrama de Bode para as amostras BRANCA, FH, FH_Ti10 e FH_Ti20..... | 80 |
| Figura 27: MEV após ensaio de EIE para as amostras FH_Ti10 (a) e FH_Ti20 (b)..... | 82 |

| | |
|---|----|
| Figura 28: EDS pontual nas amostras (a) FH_Ti10 e (b) FH_Ti20 após 120 horas de imersão em SBF..... | 83 |
| Figura 29: Viabilidade Celular das amostras avaliadas após 14 dias de incubação onde $p < 0,001^{**}$ e $p < 0,05^*$ | 84 |
| Figura 30: Citotoxicidade de amostras e controles medida pela liberação de LDH após 1, 7 e 14 dias. As células foram semeadas na placa de poços (controle), amostras (brancas, FH, FH_Ti10 e FH_Ti20) e os poços tratados com Triton (controle de morte). *** $p = 0,000$ | 86 |
| Figura 31: Microscopia de fluorescência após crescimento celular e coloração por DAPI das amostras BRANCA (a), FH (b), FH_Ti10 (c), FH_Ti20 (d). | 87 |
| Figura 32: Microscopia de Fluorescência após coloração com calceína e iodeto de propídio das amostras BRANCA (a), FH (b), FH_Ti10 (c) e FH_Ti20 (d)..... | 88 |
| Figura 33: MEV da amostra BRANCA após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c). | 89 |
| Figura 34: MEV da amostra FH após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c). | 90 |
| Figura 35: MEV da amostra FH_Ti10 após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c). | 90 |
| Figura 36: MEV da amostra FH_Ti20 após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c). | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Composição química do aço ASTM F138 e AISI316L de acordo com as normas.. | 27 |
| Tabela 2: Composição química do aço inoxidável 316L..... | 45 |
| Tabela 3: Composição química nominal do aço inoxidável AISI 316L segundo a ASTM..... | 45 |
| Tabela 4: Parâmetros operacionais da deposição por magnetron sputtering..... | 48 |
| Tabela 5: Nomenclatura das amostras estudadas de acordo com seus parâmetros de obtenção. | 48 |
| Tabela 6: Resultados de ângulo de contato da superfície das amostras..... | 62 |
| Tabela 7: Valores médios da rugosidade das superfícies obtidos pela análise de AFM..... | 64 |
| Tabela 8: Resultados de Rugosidade Ra e Rz obtidos pelo ensaio de perfilometria dos sistemas avaliados..... | 74 |
| Tabela 9: Ângulo de contato das amostras recobertas por filme fino de Ti..... | 76 |

TRABALHOS PUBLICADOS

Longhi, M.; Casagrande, R. B.; Kunst, S. R.; Santos, V.; Ferreira, J. Z. Obtainment and Characterization of a Silicon alkoxides-based Coating Applied to a Substrate of Stainless Steel 316L for Use in Biomaterials. **Materials Research**, São Carlos, v. 22, n. 3, 2019.

Longhi, M; Maurmann, N; Santos, V; Pranke, P; Zoppas, J. Influência da Aplicação de Filmes Híbridos a Base de Precursores Alcoxidos em Substrato de Aço Inox 316L na Viabilidade de Células-Tronco. *23º Congresso Brasileiro de Engenharia dos Materiais – CBECiMat* – 04 a 08 de novembro de 2018. Foz do Iguaçu – PR, Brasil.

Longhi, M; Maurmann, N; Santos, V; Pranke, P; Zoppas, J. Desenvolvimento de Filmes Híbridos em Aço Inoxidável 316L para Aplicação como Biomaterial. *15º Congresso Brasileiro de Polímeros – CBPol* – 27 a 31 de outubro de 2019. Bento Gonçalves – RS, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

O surgimento dos biomateriais, aliados às pesquisas e as novas tecnologias em vários ramos da ciência, desencadearam grandes avanços na área da saúde. Holzapfel *et al.* (2013) e Santos *et al.* (2017) definiram biomaterial como, qualquer material natural ou sintético, bem como a sua combinação que, restaura ou substitui funções de órgãos e tecidos do corpo humano, mantendo contato intermitente ou contínuo com fluidos corpóreos em um período de tempo.

Inúmeras são as aplicações dos biomateriais, tais como substituições de articulações e membros, artérias artificiais, lentes intraoculares, biosensores, além da liberação controlada de drogas, entre outras. A evolução dos biomateriais em relação ao tempo é um processo que ainda está em andamento, e há pesquisas que já desenvolveram biomateriais biodegradáveis que participam ativamente no processo de regeneração do tecido danificado, podendo desencadear estímulos de respostas celulares específicos (HOLZAPFEL *et al.*, 2013). O uso desses materiais pode ser motivado visando qualidade de vida, restaurar alguma função específica de órgãos ou tecidos, ou, ainda, impulsionado por razões estéticas, como, por exemplo, a implantação de próteses de silicone (PIRES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017).

Dentre os mais utilizados, os biomateriais metálicos são aplicados para substituição ou reparo de ossos e tecidos em locais onde há aplicações de tensões, bem como na obtenção de utensílios cirúrgicos. Devido ao contato direto com fluidos corpóreos, os biomateriais devem ser biocompatíveis, que não induzam efeitos biológicos adversos, tóxicos, alergênicos ou carcinogênicos. Especificamente para os biomateriais metálicos, espera-se que além de ser biocompatível, o material não sofra degradação precipitadamente e que não haja liberação de íons e desgaste a tal ponto de induzir processos inflamatórios patológicos (ELIAZ, 2019; SANTOS *et al.*, 2017).

Os processos de corrosão e liberação de íons em biomateriais metálicos, bem como a interação com os tecidos e os efeitos colaterais que podem surgir, têm sido amplamente pesquisados. Estudos de Premkumar *et al.* (2018) e Rahman *et al.* (2017) destacam que grande parte dos problemas relacionados à rejeição de próteses e implantes metálicos ocorre devido a algum tipo de corrosão do biomaterial. Os íons metálicos liberados nos processos corrosivos podem interagir com os tecidos de diversas maneiras e, especificamente no caso do aço inoxidável 316L, pode ocorrer a liberação de íons como níquel e cromo. Essas interações causam efeitos adversos, tais como reações tóxicas, reações inflamatórias, reações alergênicas e reações cancerígenas. Além desses íons metálicos serem alergênicos, ao serem liberados,

podem se acumular nos tecidos circundantes ao implante ou podem ser transferidos pelo sistema circulatório para várias partes do corpo.

O uso de filmes híbridos à base de silanos, bem como filmes finos depositados por pulverização catódica, tem se tornado uma alternativa eficaz para minimizar os efeitos dos processos corrosivos em metais.

Estudos avaliaram diferentes revestimentos, obtidos à base de precursores alcóxidos de silano, por métodos como sol-gel aplicados em biomateriais. Salientando a importância da preparação da superfície para uma boa adesão ao substrato, bem como a possibilidade do uso de filmes à base de silano como pré-tratamento de superfície antes da aplicação ou deposição de outros revestimentos, tais como revestimentos à base de hidroxiapatita e biovidro (CASAGRANDE *et al.*, 2018; SALVADOR *et al.*, 2017; PREMKUMAR *et al.*, 2018). Dentre os métodos de deposição de filmes obtidos pelo método sol-gel a partir de precursores em fase líquida, o processo por *dip-coating* é bastante difundido, uma vez que esta técnica oferece um controle minucioso das etapas do processo.

Outra técnica que vem sendo bastante utilizada em recobrimento de metais é o processo de *magnetron sputtering*, que pode ser aplicado para diversas finalidades, tais como proteger a superfície metálica ou conferir o aprimoramento de propriedades (SILVA *et al.*, 2017). Estudos atuais destacam o uso da técnica em biomateriais para tornar superfícies metálicas compatíveis aos processos de osseointegração, conforme Gonzalez *et al.* (2017). O titânio e suas ligas são amplamente utilizados para essa finalidade, especialmente na obtenção de próteses e dispositivos para fixação de fraturas. Uma vez que, o titânio apresenta uma maior tendência a osseointegração quando comparado a outros biomateriais (PIRES *et al.*, 2015).

Nesse sentido, o objetivo deste estudo é obter e caracterizar diferentes filmes híbridos à base dos precursores alcóxidos 3-(trimetóxisililpropil)metacrilato (MAP) e tetraetóxisilano (TEOS) aplicados pelo processo de *dip-coating* e posterior deposição de filmes finos de titânio, utilizando o processo de *magnetron sputtering* em substrato de aço inoxidável AISI 316L para potencial aplicação como biomaterial.

2. OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar diferentes filmes híbridos a base dos precursores alcóxidos 3-(trimetóxisililpropil)metacrilato (MAP) e tetraetóxisilano (TEOS) aplicados por *dip-coating* com deposição de filmes finos de titânio por *magnetron sputtering* em substrato de aço inoxidável AISI 316L para potencial aplicação como biomaterial.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a diferença entre uma e duas aplicações de filme híbrido à base de MAP e TEOS em relação às características protetoras do filme;

definir a condição ideal, dentre as duas variações estudadas, para aplicação do filme híbrido à base de MAP e TEOS;

correlacionar a topografia das superfícies das amostras com a molhabilidade;

avaliar a influência dos tempos de deposição de 10 e 20 minutos do filme fino de titânio nas propriedades físico-químicas, morfológicas e eletroquímicas do revestimento;

avaliar a biocompatibilidade *in vitro* por meio dos resultados obtidos nos testes de viabilidade celular e citotoxicidade das amostras estudadas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. BIOMATERIAIS

Historicamente, o surgimento dos materiais aplicados para solucionar problemas na área da saúde é pontuado em 2000 a.C., no Antigo Egito. Registros de suturas realizadas com linho e ouro, além de dentes artificiais à base de conchas pelos maias por volta de 600 a.C., de ferro pelos franceses em 200 a.C., ouro e madeira pelos romanos. Além disso, substitutos ósseos de madeira foram encontrados no Antigo Egito e na Europa durante a Idade Média (PIRES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017).

Segundo estudos, as últimas cinco décadas marcaram o crescimento da ciência e engenharia de biomateriais devido à multidisciplinaridade da engenharia e das ciências da saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2019). Inicialmente, as perdas ósseas eram restituídas por cirurgias a partir da aplicação de autoenxertos nos pacientes, considerados ideais por representarem material do próprio indivíduo. Todavia, desvantagens como maior incidência de enfermidades no sítio doador e material passível de doação insuficiente limitaram esses procedimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Diante disso, surgiram os xenoenxertos, materiais provenientes de outras espécies, entretanto, com riscos de reações inflamatórias e contaminações por doenças (PRECHEUR, 2007).

O termo biomaterial recebeu diferentes definições ao longo tempo. Pela Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982, foi definido como:

“Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (HELMUS E TWEDEN, 1995).

Segundo Park (1984), biomaterial é tudo o que entra em contato com fluidos corpóreos, mesmo que este esteja localizado externamente ao corpo humano. Nessa definição, instrumentos cirúrgicos como bisturis e lâminas são considerados biomateriais.

Williams (1987) define biomaterial como sendo qualquer substância sintética ou natural, exceto fármacos, utilizada como parte ou sistema que trata ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo. Mirtchi *et al.* (1989) diz que é qualquer substância de origem natural ou

sintética que é tolerada de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos dos órgãos dos seres vivos incluindo, dessa forma, bisturis e luvas cirúrgicas como biomateriais.

Ao longo do tempo, a definição, bem como a natureza essencial dos biomateriais, evoluiu fundamentalmente. Houve um crescimento no desenvolvimento de vários dispositivos médicos e implantes que substituem tecidos danificados de forma irreversível. A pesquisa é a base que impulsiona o desenvolvimento de novos componentes com vida útil maior e interfaces entre a superfície do implante e o tecido otimizadas. A evolução dos biomateriais em relação ao tempo é um processo que ainda está em andamento. Atualmente, pesquisas já desenvolveram biomateriais absorvíveis que participam ativamente no processo de regeneração do tecido danificado, podendo desencadear estímulos de respostas celulares específicos. A Figura 1 ilustra a evolução e a conexão dos biomateriais (HOLZAPFEL *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2017).

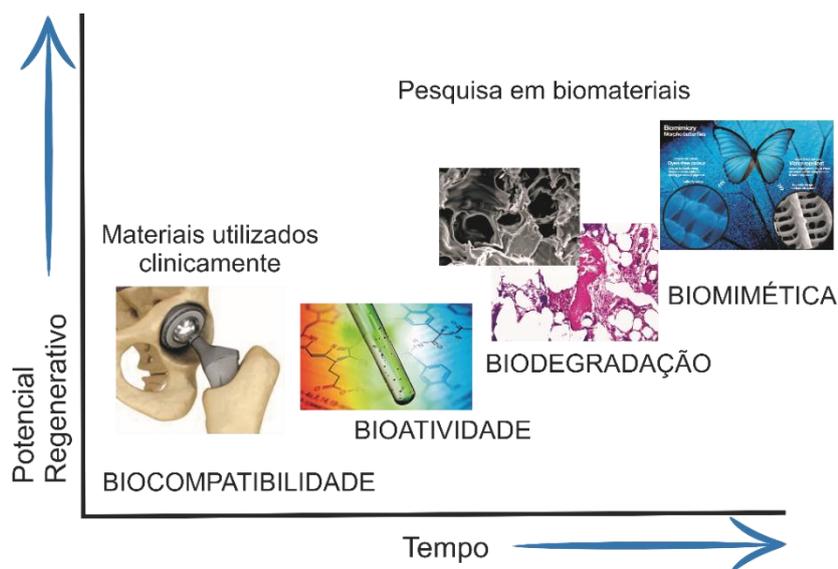


Figura 1: Evolução dos biomateriais ao longo do tempo
 Fonte: Adaptado de Holzapfel *et al.* (2013).

A escolha de um material para ser usado como biomaterial depende da análise de alguns parâmetros, tais como a degradação do material, vida útil, resistência mecânica, além da biocompatibilidade, esterilidade e biofuncionalidade.

Essas propriedades conferem ao biomaterial uma interação positiva com o organismo onde é implantado. Uma vez que o material não desencadeie resposta inflamatória ou tóxica na sua implantação *in vivo*; o tempo de degradação do material permita a ocorrência do processo de regeneração do local comprometido e não gere produtos tóxicos ou de difícil metabolização

e liberação pelo corpo humano; o material apresenta propriedades mecânicas adequadas à aplicação (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

De acordo com a resposta tecidual que provocam, os biomateriais são classificados, segundo Holzapfel *et al.*, (2013), em biotolerável, bioinerte, bioativo e absorvível. No grupo dos biotoleráveis, que são apenas tolerados pelo organismo. Geralmente, ao serem implantados, esses materiais são encapsulados por um tecido fibroso não aderente, sendo esse envoltório induzido pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros, por parte do material implantado.

Dentre os materiais bioinertes enquadram-se os que provocam ausência ou mínima resposta tecidual, apresentam mínima formação do tecido envolto, praticamente inexistente, e não liberam qualquer tipo de composto tóxico no organismo; dentre os mais utilizados tem-se alumina, zircônia, titânio e ligas de titânio. Já os bioativos são eficientes no quesito integração entre o tecido e o material, favorecendo a osteointegração, fato que ocorre devido à similaridade com a parte mineral do tecido ósseo, destacando-se os biovidros e compostos de fosfato e cálcio, como a hidroxiapatita. Os absorvíveis são os que se dissolvem, ao longo do tempo, no tecido que os envolve, caso de alguns polímeros, cerâmicas e ligas de magnésio (HOLZAPFEL *et al.*, 2013).

A gama de aplicações biomédicas para os materiais é ampla. Dentre elas, estão a utilização em dispositivos médicos para implantação permanente no corpo humano na substituição de ossos, articulações, tendões e membros (HOLZAPFEL *et al.*, 2013), válvulas cardíacas, artérias e órgãos artificiais, dentes e pele (RATNER *et al.*, 2013). Podendo ser utilizados também como um suporte temporário de células e tecidos, tais como suturas e lentes de contato (DIENER *et al.*, 2005), além da aplicação para dispositivos para liberação de fármacos na forma de implantes subcutâneos (HOLZAPFEL *et al.*, 2013).

No processo produtivo dos biomateriais são utilizados metais como aços inoxidáveis e titânio, polímeros naturais ou sintéticos na obtenção de hidrogéis, e cerâmicas. Os metais são os mais utilizados em diversas aplicações biomédicas devido às suas excelentes propriedades mecânicas quando comparados a outros materiais como os cerâmicos e poliméricos (BEKMURZAYEVA *et al.*, 2018). Dentre os metais mais requisitados na engenharia biomédica, destacam-se os aços inoxidáveis austeníticos, principalmente o ASTM F138, titânio puro e suas ligas, como a liga Ti-6Al-4V. Entretanto, os aços inoxidáveis normatizados AISI 316L e o AISI 304L, também podem ser uma possível alternativa para uso como biomaterial (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012).

Em relação à biocompatibilidade e resistência à corrosão, o Ti e suas ligas, quando comparados a outros biomateriais metálicos, apresentam um desempenho superior, sendo assim o mais aplicado na substituição de tecidos ósseos, principalmente em substituições de articulações de quadril e implantes dentários (BEKMURZAYEVA *et al.*, 2018).

3.1.1. Biomateriais Metálicos

Dentre os diferentes tipos de matérias-primas disponíveis para obtenção de biomateriais, os biomateriais metálicos representam, atualmente, a classe de materiais mais utilizados em aplicações biomédicas. Os metais e suas ligas possuem ampla aplicabilidade, incluindo dispositivos para fixação de fraturas, substituição parcial e total da articulação, hastes externas, placas e parafusos (ELIAZ, 2019)

As excelentes propriedades mecânicas, como alta tenacidade, boa resistência à tração e à fadiga, além da facilidade e custo de fabricação dos biomateriais metálicos, os torna aplicáveis a implantes que sejam submetidos a cargas e tensões, como é o caso das próteses ortopédicas. Implantes metálicos no joelho, coluna vertebral e arcada dentária ainda se enquadram nesse grupo e ainda são os mais inseridos mundialmente (HOLZAPFEL *et al.*, 2013; PREMKUMAR *et al.*, 2018; ELIAZ, 2019).

Dentre as características relevantes dos biomateriais metálicos, quando comparados a outros materiais, pode-se citar as excelentes propriedades mecânicas e alta resistência ao desgaste. Essas propriedades relacionam-se entre si, uma vez que a aceitação do material pelo tecido pode ser proporcional à quantidade de substâncias liberadas pelo metal (ARAÚJO e COUTO, 2004). As propriedades mecânicas, como resistência à fadiga, também são de importância para os biomateriais metálicos e, dependendo do tipo de implante e aplicação, as necessidades mecânicas variam (ABRAMSON *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2017).

Kumar *et al.* (2019) destacam os implantes de articulações ortopédicas como quadril, joelho, ombro, tornozelo e próteses de cotovelo como sendo os mais utilizados na substituição de ossos e os pontos mais susceptíveis a desgaste mecânico devido às atividades diárias de movimento. Os autores salientam que, apesar dos avanços tecnológicos nos processos de fabricação de novos implantes, bem como nos procedimentos médicos, ainda ocorrem muitos

casos de incompatibilidade, afrouxamento, desgaste excessivo e ações inflamatórias e, por consequência, a falha.

Os implantes metálicos permanentes à base de aço inoxidável, titânio e ligas de cromo-cobalto são os mais utilizados nas últimas décadas (HOLZAPFEL *et al.*, 2013). Entre os citados, o titânio e suas ligas possuem os módulos de elasticidade mais próximos ao do osso (o módulo de elasticidade do osso varia entre 17 GPa e 35 GPa) (WILLIAMS, 2009; HENCH, 2002), o que confere ao material um melhor desempenho perante os esforços mecânicos sofridos pelo sistema (HOLZAPFEL *et al.*, 2013).

Na superfície dos implantes à base de titânio ocorre a formação de uma camada passiva de óxido, o que é primordial para a biocompatibilidade do material, além de boa resistência à corrosão. Entretanto, seu uso tem algumas desvantagens ou limitada aplicação, como, por exemplo, o uso na obtenção de partes articuladas, como prótese de quadril é inviável, uma vez que a resistência ao cisalhamento é baixa. Outro fator importante é a possível liberação de íons de vanádio e alumínio pelo uso prolongado de algumas ligas, podendo causar reações tóxicas (HOLZAPFEL *et al.* 2013; GEETHA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2017)

Eliaz, (2019) destaca a resistência à corrosão como sendo um fator importante na seleção dos metais utilizados como biomateriais. Além disso, os níveis de toxicidade dos íons liberados pelo implante podem levar à hipersensibilidade e até mesmo ao câncer, e podem ser atingidos com taxas de corrosão insignificantes em relação ao desempenho físico do implante. Uma vez que o contato com fluidos corpóreos intensifica os processos corrosivos, as moléculas biológicas podem influenciar a taxa de corrosão, interferindo de diferentes maneiras nas reações anódicas ou catódicas. Quando as interações biológicas são combinadas com cargas mecânicas, tais como carga estática, carga dinâmica ou desgaste, além de restrições geométricas, presença de fendas ou processos inflamatórios ou quaisquer combinações dos mesmos, a corrosão é intensificada.

O aço inoxidável é muito utilizado na fabricação de implantes ortopédicos temporários e permanentes, tais como placas, fios e hastes de fixação, parafusos e pinos para correção de fraturas, por possuir boas propriedades mecânicas, densidade adequada para propósitos de suporte de carga, fácil processamento e baixo custo em relação a outros biomateriais metálicos. Além disso, a biocompatibilidade de alguns aços inoxidáveis austeníticos, tais como ASTM F138, é considerada aceitável (TALHA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2017).

Um dos requisitos essenciais para os biomateriais utilizados em implantes ortopédicos é a ausência total de ferromagnetismo, e essa é uma das vantagens do aço inoxidável utilizado neste estudo, o aço AISI 316L, que podem ser citadas, uma vez que essa liga pertence ao grupo

dos aços inoxidáveis austeníticos. A composição química dessa liga, confere a este aço alta conformabilidade e boa relação entre força aplicada e resistência à tração.

O aço ASTM F138 é frequentemente utilizado para dispositivos em cirurgia ortopédica como placas e hastes, entretanto, a presença de íons cloretos no corpo humano, e outros fatores aceleradores dos processos corrosivos e liberação de íons metálicos no meio (LIEBERMAN *et al.*, 2005; BEUERLEIN *et al.*, 2010; HOSSEINALIPOURA *et al.*, 2010; SUZUKI *et al.*, 2010).

3.1.2. Aço inoxidável como biomaterial

Os aços inoxidáveis são ligas ferrosas que possuem o elemento de liga cromo em sua composição química. A presença do elemento favorece a formação de uma camada passiva de óxido de cromo, minimizando o avanço do processo corrosivo, o que torna esse tipo de aço resistente à corrosão em vários ambientes. Além disso, pode-se aprimorar a resistência à corrosão do aço a partir da adição de elementos como níquel e molibdênio (CHIAVERINI, 2012; CALLISTER, 2016).

Por outro lado, alguns elementos de liga podem apresentar desvantagens, dependendo do meio onde o metal é utilizado. Durante processos de tratamentos térmicos, por exemplo, podem gerar a formação de precipitados indesejáveis como os carbeto de cromo nos contornos de grãos, responsáveis pelo fenômeno de sensitização, situação favorável para ocorrer corrosão intergranular. Nesse sentido, foram desenvolvidos os aços inoxidáveis baixo carbono para reduzir o fenômeno de sensitização, que recebem em sua nomenclatura a letra “L” (Low – baixo) (PADILHA e GUEDES, 1994; CHIAVERINI, 2012).

Diversas são as aplicações para os inúmeros tipos de aços inoxidáveis existentes, variando de acordo com a composição da liga. Dentre as mais difundidas, tem-se a obtenção de instrumentos, equipamentos industriais e para o uso biomédico na forma de implantes e utensílios cirúrgicos (MARTINS *et al.*, 2014; REZAEI *et al.*, 2013).

De acordo com a composição das ligas, esses aços são classificados e recebem nomenclaturas conforme as designações: *Society of Automotive Engineers* (SAE), *American Iron and Steel Institute* (AISI), *Unified Numbering System for Metals and Alloys* (UNS) e normas técnicas internacionais (ASTM e ISO).

Os aços inoxidáveis denominados pela *American Iron and Steel Institute* AISI 304L e AISI 316L são os mais utilizados na fabricação de equipamentos e utensílios para a indústria alimentícia e médica. O aço inoxidável denominado pela norma internacional *American Society for Testing and Materials* ASTM F138 é um dos mais utilizados para obtenção de implantes. Dentre os biomateriais onde essas especificações de aço são aplicadas, os implantes permanentes e temporários, pinos, hastes, placas e parafusos de fixação são os mais difundidos (MARTINS *et al.*, 2014).

O aço ASTM F138, o aço inoxidável normatizado para uso em biomateriais, se trata de uma liga semelhante ao AISI 316 L, fundido à vácuo para garantir pureza e maximização da resistência à corrosão por pites. Além disso, em comparação com o AISI 316L, normatizado pela norma ASTM A240, há uma redução nos teores máximos dos elementos fósforo e enxofre, e intervalos mais altos de teores de cromo, níquel e molibdênio (DAVIS, 2003). A Tabela 1 mostra a composição química do aço AISI316L e ASTM F138 de acordo com as respectivas normas.

Embora não sejam suficientemente resistentes à corrosão em implantes de longa duração, o uso dos aços inoxidáveis austeníticos se tornou comum na área médica como material para fabricação de pinos guia, agulhas, placas para impressão odontológica, além dos implantes, por serem relativamente mais baratos que outras ligas metálicas (PREMKUMAR *et al.*, 2018; RAHMAN *et al.*, 2017; DAVIS, 2003).

Tabela 1: Composição química do aço ASTM F138 e AISI316L de acordo com as normas.

| Elementos de liga | ASTM F138 (a) % (m/m) | AISI 316L (ASTM A240 316L) (b) % (m/m) |
|-------------------|--------------------------|---|
| Carbono | 0,03 máx | 0,03 máx |
| Manganês | 2,00 máx | 0,75 máx |
| Fósforo | 0,025 máx | 2,00 máx |
| Enxofre | 0,010 máx | 0,045 máx |
| Silício | 0,75 máx | 0,03 máx |
| Cromo | 17,00 a 19,00 | 16,00 a 18,00 |
| Níquel | 13,00 a 15,00 | 10,00 a 14,00 |
| Molibdênio | 2,25 a 3,00 | 2,00 a 3,00 |
| Ferro | balanço | balanço |

Fonte: (a) UNS S31673; (b) UNS S31603.

O aço inoxidável tem sido utilizado como material para a fabricação de stents/válvulas cardiovasculares ortopédicas próteses, e outros dispositivos para área biomédica devido à sua maleabilidade e resistência à fadiga, além do seu custo ser até dez vezes inferior quando comparado aos demais biomateriais metálicos. Apesar de suas boas propriedades mecânicas, aço inoxidável, como outros metais, carece de biofuncionalidade. Várias técnicas físico-químicas, incluindo deposição de vapor de plasma, são usados para aprimorar as propriedades do material (BEKMURZAYEVA *et al.*, 2018).

Os aços especificados AISI 316L são aços inoxidáveis austeníticos e apresentam uma maior resistência à corrosão se comparado aos demais tipos de aços inoxidáveis, principalmente por conterem percentuais menores de carbono na composição química, além de conterem níquel e molibdênio. A adição do níquel estabiliza a estrutura CFC do ferro, ampliando o campo da fase austenítica e tornando a austenita estável até em temperaturas abaixo da ambiente; e a adição do molibdênio aumenta a resistência à corrosão por tensão (ARAÚJO e COUTO, 2004; CALLISTER, 2016; PADILHA E GUEDES, 1994). Esse fato faz com que esse aço seja não magnético.

Os aços inoxidáveis AISI 316L têm uma ampla gama de propriedades preferenciais, Dhandapani *et al.* (2016) destacaram o AISI 316L como sendo uma das ligas estruturais mais usadas e recebeu considerável atenção em aplicações ortopédicas devido às suas propriedades versáteis, principalmente em cirurgias ortopédicas como fixadores para apoiar os ossos fraturados. Entretanto, quando é utilizado como material para implantes ortopédicos, em contato com fluídos corpóreos, pode liberar íons metálicos tais como Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} e Cr^{6+} . Esses íons liberados, por sua vez, na maioria dos pacientes, desencadeiam a coagulação do sangue e inflamação crônica nos tecidos circundantes (PREMKUMAR *et al.*, 2018; RAHMAN *et al.*, 2017). Segundo Talha *et al.* (2013), a liga não é resistente ao ambiente corporal e íons de ferro, cromo e níquel são liberados pelo AISI 316L quando em contato com fluidos corpóreos, podendo ocasionar reações adversas indesejáveis.

Esse processo de liberação iônica pode causar efeitos locais como irritação e inflamação nas áreas entorno do implante, e efeitos sistêmicos, ocasionando efeito tóxico sobre o organismo. A presença de 12 a 15% de níquel na composição da liga pode ser tóxico para o corpo humano. Autores destacam que altos níveis de íons de níquel em contato com os tecidos são causa de atividades genotóxicas e mutagenéticas, além de dermatites de contato (PREMKUMAR *et al.*, 2018) e, em alguns casos, de câncer (RAHMAN *et al.*, 2017). As reações mais comuns associadas ao aço inoxidável como implante são erupção na pele próximo

ao local do implante, sintomas de desconforto, eritema, inchaço e alterações na pele na área do implante (TALHA *et al.*, 2013; MULEY *et al.*, 2016).

De acordo com Premkumar *et al.* (2018), um dos principais problemas associados à necessidade de remoção do implante metálico é a infecção. É comum que a matriz hidratada da interface do implante auxilie as bactérias a agregarem e desenvolverem biopelícula sobre a superfície, desencadeando processos infecciosos. De acordo com Lu *et al.* (2017), uma vez iniciada a infecção na superfície do implante, torna-se difícil tratá-la e, muitas vezes, ocasiona a falha do implante, resultando em cirurgias de remoção, riscos à vida e custos médicos. Sendo assim, torna-se importante o desenvolvimento de materiais que apresentem características de integração com os tecidos, bioatividade e biocompatibilidade.

3.1.3. Corrosão em biomateriais metálicos

Baseado no pressuposto que os biomateriais metálicos são a classe de materiais mais utilizados no campo da medicina, a resistência à corrosão é uma propriedade importante na funcionalidade do implante, pois é considerada um dos principais fatores que regem a biocompatibilidade e a durabilidade.

Eliaz (2019), em sua revisão, destaca que a resistência à corrosão de um biomaterial afeta sua funcionalidade e durabilidade, bem como a biocompatibilidade. O autor salienta que a biocompatibilidade de um material, com exceção dos que possuem funções degradáveis, é proporcional à resistência à corrosão. Sendo assim, a corrosão é um fator fundamental no desenvolvimento e seleção de metais e ligas para uso *in vivo*.

Componentes alergênicos, carcinogênicos e tóxicos, tais como alumínio, cromo, níquel e vanádio, podem ser liberados no organismo por processos corrosivos, conforme Atapour *et al.*, 2020, o processo corrosivo dos biomateriais pode causar efeitos adversos no corpo humano, devido à liberação de íons metálicos citotóxicos. O meio em que o material se encontra é importante para impulsionar ou inibir o processo corrosivo. E se tratando de biomateriais, o contato com os fluidos corpóreos pode acelerar esse fenômeno, uma vez que há variações de pH e presença de proteínas, oxigênio e íons cloretos, o que pode ser um meio agressivo aos metais (PARK; BRONZINO, 2002; GIORDANO *et al.*, 2010).

Os íons liberados no corpo humano por processos de corrosão interagem com os tecidos por diversos mecanismos. Esses efeitos ocorrem por toxicidade, por efeitos alérgicos aos íons liberados (MORAIS *et al.*, 2007). Segundo Rahman *et al.* (2017), o contato prolongado com fluidos corporais, minerais, cloretos, aminoácidos e proteínas no ambiente fisiológico humano, por exemplo, pode favorecer a corrosão de implantes de AISI 316L (PREMKUMAR *et al.*, 2018; SHARIFNABI *et al.*, 2014).

Os processos corrosivos em biomateriais ocasionam a liberação de íons metálicos no organismo implantado. Especificamente no caso do aço inoxidável 316L, pode haver a liberação de íons como níquel e cromo. Além desses íons metálicos serem alergênicos, ao serem liberados podem se acumular dentro dos tecidos circundantes ao implante ou podem ser transferidos pela corrente sanguínea para várias partes do corpo (PREMKUMAR *et al.*, 2018; RAHMAN *et al.*, 2017). Por conseguinte, podem iniciar reações inflamatórias dentro dos tecidos circundantes e acúmulo de detritos metálicos nos tecidos moles do corpo, o que pode levar à necrose, diminuição do tempo de fixação ao osso, causando desestabilização e afrouxamento, fato comum de falha do implante (PREMKUMAR *et al.*, 2018; SHARIFNABI *et al.*, 2014; BRAEM *et al.*, 2012; NAGARAJAN *et al.*, 2009). A consequência direta disso é a necessidade de novas cirurgias para revisões ou mesmo substituições do implante, causando desconforto e incômodo ao paciente, além de mais custos desnecessários (BRAEM *et al.*, 2012).

Pesquisas comparativas entre, o aço inoxidável e as outras ligas utilizadas para fins biomédicos, mostraram que a resistência contra a corrosão é menor no aço. Estudos salientam a susceptibilidade do aço inoxidável ao ataque pelos íons cloreto presentes nos fluidos corpóreos (ARAÚJO e COUTO, 2016; GIORDANO *et al.*, 2010; BROOKS *et al.*, 2017).

Kaur *et al.* (2019) relataram algumas rachaduras e defeitos na microestrutura de substratos de aço inoxidável 316L, devido à corrosão localizada. Além disso, os autores identificaram pelas imagens obtidas por MEV e os espectros obtidos por EDS a presença de uma camada de óxido de ferro solto na superfície e outros elementos próprios da liga, tais como cromo, níquel e molibdênio. Silva e Oliveira (2011) observaram a formação da corrosão por pite em implantes de aço inoxidável produzidos em composição química dentro das especificações das normas ASTM F138-92 e ISO 5832-9, tais como hastes femorais de prótese total do quadril e parafusos removidos de pacientes.

Revestimentos superficiais são métodos efetivos de controlar a corrosão, além de ser possível obter um aprimoramento na biocompatibilidade dos implantes (CASAGRANDE *et al.*, 2018; SALVADOR *et al.*, 2017). Diversas técnicas de modificação de superfície estão sendo desenvolvidas com a finalidade de fornecer as interações desejadas por meio da funcionalização

da superfície dos implantes. Dentre as mais utilizadas, pode-se citar métodos mecânicos, pulverização a plasma, anodização, revestimentos à base de hidroxiapatita, além do método sol-gel e revestimentos à base de organo-silanos (PREMKUMAR *et al.*, 2018; SHARIFNABI *et al.*, 2014; CASAGRANDE *et al.*, 2018).

Visando minimizar esses efeitos negativos, revestimentos aplicados na superfície de implantes de aço inoxidável 316L tornam-se uma alternativa para evitar o contato direto do metal com fluidos corpóreos e melhorar a biocompatibilidade e resistência à corrosão (PREMKUMAR *et al.*, 2018). Dentre os revestimentos utilizados, os obtidos pelo método sol-gel apresentam vantagens em relação a outras técnicas de revestimento, tais como capacidade de revestir formas complexas, melhor homogeneidade, alto controle de composição, microestrutura e espessura de filmes obtidos (PREMKUMAR *et al.*, 2018; SHARIFNABI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2013), além de apresentar custo relativamente baixo e um equipamento simples para operar (SHARIFNABI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2013).

Os fluidos corpóreos fazem parte da funcionalidade do corpo humano e são esses eletrólitos que impulsionam os processos corrosivos dos biomateriais implantados. Sais dissolvidos, íons cloretos, bicarbonato, sódio, potássio e cálcio são os principais componentes para a corrosão do implante *in vivo*. Além disso, fatores como pH do meio e temperatura diferentes das condições normais do corpo humano também aceleram a liberação dos íons (ELIAZ 2019).

3.2. FILMES HÍBRIDOS

Os revestimentos de superfície são uma forma eficiente de controlar os processos corrosivos em metais, além de possibilitar o aprimoramento de propriedades como a biocompatibilidade de um implante (ROMANO *et al.*, 2011).

Os filmes híbridos, especificamente os a base de organo-silanos, constituídos por componentes orgânicos e inorgânicos, ganharam destaque na última década, principalmente pelas propriedades versáteis, tais como proteção a corrosão, favorecimento da aderência de outros revestimentos aplicados sobre os filmes híbrido aos substratos metálicos e, além de serem atóxicos ao meio ambiente quando comparados aos pré-tratamentos convencionais (BENVENUTTI *et al.*, 2009).

Estudos recentes, referem-se aos filmes híbridos como excelente alternativa para substituição de pré-tratamentos com base em sais de cério, zinco, zircônio ou ainda camadas de cromo e fosfatos. Romano *et al.* (2011) obtiveram resultados positivos para resistência à corrosão filiforme da liga de alumínio 6016, em seu estudo os autores caracterizaram filmes híbridos compostos por três silanos diferentes, (glicidiloxipropiltrimetoxissilano (GPS), tetraetoxissilano (TEOS) e metiltrietoxissilano (MTES)) hidrolisado em dois pH diferentes (2 e 3,5).

Salvador *et al.* (2017) aplicaram revestimentos a precursores 3- (trimetoxissilil propil) metacrilato e alcóxidos de tetraetoxissilano pelo método sol-gel em liga de titânio-alumínio-vanádio com o intuito de melhorar a taxa de sucesso dos implantes e controlar a liberação de íons citotóxicos pela liga metálica.

Dentre os filmes híbridos, os obtidos pelo método sol-gel a base de silanos organofuncionais evidenciam propriedades relevantes aos biomateriais, como o aprimoramento da molhabilidade e rugosidade das superfícies em que são aplicados, além de serem eficientes na proteção barreira contra processos corrosivos (KREGIEL, D., 2014).

3.2.1. Método sol-gel

O processo sol-gel foi empregado pela primeira vez em escala industrial em 1939, por Schott Glass com o intuito de depositar camadas de óxidos sobre vidros. Estudos posteriores mostraram a viabilidade de controlar a taxa das reações de hidrólise e condensação de alcóxidos durante a transição sol-gel, fato que impulsionou a utilização deste processo em várias áreas tecnológicas (HIRATSUKA, 1994; ZHENG e BOCCACCINI, 2017).

A definição do termo sol é utilizada para denominar a dispersão de partículas coloidais, com dimensões entre 1 e 100 nm, estáveis em um fluido. Já o termo gel representa um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais ou de cadeias poliméricas com a fase líquida imobilizada nos interstícios (HIRATSUKA, 1994; ALFAYA e KUBOTA, 2002).

A técnica de obtenção de revestimentos híbridos, a base de silanos, por meio de sol-gel é um método bastante difundido e de baixo custo efetivo. Dentre as principais vantagens, pode-se citar a facilidade de controle e ajuste da estequiometria, além da possibilidade de trabalhar

em condições de pressão e temperatura ambiente. (OWENS *et al.*, 2016; SALVADOR *et al.*, 2017).

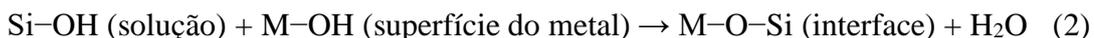
A tecnologia do sol-gel é considerada uma ferramenta versátil devido à facilidade de manipulação, configuração e composição química dos produtos, bem como a eficiência na produção de materiais com diferentes características físico-químicas para diversas aplicações (ZHENG e BOCCACCINI 2017).

A partir do processo sol-gel, é possível obter revestimentos híbridos protetores à base de precursores alcóxidos de silício. Estes revestimentos têm se destacado pelas propriedades de barreira e a ausência de toxicidade. A sua eficiência deve-se à combinação de propriedades inorgânicas e orgânicas no mesmo filme. Estudos destacam a escolha do processo sol-gel como sendo adequada para obter filmes protetores e biocompatíveis (BELTRAMI *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2017; SARMENTO *et al.*, 2010; CHOUDHURY *et al.*, 2011).

Quimicamente, o processo sol-gel é baseado em reações de polimerização de sais inorgânicos, tais como cloretos, nitratos e sulfitos, ou, ainda, precursores híbridos com ramificações orgânicas como os alcóxidos (BRINKER e SCHERER, 1990). A obtenção de filmes protetores a partir de alcóxi-silanos ocorre em etapas. Primeiramente, ocorre a hidrólise das moléculas dos alcóxi-silanos, seguida da deposição da solução hidrolisada sobre o substrato metálico a partir de adsorção por ligações de hidrogênio e posterior condensação dessas moléculas depositadas no substrato. Posteriormente às reações de hidrólise e subsequente condensação dos componentes hidratados, tem-se a formação de partículas coloidais ou cadeias poliméricas lineares. No caso dos silanos organofuncionais, a reação de hidrólise produz grupos silanóis (Si–OH) solúveis em água e etanol quando em meio ácido, e ocorre um ataque eletrofílico ao grupo OR', conforme representado pela reação (1) (OWENS *et al.*, 2016).



Hipoteticamente, se aplicados em superfícies metálicas, os silanos se ligam à superfície do metal (M) por ligações de hidrogênio entre os hidróxidos metálicos (M–OH) e os grupos OH dos silanóis, além de estabelecerem ligações de hidrogênio entre si. Durante a fase de condensação, ocorre a liberação de moléculas de água e a conversão das ligações de hidrogênio em ligações siloxano (Si–O–Si) e metalosiloxano (Si–O–M) (KUNST *et al.*, 2011). A reação (2) representa a interface silano/metálico, já a reação (3) representa a formação de um filme reticulado ou uma cadeia siloxano.



Estudos destacam que a boa adesão de filmes silanos obtidos pelo método sol-gel dependem das reações citadas anteriormente, presentes na interface silano/metálico. Além disso, os parâmetros do processo influenciam diretamente na obtenção de um filme resistente e aderente, dentre os principais pode-se citar: pH do sol, tempo de reação de hidrólise, tempo e temperatura de cura do filme, preparação da superfície do metal, além do tempo de imersão do metal no sol e a concentração dos precursores, bem como da água e do solvente utilizado (ZHU; OOIJ, 2003; KUNST *et al.*, 2011).

Longhi *et al.* (2015) mencionaram que o processo sol-gel e os diferentes parâmetros de obtenção, bem como a utilização de precursores à base de silano, funcionam como uma alternativa promissora para obter filmes protetores e biocompatíveis. Wang *et al.* (2013) estudaram diferentes proporções de revestimentos à base de precursores tetraetoxissilano (TEOS) e metiltrietoxissilano (MTES) sobre o aço inoxidável 316L e a sua influência na topografia e hidrofobicidade da superfície do material. Destacando, nesse caso, que o filme obtido com proporção molar de TEOS/MTES de 40/60 apresentou um ângulo de contato de 85° e demonstrou o melhor desempenho de compatibilidade com o sangue em stent vascular.

Salvador *et al.* (2017) avaliaram as propriedades físico-químicas, morfológicas, mecânicas e eletroquímicas de revestimentos híbridos à base de alcóxissilanos 3-metacrilato de (trimetoxissilil) propilo (MAP) e TEOS aplicados na liga Ti-6Al-4V sob a influência de diferentes temperaturas de cura e pré-tratamentos da superfície da liga para aplicações biomédicas. Os autores concluíram que o filme obtido a partir de precursores MAP e TEOS curado a 90 °C funcionou como uma barreira eficaz de proteção, denotando resistência à corrosão, o que conseqüentemente diminuiu a possível liberação de íons citotóxicos no corpo humano. Também enfatizaram que a eficiência da proteção anticorrosiva dos revestimentos está relacionada diretamente aos parâmetros escolhidos durante o processo sol-gel.

Akhtar *et al.* (2018) avaliaram os efeitos do tempo de imersão e o número de imersões para revestimentos de silano à base de glicidoxipropiltrimetoxissilano (GPTMS) e metiltrietoxissilano (MTMS) e nanopartículas de sílica preparados pelo método sol-gel aplicados em substratos de aço inoxidável AISI 304. As análises eletroquímicas mostraram que o revestimento com a melhor resistência à corrosão do aço foi o obtido com 3 ciclos de imersão e um tempo de imersão de 10 min.

Beltrami *et al.*(2017a) avaliaram diferentes precursores alcóxidos, 1,2-Bis (triétoxissilil) etano (BTSE), TEOS e MAP. Um filme espesso e irregular a partir de BTSE contrastou com o filme desenvolvido dos precursores TEOS-MAP combinados, que apresentou características de um filme mais compacto e uniforme, com boa aderência ao substrato e com maior desempenho eletroquímico quando comparado aos demais sistemas.

3.2.2. Precursores alcóxidos MAP e TEOS

Os organossilanos são compostos híbridos, uma vez que sua estrutura é composta por grupos orgânicos e grupos inorgânicos. Uma das vantagens desse tipo de composto é a compatibilidade com outros materiais, pois fornecem propriedades diversas que se encaixam a variadas aplicações (WANG *et al.*, 2007).

Utilizados como promotores de adesão, agentes de acoplamento e agentes dispersantes para cargas na indústria de revestimentos devido à boa proteção à corrosão, além das propriedades de adesão em revestimentos orgânicos e diferentes substratos metálicos (OOIJ *et al.*, 2005). Os silanos são divididos em categorias de acordo com a estrutura química, os monossilanos e os bis-silanos. A estrutura química geral dos monossilanos é representada por $X_3Si(CH_2)_nY$, onde Y corresponde ao ligante organofuncional e X é o grupo alcóxi hidrolisável; no caso dos bis-silanos, há a presença de dois grupos alcóxi hidrolisáveis, conforme estrutura geral $X_3Si(CH_2)_nY_m(CH_2)_nSiX_3$.

Os precursores TEOS e MAP são classificados no grupo dos monossilanos, cujas estruturas químicas são ilustradas na Figura 2 (a) e 2 (b), respectivamente.

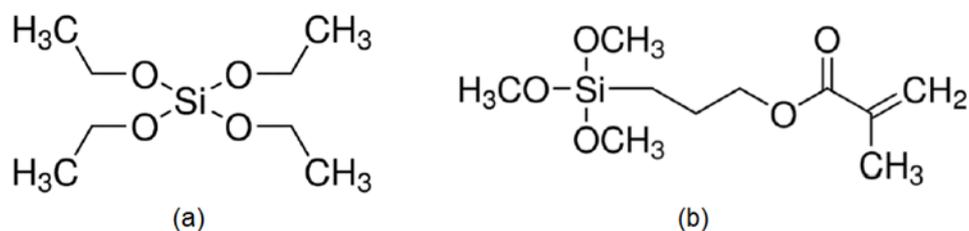


Figura 2: Estrutura química dos precursores TEOS (a) e MAP (b).
Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich (2018).

O TEOS é um monossilano muito utilizado como formador de rede e segundo dados obtidos do fornecedor, Sigma-Aldrich, apresenta as seguintes características: fórmula química

$\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, massa específica de $0,933 \text{ g mL}^{-1}$, massa molecular de $208,3 \text{ g mol}^{-1}$ e ponto de fulgor de $48 \text{ }^\circ\text{C}$. Já o MAP é bastante utilizado para obter revestimentos mais densos e compactos, uma vez que é considerado um agente alcóxido reticulado, além de possibilitar ligações estáveis entre as fases orgânicas e inorgânicas, fator que auxilia na formação de filmes menos espessos e sem fissuras (KUNST *et al.*, 2013). O MAP ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$) apresenta massa molecular $248,5 \text{ g mol}^{-1}$, massa específica de $1,045 \text{ g mL}^{-1}$ e ponto de fulgor de $92 \text{ }^\circ\text{C}$.

Beltrami *et al.* (2017) e Salvador *et al.* (2017) propuseram mecanismos de reação para filmes obtidos a partir de precursores MAP e TEOS, como ilustrado na Figura 3. Na primeira etapa, Figura 3 (a), visualiza-se a reação de hidrólise dos precursores em água e etanol, e é possível observar uma ruptura das ligações orgânicas e a formação de ligações Si–OH. Na etapa subsequente, Figura 3 (b), tem-se a ligação entre os grupos OH presentes no MAP e os grupos OH presentes no TEOS, formando uma ligação de siloxano (Si–O–Si), e as partículas silanizadas tornam-se reativas ligando-se às partículas de MAP por ligação dupla no grupo propilmetacrilato. Na fase de cura, Figura 3 (c), observa-se grupos silanóis adsorvidos na superfície do metal por meio de ligações de hidrogênio, que se tornam ligações covalentes metálicas pela reação de condensação durante o processo de reticulação, formando uma rede protetora e resistente.

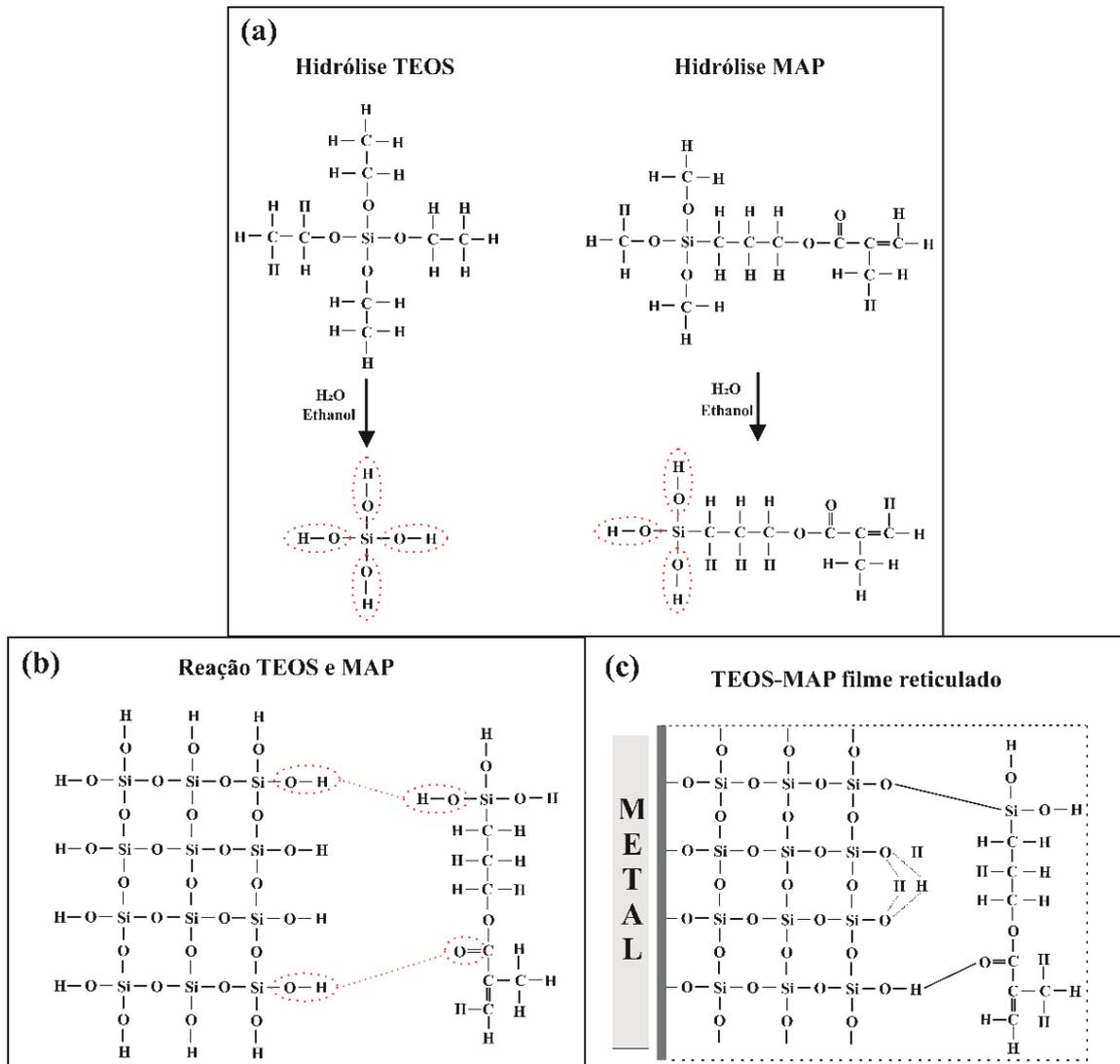


Figura 3: Mecanismos de reação para filmes obtidos a partir de precursores MAP e TEOS
 Fonte: Adaptado de SALVADOR *et al.* (2017).

Entretanto, a eficácia deste tipo de revestimento está relacionada com a preparação da superfície, a adesão ao substrato, bem como o tipo de revestimento a ser aplicado posteriormente ao filme silano (CASAGRANDE *et al.*, 2018). Os filmes híbridos obtidos a partir de precursores alcóxidos específicos são considerados pré-tratamento para a proteção a corrosão de diferentes substratos (KUNST *et al.*, 2013), além proporcionar melhorias na biocompatibilidade de implantes metálicos (CASAGRANDE *et al.*, 2018). Segundo Kunst *et al.* (2013), os componentes inorgânicos proporcionam melhoria nas propriedades de adesão e resistência à corrosão, já os componentes orgânicos dos filmes híbridos aumentam a flexibilidade e compatibilidade com outros sistemas orgânicos, tais como pintura. Nesse sentido, a deposição de filmes finos por *magnetron sputtering* sobre filmes à base de silano pode ser uma alternativa promissora para diversas aplicações.

3.2.3. Deposição física de vapor (PVD)

A deposição de filmes finos pode ser realizada a partir de diversas técnicas. Quando ocorre por deposição física de vapor (PVD), o material a ser depositado, o alvo, é transformado em vapor por processo físico, térmico ou colisão (SIMON, 2018; MATTOX, 2018).

O processo PVD consiste na remoção de átomos do alvo e o direcionamento destes para um substrato em um ambiente de vácuo ou plasma gasoso sob baixa pressão. Na superfície do substrato ocorre a nucleação e coalescência das partículas, formando um filme fino. Esse processo inicia pela formação de pequenos aglomerados que apresentam um crescimento em ilhas para posterior formação de um filme contínuo (MATTOX, 1998; BUNSHAH, 1994).

Dentre as vantagens dos processos PVD, tem-se a possibilidade de depositar filmes a temperaturas baixas, o que facilita a deposição em diversos materiais, tais como polímeros que se degradam a elevadas temperaturas, fato relevante para aplicação de metais sobre filmes poliméricos, ou filmes híbridos que se degradam com facilidade. Além disso, a espessura do filme depositado por esse tipo de técnica pode variar de nanômetros a micrômetros, e as taxas de deposição podem alcançar de 10 a 100 Å s⁻¹ (MATTOX, 2018).

O processo PVD pode ocorrer basicamente em duas variações: evaporação térmica, ou *e-beam*, e a pulverização catódica magnetrônica (*magnetron sputtering*). Quando comparadas as técnicas, o magnetron sputtering apresenta algumas vantagens em relação a *e-beam*, tais como maior adsorção, alta adesão ao substrato, pode ocorrer em baixo vácuo, além da uniformidade do filme formado (SIMON, 2018).

O *magnetron sputtering* consiste em remover átomos ou moléculas da superfície de um material sólido (alvo) e conduzir essas partículas até o substrato no qual se deseja efetuar a deposição. Os átomos do alvo, em contato com a superfície do substrato, passam por uma nucleação seguida da coalescência, o que promove a formação do filme fino. Esse processo é realizado em uma câmara de vácuo na presença de gases, constituintes do plasma, a baixas pressões (MATTOX, 2018; WASA e ADACHI, 2004).

No interior da câmara, a aplicação da alta tensão ao gás argônio em baixa pressão produz uma descarga gasosa, tendo-se a formação de uma região eletricamente neutra contendo íons de argônio e elétrons, denominado plasma (SWAN, 1988). Esquemáticamente, a Figura 4 ilustra o processo de *magnetron sputtering* com fonte de corrente contínua (DC). O alvo é conectado ao cátodo e o substrato ao ânodo, os átomos arrancados do alvo colidem no plasma na trajetória até o substrato e, dessa forma, se condensam para formar o filme fino.

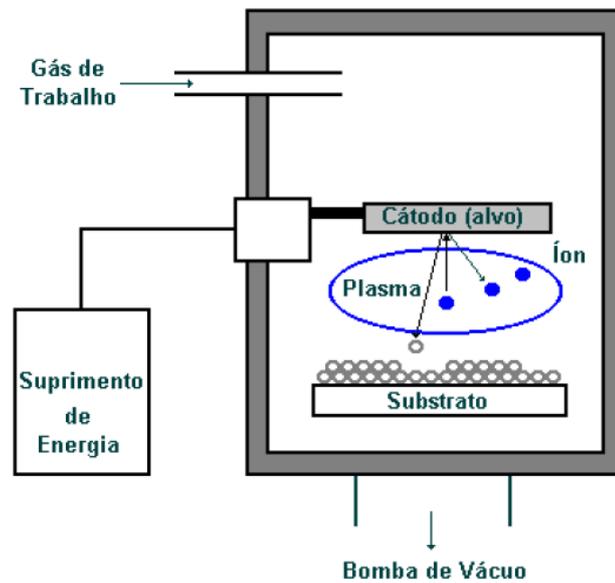


Figura 4: Processo de *magnetron sputtering* com fonte DC.
Fonte: PASCHOAL (1998).

A técnica de *magnetron sputtering* pode ser aplicada para diversas finalidades, na indústria de computadores, por exemplo, é amplamente utilizada para o recobrimento de discos rígidos, no setor metalomecânico é utilizada para obter maior resistência e dureza de metais (SILVA *et al.*, 2017).

Estudos têm aplicado o uso da técnica em biomateriais. Gonzalez *et al.* (2017) propuseram o uso de filmes finos de liga Ti-Nb como revestimento de superfície depositados em substrato aço inoxidável AISI 316L. Os resultados mostraram menores valores de módulo de elasticidade e valores de dureza iguais ou maiores do que as ligas comercialmente utilizadas, bem como altos valores de deformação plástica entre o revestimento e o substrato.

Bolbasov *et al.* (2017) avaliaram a deposição de revestimentos finos de titânio usando sputtering na superfície de suportes fibrosos biorreabsorvíveis. As propriedades físico-químicas dos scaffolds modificados foram descritas utilizando MEV, EDS, DSC, goniometria óptica, testes mecânicos, além de viabilidade e adesão celular. Os autores verificaram que a deposição de revestimentos finos de titânio na superfície dos suportes fibrosos aumenta a adesão celular possuindo atividade pró-angiogênica.

Crespo *et al.* (2018) avaliaram as condições ideais para melhorar as propriedades tribológicas, e contra a corrosão de revestimentos de dupla camada Ti/TiN depositados em substratos de aço inoxidável AISI 316L por magnetron sputtering. Os autores sugeriram,

baseados em resultados eletroquímicos, que os filmes obtidos podem ser potencialmente aplicados como implantes biomédicos.

3.3. VIABILIDADE CELULAR

Os fatores que influenciam a biocompatibilidade de um implante são inúmeros, tais como tamanho e formato do implante, composição do material utilizado, além da hidrofobicidade, rugosidade e carga da superfície. Nesse sentido, o biomaterial não deve provocar reações adversas, modificar proteínas e enzimas ou produzir respostas alérgicas e tóxicas. Além disso, o biomaterial não deve sofrer processos de degradação biológica ou mecânica, pois resultaria na perda de propriedades físicas e mecânicas (ELIAZ, 2019).

Devido às diversas reações adversas que podem ocorrer ao corpo humano em contato com um biomaterial, é importante que se avalie adequadamente o seu desempenho em contato com tecidos humanos. Para analisar o biomaterial em relação a sua biocompatibilidade, é necessário avaliar os efeitos do meio biológico sobre os materiais e os efeitos do material no tecido em que está inserido (MARQUES, REIS e HUNT, 2002; RAMOT *et al.*, 2016).

Avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial envolvem testes *in vitro* e *in vivo*. A finalidade desses ensaios direciona-se para verificar as respostas alérgicas, inflamatórias e citotóxicas do biomaterial em relação ao tecido ao qual tem contato (KATTI *et al.*, 2002). A medida da viabilidade celular de uma célula é caracterizada pela capacidade de realizar determinadas funções, tais como metabolismo, crescimento e reprodução, além da adaptabilidade ao meio (ESTRELA *et al.*, 2011).

Diversos são os ensaios utilizados para avaliar a viabilidade celular. Dentre esses, a avaliação da atividade metabólica mitocondrial pelo teste (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio) (MTT) é amplamente utilizada. Para esse ensaio, apenas as células viáveis metabolicamente ativas convertem o reagente MTT em um produto de coloração roxa. Esse componente é um precipitado insolúvel intracelular que pode ser encontrado nas proximidades das paredes das células. Para realizar as medidas de absorbâncias, o produto é solubilizado no meio de cultura, e a intensidade do sinal captado é diretamente relacionado com o número de células viáveis, sua atividade metabólica e a concentração de MTT convertido.

Outro fator importante é a adesão celular, que inclui a capacidade da célula em aderir e proliferar sobre a superfície do material. Essa fase é considerada o início da interação célula-

material. A falta de adesão pode desencadear na incapacidade da superfície do biomaterial se ligar ao tecido e ao osso adjacente, o que pode formar tecido fibroso em torno do implante, promovendo o seu afrouxamento (CHEN e THOUAS, 2015).

Segundo Feller *et al.* (2015), o grau de rugosidade da superfície, a química da superfície, topografia e molhabilidade de um biomaterial afetam as respostas celulares, tais como adesão, proliferação, diferenciação e migração. De um modo geral, a adesão celular ocorre por meio de vários mecanismos que incluem interações entre receptores da superfície celular e moléculas específicas que são adsorvidas, depositadas ou secretadas sobre o biomaterial.

A superfície do biomaterial é o primeiro componente do implante que entra em contato com as células ou fluidos biológicos. Sendo assim, a biocompatibilidade será influenciada principalmente pelas características da superfície do material, e torna-se importante que o biomaterial apresente uma superfície que se integre ao osso e tecidos circundantes. Estudos indicam que é necessário considerar propriedades como rugosidade, molhabilidade e topografia da superfície para manter a eficiência do implante durante sua vida útil (CHEN e THOUAS, 2015; ELIAZ, 2019; MENZIES e JONES, 2010).

Casagrande *et al.* (2018) afirmaram que a utilização de revestimentos híbridos obtidos por sol-gel aplicados sobre superfícies metálicas pode ser uma alternativa para aprimorar a capacidade de osseointegração e diminuir a rejeição dos implantes, tornando a superfície propícia a diferenciação de células-tronco mesenquimais (CTMs).

Premkumar *et al.* (2018) afirmaram que a modificação de superfícies de aço inoxidável AISI 316L com aplicação de um revestimento biocerâmico é um método eficaz para aumentar a resistência à corrosão e a biocompatibilidade do material.

Hosseinalipoura *et al.* (2010) relataram que a obtenção de revestimentos híbridos orgânicos-inorgânicos à base de metacriloxipropiltrimetoxissilano (TMSM) e tetraetilortossilicato (TEOS) em diferentes proporções molares por sol-gel, aplicados em aço inoxidável AISI 316L, apresentaram resultados promissores. Os revestimentos aumentaram a hidrofiliabilidade das superfícies de aço 316L, além disso, testes *in vitro* mostraram a não toxicidade para células L929.

Díaz *et al.* (2016) destacaram em seu estudo que revestimentos híbridos (orgânico-inorgânicos) obtidos por sol-gel liberaram gradativamente compostos de silício sob condições *in vivo*, estimulando a proliferação de células ósseas e, conseqüentemente, uma rápida e efetiva osseointegração. Dessa forma, evidencia-se a relevância de pesquisas relacionadas ao uso de revestimentos híbridos obtidos por sol-gel, além de outros métodos de modificação de superfícies metálicas para aplicações em biomateriais.

3.4. ESTUDOS RELACIONADOS A DEPOSIÇÃO POR *MAGNETRON SPUTTERING* EM BIOMATERIAIS

Considerando o cenário da crescente demanda por biomateriais e o número de empresas que investem no desenvolvimento de novos materiais para a área biomédica, a motivação deste estudo contextualiza-se, também, no aumento das pesquisas relacionadas ao campo dos biomateriais nos últimos 20 anos.

A Figura 5 ilustra graficamente o número de publicações relacionadas ao tema “biomateriais”, segundo a PubMed. É possível observar que é um tema de pesquisa crescente, com um aumento gradativo no número de publicações sobre o assunto ao longo dos anos.

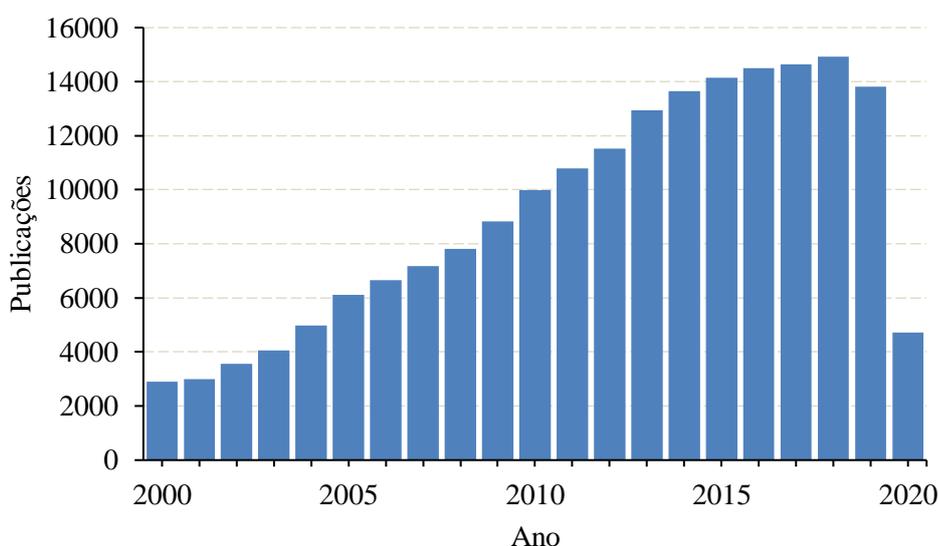


Figura 5: Publicações científicas divulgadas a partir de 2000 até 2020 utilizando a palavra-chave “biomaterial”, segundo a PubMed.

Todavia, a modificação de superfícies de biomateriais utilizando *magnetron sputtering* é um tema bastante recente. Observa-se, na Figura 6, o gráfico representativo do número de publicações para as palavras-chave “biomateriais” e “*magnetron sputtering*”, que o tema ainda é pouco difundido e, embora o número de pesquisas seja crescente, ainda é um assunto pouco estudado no campo dos biomateriais.

De acordo com a ampliação do mercado na área da saúde, novos biomateriais surgem. Pesquisas recentes destacam métodos de modificação de superfície dos materiais como técnicas promissoras. Subramanian *et al.* (2013) estudou a resistência a corrosão e adesão bacteriana de

revestimentos nanoestruturados de nitreto de titânio (TiN) e nitreto de nióbio (NbN), preparados pelo método de pulverização por magnetron sputtering em substratos de aço inoxidável AISI316L. Os implantes revestidos com multicamadas TiN/NbN apresentaram uma redução significativa na quantidade de bactérias aderidas à superfície do material, em relação às amostras sem revestimento com rugosidades maiores. Além disso, as curvas de polarização potenciodinâmica, utilizando como eletrólito fluido corpóreo simulado, mostraram uma variação positiva nos valores de E_{corr} e a diminuição de I_{corr} , o que representa uma maior resistência à corrosão das amostras revestidas em comparação ao substrato.

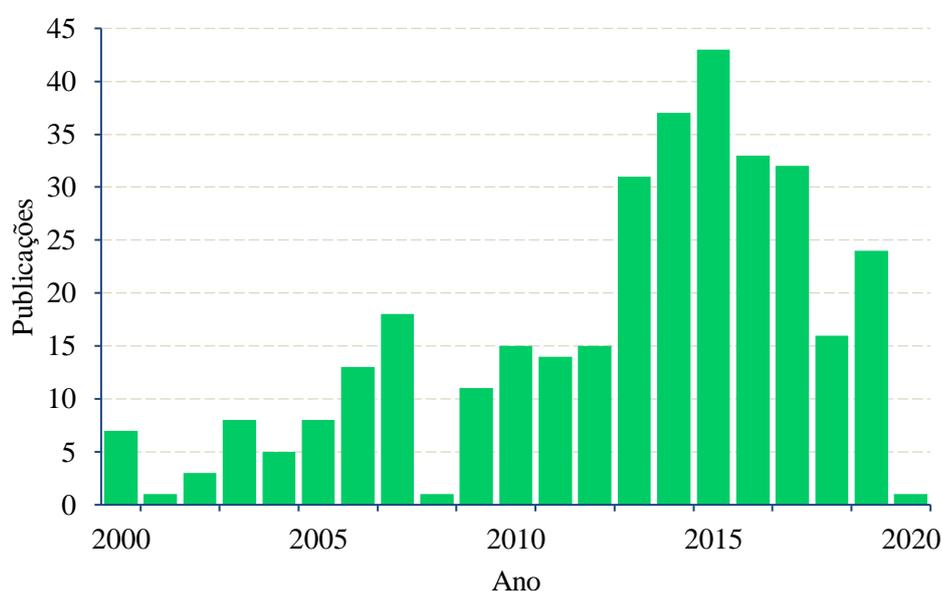


Figura 6: Publicações científicas divulgadas a partir de 2000 até 2020 utilizando as palavras-chave “*magnetron sputtering; biomaterial*”, segundo a PubMed.

No estudo de Yi *et al.* (2019), foram avaliados dois revestimentos à base de nitreto de titânio e nitreto de zircônio depositados por *magnetron sputtering* em substrato de aço inoxidável AISI 316L, concluindo que os revestimentos TiN e ZrN aumentaram significativamente a resistência do substrato. Conforme as curvas de polarização e os diagramas de EIE, os autores atribuíram ao revestimento de TiN maior resistência à corrosão comparado ao revestimento de ZrN. Além disso, os resultados do ângulo de contato indicaram que o TiN e o ZrN também podem melhorar a hidrofobicidade do aço inoxidável.

Bait *et al.* (2017) avaliaram a influência da tensão de Bias nas propriedades de filme de TiO₂ depositado por *magnetron sputtering* em substrato de aço inoxidável AISI 304L para aplicações biomédicas. Resultados experimentais mostraram que houve um aumento na dureza do material, de 2,2 para 6,4 GPa, utilizando uma tensão de 75 V. Além disso, também foi

observado pelos autores um aprimoramento nas propriedades eletroquímicas em relação à amostra não tratada. Para simular condições biológicas naturais, o soro fisiológico (pH = 6,3), controlado termostaticamente a 37 °C, foi utilizado como eletrólito.

Dhandapani *et al.* (2016) utilizaram carbono amorfo incorporado com titânio (a-C:Ti) pela técnica de *magnetron sputtering* para revestir aço inoxidável AISI 316L, com o objetivo de aprimorar as propriedades tribológicas, de resistência à corrosão e biocompatibilidade do material. Dentre as variações testadas, a amostra que apresentou a presença de TiC nanoestruturado para teor de Ti de 2,33% em massa demonstrou propriedades tribológicas superiores em comparação com os outros revestimentos a-C:Ti. Além disso, estudos de corrosão foram realizados em fluido corpóreo simulado e mostraram que as amostras contendo Ti na composição do revestimento foram mais resistentes à corrosão quando comparadas às amostras que continham somente a-C puro. Seguindo essa tendência, os testes de biocompatibilidade *in vitro* com osteoblastos também mostraram a melhora das propriedades nas amostras contendo Ti em relação às demais. Os autores afirmam, com base nesses resultados, que revestimentos de a-C:Ti nas proporções ideais, depositados por *magnetron sputtering* em aço inoxidável AISI 316L, podem ser uma alternativa eficiente para melhorar as propriedades do biomaterial.

Embora haja pesquisas que avaliem o método de deposição por *magnetron sputtering* em substratos de aço inoxidável para aplicação como biomaterial, o estudo da biocompatibilidade e das propriedades eletroquímicas de materiais, obtidos pela deposição de titânio em aço inoxidável AISI 316L é um assunto relevante e inovador diante do crescimento do uso dos biomateriais. Portanto, pesquisas relacionadas a esse tema são pertinentes, uma vez que é um assunto ainda pouco explorado na amplitude do campo dos biomateriais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Os reagentes utilizados nesta pesquisa foram: os precursores alcóxidos de silício tetraetoxissilano (TEOS, 96%) e metacrilato de 3-(Trimetoxissilil)propil (MAP, 96%), ambos adquiridos da empresa Sigma-Aldrich, álcool etílico (99,5%) e ácido acético (99,8%), fornecidos pela Neon Comercial Ltda. Na deposição de titânio utilizou-se um alvo de Ti fornecido pela William Advanced Materials, EUA, com pureza de 99,995%.

Para a aplicação do revestimento, foram empregados painéis de aço inoxidável AISI 316L, fornecidos por Michelin Máquinas e Equipamentos Ltda., com dimensões de 20 mm × 20 mm × 2 mm. A Tabela 2 apresenta a composição química (em percentual mássico) do aço inoxidável empregado neste estudo, realizada pelo método de emissão óptica no Espectro Cast do Laboratório de Ensaios Mecânicos (LAMEC) da Universidade de Caxias do Sul (UCS), e a Tabela 3 apresenta a composição nominal do aço inoxidável AISI 316L segundo a norma ASTM A240 316L. Observa-se que a composição do aço utilizado neste estudo condiz com os limítrofes da norma, onde os elementos cromo e o níquel apresentaram percentuais mássicos de 15,36 e 9,81 % m/m, respectivamente.

Tabela 2: Composição química do aço inoxidável 316L

| Elementos | C | Si | Mn | P | S | Cr | Ni | Mo | Co | Fe |
|-----------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|------|-------|--------|--------|
| % (m/m) | 0,0282 | 0,4567 | 1,362 | 0,0321 | 0,0148 | 15,36 | 9,81 | 1,781 | 0,2457 | 70,909 |

Tabela 3: Composição química nominal do aço inoxidável AISI 316L segundo a ASTM

| Elementos | C máx. | Si máx. | Mn máx. | P máx. | S máx. | Cr | Ni | Mo | Fe |
|-----------|--------|---------|---------|--------|--------|-------|-------|-----|---------|
| % (m/m) | 0,03 | 0,75 | 2,00 | 0,045 | 0,03 | 16-18 | 10-14 | 2-3 | balanço |

Fonte: ASTM A240 316L.

Embora o aço denominado F138 seja o mais indicado para o uso em biomateriais, nesta pesquisa foi utilizado substrato de aço inoxidável AISI 316L, principalmente pelo seu baixo custo. O intuito de utilizar esse aço inoxidável para este estudo foi justamente verificar a

possibilidade de aprimorar as propriedades do material, a tal ponto de torná-lo equivalente a materiais mais nobres para as aplicações biomédicas, com custo acessível.

4.2. MÉTODOS

A Figura 7 mostra o fluxograma do processo da obtenção das amostras.

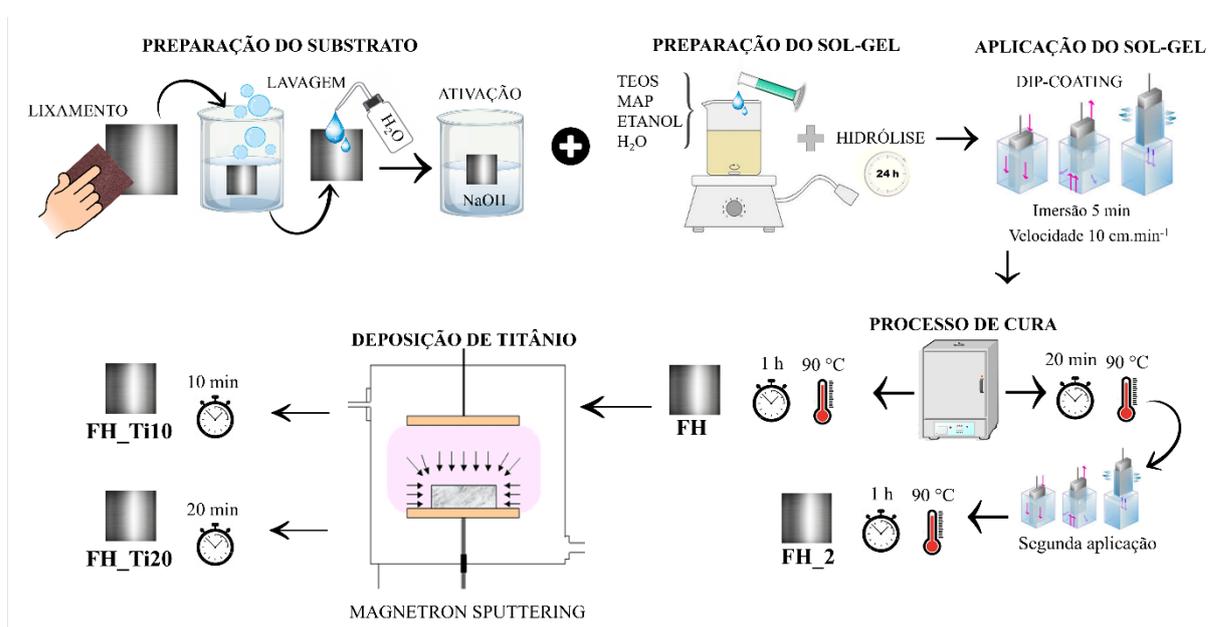


Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção das amostras.

Todas as amostras foram lixadas com lixa de carboneto de silício de diferentes granulometrias (#320, #600, #1000 e #1200) para nivelar suas superfícies, antes de receber o filme híbrido. Após esse processo, as amostras foram desengraxadas com detergente alcalino Extran MA01 Merck e enxaguadas com água destilada. Posteriormente, a fim de melhorar a adesão do revestimento ao substrato, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH 0,01 mol L⁻¹) por 3 min a 20 °C (CASAGRANDE *et al.*, 2018; SALVADOR *et al.*, 2017).

Os revestimentos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de reações de hidrólise dos precursores MAP e TEOS em etanol e água destilada nas seguintes proporções: TEOS (10% v/v); MAP (15% v/v); água (15% v/v); etanol (60% v/v) (BELTRAMI *et al.*, 2017; SAKAI *et al.*, 2012; SALVADOR *et al.*, 2017). O filme híbrido foi obtido pelo método sol-gel e os valores

de pH foram ajustados com ácido acético ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em torno de 4. Posteriormente, o processo de hidrólise solúvel foi realizado por um período de 24 horas a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (KUNST *et al.*, 2013). Os parâmetros utilizados neste estudo estão baseados na literatura citada anteriormente e em ensaios laboratoriais preliminares.

As amostras foram divididas em dois grupos: um grupo de amostras foi submetido a uma aplicação superficial de revestimento (FH) e o outro grupo de amostras foi submetido a duas aplicações superficiais de revestimento híbrido (FH_2).

O grupo FH recebeu uma aplicação de sol na superfície metálica por *dip-coating*, com taxa de imersão e remoção de 10 cm min^{-1} com tempo de permanência de 5 min (KOKUBO *et al.*, 2006). Após a aplicação do sol, as amostras foram expostas ao ar durante 20 min à temperatura ambiente de aproximadamente $20 \text{ }^\circ\text{C}$ para promover a evaporação dos solventes e iniciar a condensação do revestimento no substrato. O filme obtido foi curado em estufa por 1 hora à temperatura de $90 \text{ }^\circ\text{C}$ (BELTRAMI *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2017). No grupo FH_2, após a exposição ao ar por 20 min e a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa, as amostras receberam uma segunda aplicação de sol pelo processo de *dip-coating* utilizando os mesmos parâmetros que a primeira aplicação. Posteriormente, os sistemas foram conduzidos para cura em estufa a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora.

A deposição do filme fino de titânio por magnetron sputtering foi realizada nas amostras contendo uma aplicação de filme híbrido (após caracterização das amostras contendo o filme híbrido, definiu-se que o sistema FH apresentou o melhor desempenho em relação a FH_2 diante da proteção a corrosão do substrato). Para a deposição do titânio foi utilizado um equipamento de pulverização catódica magnetrônica (*magnetron sputtering*), via técnica de Deposição Física de Vapor (PVD), no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos (LESTT) da Universidade de Caxias do Sul. Os parâmetros utilizados para a deposição estão descritos na Tabela 4 e foram baseados em alguns autores (BATISTA NETO e CASTRO, 2015; NEMATİ *et al.*, 2018; ROMAN, 2010; CRESPO *et al.*, 2018) e em testes preliminares.

Todos os parâmetros de processo (Tabela 4) foram mantidos fixos, exceto o tempo de deposição nas variações 10 e 20 minutos.

Tabela 4: Parâmetros operacionais da deposição por *magnetron sputtering*.

| Parâmetros Operacionais | |
|---|--------------------|
| Potência DC (W) | 100 |
| Pressão de Base (mbar) | 2×10^{-6} |
| Pressão de Trabalho (mbar) | 5×10^{-3} |
| Temperatura de operação (°C) | 20 |
| Tempo de Processo (min) | 10; 20 |
| Distância entre o alvo e a amostra (cm) | 6 |
| Alvo | Ti |

A Tabela 5 descreve a nomenclatura utilizada para cada sistema de amostras, bem como os parâmetros utilizados.

Tabela 5: Nomenclatura das amostras estudadas de acordo com seus parâmetros de obtenção.

| Nomenclatura da amostra | Aplicação de filme híbrido MAP/TEOS (número de aplicações) | Deposição de Ti por <i>magnetron sputtering</i> (tempo de deposição em min) |
|-------------------------|--|--|
| BRANCA | - | - |
| FH | 1 | - |
| FH_2 | 2 | - |
| FH_Ti10 | 1 | 10 |
| FH_Ti20 | 1 | 20 |

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS REVESTIMENTOS

4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

Para avaliar a morfologia dos filmes estudados, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo Tescan Mira3 (MEV-FEG) da Tescan Orsay Holding, República Tcheca, no Laboratório Central de Microscopia (LCMIC), na Universidade de Caxias do Sul (UCS). As amostras foram observadas no topo para identificar a morfologia inicial da superfície, após ensaio de aderência e após o teste de impedância eletroquímica para verificar variações nos filmes e presença de produtos de corrosão, e posterior aos ensaios in vitro para verificar a presença de células aderidas. Após o cultivo celular, as matrizes foram fixadas com glutaraldeído por 30 minutos, lavadas com tampão PBS e desidratadas com etanol:água (gradiente por no mínimo 2 horas nas concentrações de 25, 40, 55, 70, 85 e 100%), posteriormente receberam uma fina metalização com ouro. Além disso, as amostras foram observadas após um corte transversal para avaliar a espessura dos filmes formados. O mapeamento elementar dos filmes foi realizado por espectroscopia por energia dispersiva (EDS) usando o equipamento X-Maxd da Oxford Instruments, Reino Unido.

4.3.2. Aderência

O teste de aderência permite avaliar a adesão de filmes em substratos metálicos, aplicando e removendo uma fita sensível a pressão sobre cortes feitos no revestimento. A aderência do revestimento ao substrato metálico foi avaliada seguindo o método B da norma ASTM D3359-09. Foram realizados seis cortes horizontais e seis cortes verticais com espaçamento de 2 mm e ângulo de 90° entre eles. Uma fita fibrosa 3M Scotch foi aplicada sobre a área cortada, a fita foi removida em um único movimento em um ângulo de 180° e a área deslocada comparada com a norma.

4.3.3. Corte Transversal

A preparação das amostras para realização das micrografias da sessão transversal consistiu das etapas de corte da amostra, embutimento a frio com resina Poliéster e polimento com pasta de diamante. O corte da amostra foi realizado com a finalidade de se obter a sessão transversal da superfície das amostras. O procedimento foi realizado no Laboratório de Ensaios Mecânicos (LAMEC) da Universidade de Caxias do Sul (UCS). Após corte, as amostras foram embutidas a frio em um molde de silicone com o uso de resina Poliéster TECLAGO, foi deixado 24 horas em temperatura ambiente para a polimerização completa. Posteriormente, as amostras foram polidas em uma politriz metalográfica de 2 velocidades e 2 pratos PL02ED – TECLAGO, São Paulo – Brasil.

4.3.4. Ângulo de Contato

A molhabilidade das amostras foi avaliada a partir da medida de ângulo de contato (AC) estático pelo método da gota séssil, utilizando um tensiômetro (Modelo 300, SEO Phoenix, Coreia do Sul), no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos II (LEST II). Foram realizadas 3 medições em cada amostra em triplicata, com a técnica da gota séssil, utilizando-se fluido corpóreo simulado (SBF).

4.3.5. Perfilometria

A rugosidade média (Ra) foi avaliada por meio de medições realizadas com um perfilômetro (112, Taylor Hobson, Inglaterra) no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos II (LEST II), os valores obtidos foram a média das medidas de 3 trilhos de 10 mm em 3 direções diferentes (0°, 45°, 90°).

4.3.6. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) foi realizada com um Shimadzu SPM-9700, Shimadzu do Brasil, operando em modo contato, com pontas de SiN e capacidade de varredura vertical de 8 μm e área de varredura de 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. A avaliação da rugosidade superficial por AFM foi realizada por meio de medidas de Ra (desvio médio aritmético dos perfis). O ensaio foi realizado no LCMIC, na UCS.

4.3.7. Ensaio Eletroquímicos

Os testes eletroquímicos foram conduzidos para avaliar a barreira e o efeito protetor dos filmes estudados. O desempenho frente a proteção contra a corrosão dos revestimentos foi avaliado a partir do monitoramento do potencial de circuito aberto (OCP), curvas de polarização e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) em um eletrólito de fluido corpóreo simulado (SBF), cuja composição é: KCl (0,224 g L⁻¹), CaCl₂ (0,278 g L⁻¹), MgCl₂.6H₂O (0,305 g L⁻¹), K₂HPO₄ (0,174 g L⁻¹), NaCl (8,035 g L⁻¹), NaHCO₃ (0,353 g L⁻¹), (CH₂OH)₃CNH₂ (6,057 g L⁻¹) (KOKUBO *et al.*, 2006). Adicionou-se ácido clorídrico concentrado (HCl) para ajustar o pH em $7,25 \pm 0,05$. Os testes foram realizados com um potenciostato Iviumstat, da Ivium Technologies, Países Baixos auxiliado pelo software Iviumsoft.

4.3.7.1. Potencial de Circuito Aberto (OCP)

Os potenciais de circuito aberto (OCP) das amostras estudadas foram monitorados em triplicada com um potenciostato Ivium Technologies, Países Baixos, modelo Iviumstat, no Laboratório de Corrosão (LCOR-P), da UCS, durante 1 hora de imersão em solução de SBF, a 37 °C, com o eletrodo de calomelano saturado (ECS) como referência, marca Analyser, Brasil,

modelo 3A41. Essa temperatura de (37 ± 2) °C para a solução de SBF foi obtida a partir do aquecimento prévio em estufa da marca DeLeo Equipamentos Laboratoriais, Brasil.

4.3.7.2. Polarização Potenciodinâmica

O ensaio de polarização potenciodinâmica foi realizado por 2000 segundos, em triplicata, no potenciostato Ivium modelo Ivium Stat no LCOR-P da UCS em uma célula de três eletrodos, sendo ECS o eletrodo de referência, um fio de platina como o contraeletrodo, e a amostra como eletrodo de trabalho, com área exposta de $0,739 \text{ cm}^2$. Utilizou-se a solução SBF à temperatura de 37°C como eletrólito. O intervalo de varredura foi de 200 mV abaixo do potencial de circuito aberto e 600 mV acima desse potencial, com velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} (SALVADOR *et al.*, 2017).

4.3.7.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Nas medidas de EIE, foi utilizado um potenciostato Ivium modelo Ivium Stat no LCOR-P da UCS, onde se aplicou um sinal senoidal de 10 mV em torno do potencial de corrosão e varredura de 100 kHz a 10 mHz (SALVADOR *et al.*, 2017). O ensaio foi realizado em solução SBF como eletrólito à temperatura 37°C e área exposta do eletrodo de trabalho de $0,739 \text{ cm}^2$. As amostras foram monitoradas durante 96 horas de imersão.

4.3.8. Ensaio *in vitro*

Para a realização dos ensaios *in vitro*, as amostras utilizadas foram esterilizadas em óxido de etileno (ETO) a 55°C com umidade de 35% e 150 min de tempo de aeração, realizado pela empresa Esterilizare de Caxias do Sul. Esses parâmetros de esterilização são os padrões utilizados pela empresa fornecedora do serviço. A escolha do método de esterilização baseou-

se em alguns estudos que relatam que a temperatura destes processos afeta a biocompatibilidade, pois podem alterar as características de superfície dos materiais. Dessa forma, definiu-se o uso de ETO para a esterilização das amostras (BALDIN *et al.*, 2017; PARK e BRONZINO, 2002).

4.3.8.1. *Obtenção das células-tronco mesenquimais (CTM)*

As células-tronco mesenquimais utilizadas neste trabalho foram isoladas de dentes decíduos humanos, conforme estudos anteriores (SIQUEIRA *et al.*, 2017). Os dentes decíduos em processo de esfoliação foram obtidos na Clínica Odontológica/Odontopediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido registrado na Plataforma Brasil com número CAAE 36403514.6.0000.5347. Os dentes foram transportados até o Laboratório de Hematologia e células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS e processados.

4.3.8.2. *Cultivo Celular*

Para o cultivo celular, as amostras foram acondicionadas em placas de cultura de 48 poços com diâmetro de 12 mm cada. As células foram semeadas nos sistemas na densidade de 10.000 células viáveis/poço e incubadas a 37 °C com atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Para o grupo controle, foi semeado o mesmo número de células diretamente sobre a placa de cultivo (padrão ouro para cultivo celular). Após o período de cultivo, foram realizados os testes para avaliar a viabilidade celular. O meio das culturas foi trocado duas vezes por semana. Para cada teste foram realizados quatro experimentos, derivados de quatro diferentes isolamentos de células-tronco.

4.3.8.3. Viabilidade Celular

A viabilidade das células cultivadas sobre os materiais foi analisada por meio da atividade metabólica mitocondrial pelo teste (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio) (MTT). Após 14 dias de cultivo, o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas com MTT 0,25 mg mL⁻¹ a 37 °C. Após esse período, a solução de MTT foi removida, os cristais formados foram solubilizados em 400 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e foram transferidos 200 µL para placa de cultivo de 96 poços. A absorbância obtida foi lida em espectrofotômetro Spectramax, Molecular Devices, Estados Unidos da América, nos comprimentos de onda de 560 nm e 630 nm, e os resultados foram calculados através da diferença entre as duas leituras (560nm - 630 nm).

4.3.8.4. Citotoxicidade

A citotoxicidade celular foi avaliada a partir da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH), usando o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) formado pela ação enzimática, por método colorimétrico (Labtest). O aumento da dosagem dessa enzima aumenta com a morte celular. Para realização do teste, alíquotas do sobrenadante das culturas foram dosadas após 1, 7 e 14 dias de cultivo. Para esse teste, foi também avaliado um grupo controle do teste, denominado controle positivo. Esse grupo representa o controle de morte celular total, para o qual as células foram cultivadas diretamente no poço e, no dia da dosagem, Triton X-100 foi adicionado ao poço para obter uma concentração de 1% (v/v) durante 30 minutos, a fim de se verificar a liberação máxima de LDH. A dosagem da LDH foi feita no equipamento 560 Labmax, Labtest Diagnóstica S.A., Brasil utilizando o kit LDH Liquiform – LABTEST.

4.3.8.5. Avaliação da presença de células com coloração por DAPI

Para avaliar a presença de células nas amostras, após 2 semanas de cultivo, o meio de cultura foi retirado e as amostras foram lavadas com uma solução tampão fosfato-salino (PBS) para retirada das células não aderidas. As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 20 min. Em seguida, foi realizada a marcação do núcleo celular com 0,5 mg mL⁻¹ de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em PBS por 1 minuto. Após duas lavagens com PBS, a presença das células foi fotografada em microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse Ti, Nikon, Japão.

4.3.8.6. Avaliação da viabilidade celular por coloração com calceína e iodeto de propídio

A avaliação qualitativa da viabilidade celular ocorreu analisando-se a coloração com calceína e iodeto de propídio (IP). A calceína é incorporada no citoplasma das células vivas e emite uma fluorescência verde. Já o IP é expelido pelas células vivas, mas não pelas células mortas, marcando-as com uma fluorescência vermelha. Após descartar o meio de cultura das células, as amostras foram lavadas com PBS e receberam uma solução contendo 0,5 µg mL⁻¹ de calceína e 5 µg mL⁻¹ de IP dissolvidos em tampão de fosfato por 10 minutos. As imagens da fluorescência foram obtidas no microscópio de Fluorescência Leica DMi8, Leica Microsystems, Alemanha.

4.3.8.7. Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão. A comparação das médias foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de post-hoc de Tukey para o experimento de adesão e teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's para os experimentos de citotoxicidade e viabilidade celular utilizando o programa estatístico Prisma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FILMES HÍBRIDOS A BASE DE MAP/TEOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir da caracterização do filme híbrido a base dos precursores MAP e TEOS, caracterização das amostras FH e FH_2.

5.1.1. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

A Figura 8 ilustra as micrografias de topo obtidas por meio da técnica de MEV-FEG para as amostras Branca (a), FH (b) e FH_2 (c). É possível observar a presença de microporos na superfície do substrato sem revestimento, Figura 8 (a), o que pode ser oriundo do processo de preparação da amostra (lixamento), ou ainda imperfeições do próprio material que não podem ser notadas visualmente sem o auxílio de microscopia. Na micrografia de topo da amostra contendo uma aplicação de revestimento híbrido (FH), ilustrado pela Figura 8 (b), observa-se uma superfície uniforme com cobertura regular e sem fissuras. Em contrapartida, as imagens obtidas do sistema contendo duas aplicações (FH_2) de revestimento apresentaram uma morfologia menos uniforme quando comparada ao sistema FH, com a presença de algumas pequenas fissuras e acúmulos pontuais, Figura 8 (c). Esses acúmulos e fissuras podem ter ocorrido durante o processo de condensação do filme devido à precipitação de aglomerados com maior concentração de silício (Si), conforme espectro obtido por EDS (Figura 9). De acordo com Beltrami *et al.* (2017a), a quantidade desses acúmulos e fissuras é determinante para a resistência à corrosão do filme, uma vez que podem constituir, provavelmente, defeitos da camada por onde geralmente permeia o eletrólito.

Salvador *et al.* (2017) explicaram o comportamento do sistema FH, como um revestimento mais uniforme em relação ao sistema FH_2, devido às ligações de hidrogênio na interface revestimento-substrato em virtude da ativação da superfície metálica com o uso da solução de NaOH. Casagrande *et al.* (2018) compararam diferentes tratamentos em substrato metálico antes da aplicação de filme híbrido à base de silano, e concluíram que a superfície

tratada com a solução de NaOH promoveu a formação de um revestimento híbrido espesso e homogêneo com melhor aderência ao substrato do que as outras amostras.

Pesquisas realizadas por Deflorian *et al.* (2006) sugeriram que a utilização do pré-tratamento alcalino em metais propicia a remoção de impurezas superficiais, além de dotar a superfície com hidroxilas, consequentemente favorecendo a formação de ligações metal-siloxano e gerando uma melhor ancoragem na interface.

Dessa forma, possivelmente a segunda aplicação de revestimento não apresente a mesma ancoragem, bem como uma uniformidade no filme, uma vez que o contato do revestimento ocorre com uma camada do próprio filme híbrido e não mais com o substrato e grupos de hidroxilas.

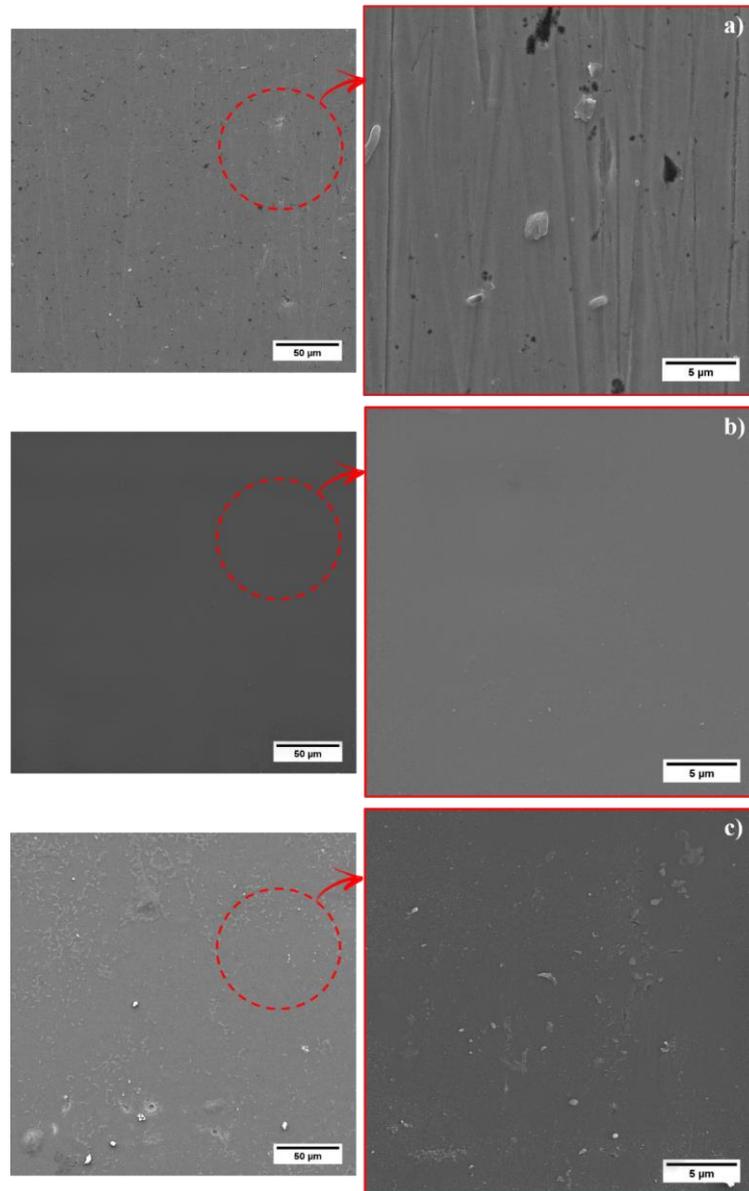


Figura 8: Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG para: (a) Branca; (b) FH e (c) FH_2. Magnificação original de 1000× e 10.000×.

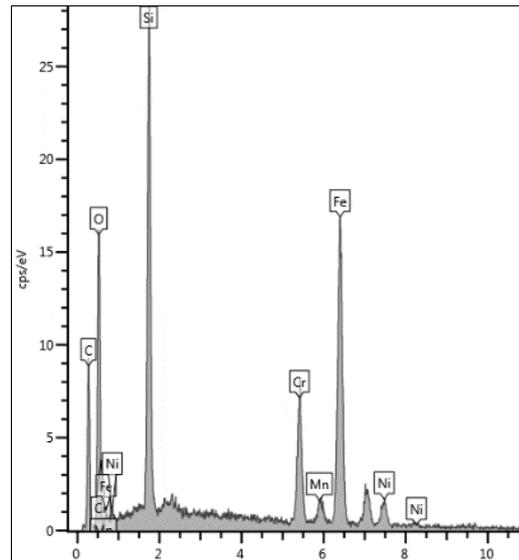


Figura 9: EDS pontual dos aglomerados presentes no filme híbrido da amostra FH_2.

As Figuras 10 (a) e 10 (b) apresentam as micrografias após incisão no filme híbrido para avaliar a interação do revestimento ao substrato com uma aplicação do revestimento híbrido e duas aplicações, respectivamente. É possível avaliar criteriosamente a adesão dos revestimentos ao substrato pelas imagens obtidas por MEV da região próxima da incisão das amostras com uma e duas aplicações, Figura 10 (a) e Figura 10 (b), respectivamente.

Observou-se, em ambos os sistemas FH e FH_2, a remoção do revestimento na área onde foi realizada a incisão para o teste, deixando evidente o substrato. Analisando as imagens obtidas com o mapeamento dos elementos químicos presentes nas amostras (Figura 11), visualiza-se na trilha da incisão o elemento ferro (Fe), principal componente do aço inoxidável, representado pela coloração amarela. Isso não é observado na região adjacente à incisão onde não houve deslocamento do revestimento, nesta área nota-se uma maior concentração do elemento químico silício (Si), principal constituinte do filme híbrido, representado pela coloração azul. Em ambos os sistemas, verificou-se deslocamento apenas na região da trilha da incisão; na área restante do substrato, os revestimentos demonstraram completa aderência.

Não foi observada diferença expressiva entre o comportamento dos diferentes revestimentos testados, ambos se apresentaram aderidos ao substrato AISI 316L após o ensaio de adesão. Beltrami *et al.* (2017) associaram a adesão de revestimentos TEOS_MAP em substratos metálicos com fortes forças adesivas (interação entre o filme e a superfície do substrato) e fortes forças coesivas (interação intermolecular do filme).

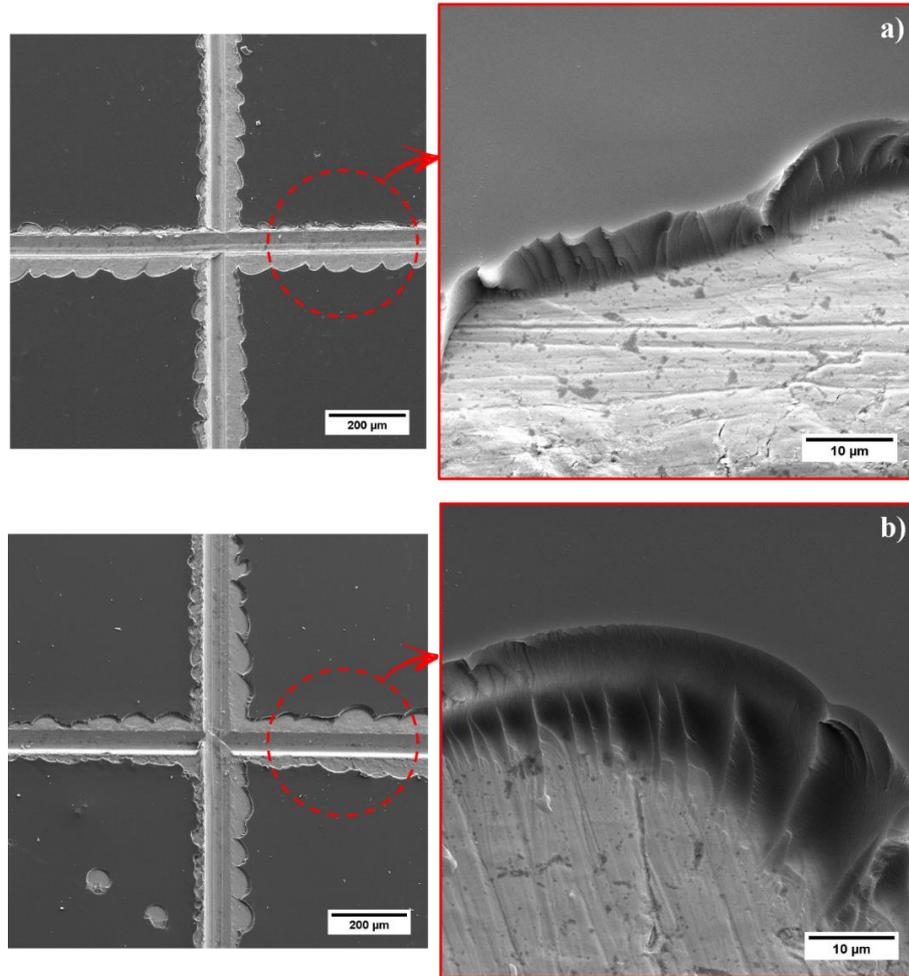


Figura 10: Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG após o teste de adesão nos sistemas: (a) FH e (b) FH_2.

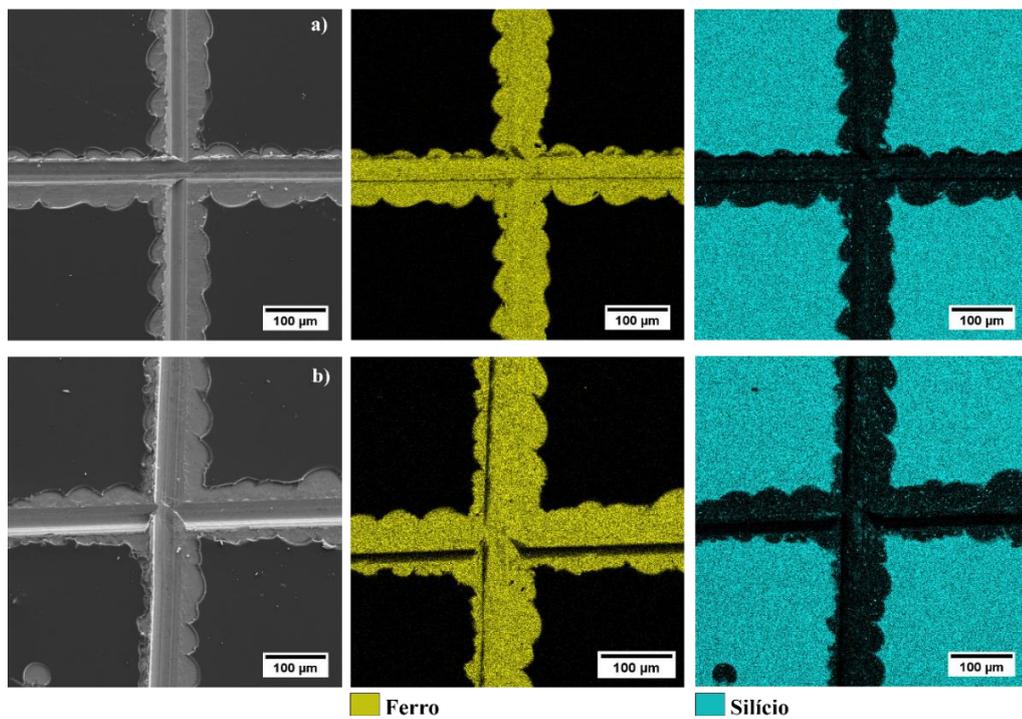


Figura 11: Mapeamento de elemento químico por cor das amostras (a) FH e (b) FH_2.

A seção transversal das amostras estudadas, apresentada na Figura 12 (a) para a amostra FH e Figura 12 (b) para a amostra FH_2, foi avaliada com o intuito de estimar a espessura dos revestimentos. Observa-se que as amostras FH e FH_2 apresentaram revestimentos regulares e visualmente aderidos ao substrato. A espessura média do revestimento híbrido na amostra FH (Figura 12 a) é de $7,51 \mu\text{m} (\pm 0,25 \mu\text{m})$ e $6,34 \mu\text{m} (\pm 0,27 \mu\text{m})$ na amostra FH_2 (Figura 12 b).

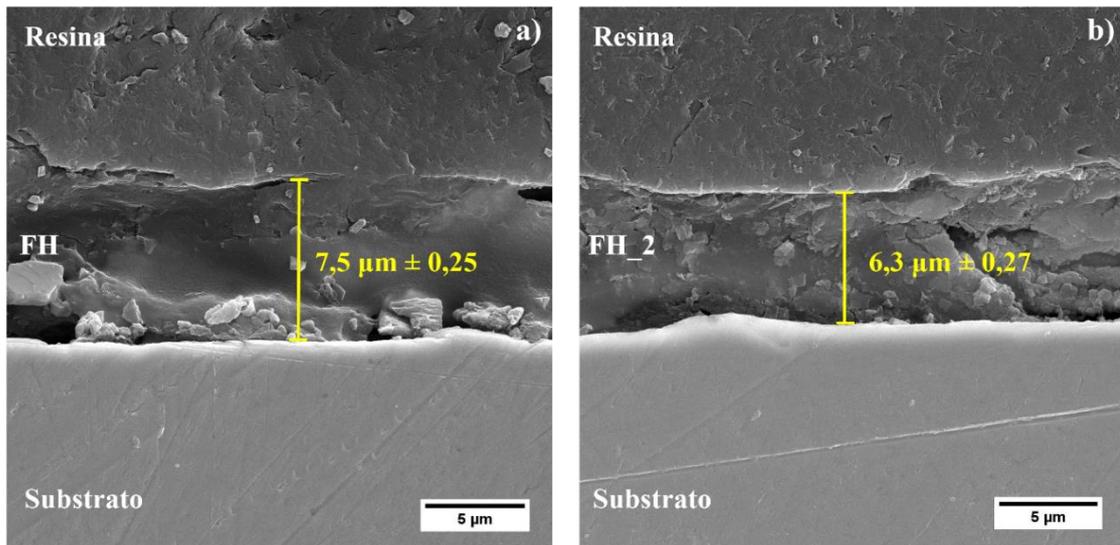


Figura 12: Imagem MEV-FEG da seção transversal das amostras estudadas: (a) FH e (b) FH_2.

Beltrami *et al.* (2017), em seu estudo com os precursores TEOS e MAP, afirmaram que a espessura da camada de um filme composto por precursores alcóxidos depende da estrutura, da composição química e da natureza do precursor. Segundo os autores, o MAP leva à formação de camadas mais espessas e mais homogêneas, além de apresentar alta capacidade de formar ligações $\text{Me} - \text{O} - \text{Si}$ ($\text{Me} = \text{metal}$). Ao propor o mecanismo de reação entre TEOS-MAP, os autores evidenciaram que a adição do MAP ao TEOS torna a estrutura da camada formada mais compacta, devido à polimerização dos grupos acrilato e da reticulação deles com a rede de silício.

Esperava-se que o sistema FH_2, Figura 12 (b), apresentasse uma espessura maior em relação ao sistema FH, Figura 12 (a), no entanto, a espessura da camada foi menor. Segundo Kunst *et al.* (2013), isso pode ocorrer devido ao excesso de calor no processo de cura que aumenta o número de reações de reticulação entre os silanos, reduzindo a reatividade. Essa perda de reatividade é causada pela conversão dos grupos silanol em siloxanos. Como resultado, o filme FH_2, possivelmente, torna-se rígido pelo processo de pré-cura e as reações com camadas subsequentes tornam-se mais difíceis. Fator que corrobora com o resultado da medida de espessura de camada do sistema FH_2, uma vez que não foi possível identificar na imagem

de corte transversal, Figura 12 (b), uma diferença entre as camadas das aplicações. Em contrapartida, observa-se um filme denso semelhante ao sistema FH que se refere a apenas uma aplicação.

Além disso, foi avaliado a presença dos principais elementos químicos componentes da estrutura montada para estimar a espessura de camada. As Figura 13 e Figura 14 demonstram o mapeamento por cor dos elementos silício, presente no filme híbrido MAP/TEOS, representado pela coloração azul, do elemento ferro, componente principal da liga de aço inoxidável 316L, representado pela cor amarelo e, o elemento carbono presente na composição da resina epoxídica utilizada para o embutimento da amostra, representado pela cor vermelho, para as amostras FH e FH_2, respectivamente.

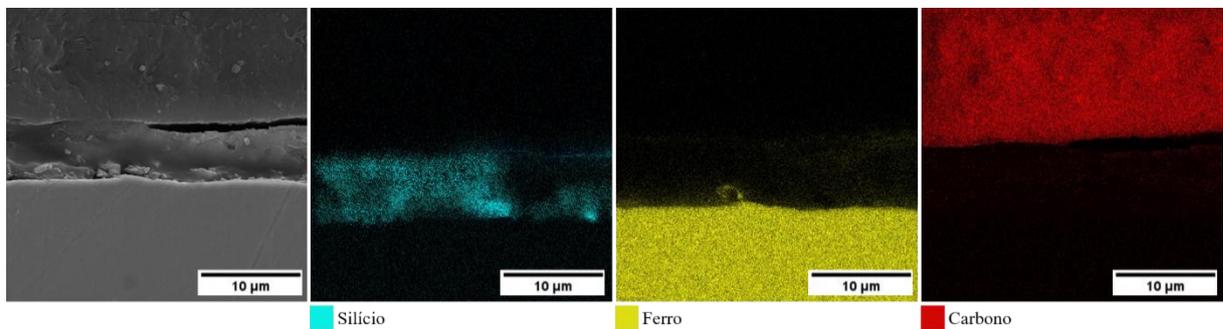


Figura 13: EDS da seção transversal das amostras estudadas FH.

Em ambas as amostras (FH e FH_2), ficaram evidentes e destacadas as regiões onde se encontra cada composto do conjunto de preparação da amostra para corte transversal, confirmando a presença do filme MAP e TEOS na região delimitada para mensurar a espessura de camada.

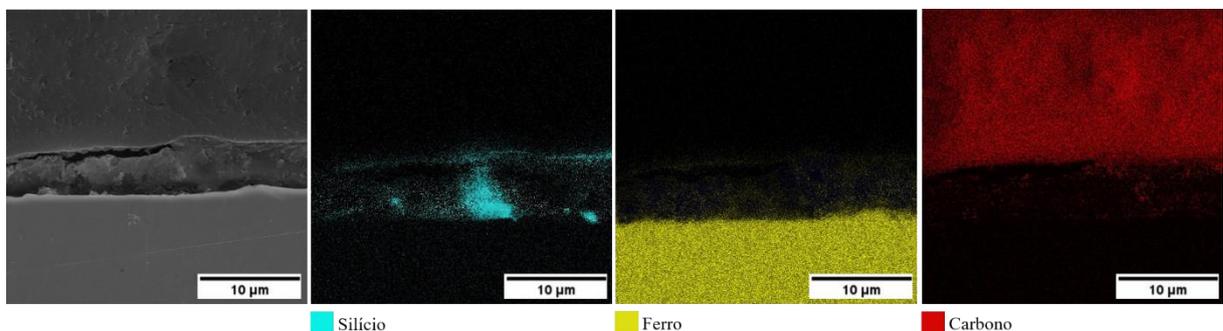
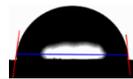
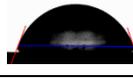


Figura 14: EDS da seção transversal das amostras estudadas FH_2.

5.1.2. Ângulo de Contato

A Tabela 6 apresenta os valores médios do ângulo de contato obtidos pelo método de gota séssil nas amostras. Avaliando-se os resultados, todas as amostras estudadas apresentam uma superfície hidrofílica, com ângulo de contato inferior a 90°. Não se observou diferença expressiva entre os valores quando comparados os resultados de ângulo das amostras com uma (69°) e duas (65°) aplicações de revestimento híbrido. Porém, ambas apresentaram superfícies de caráter mais hidrofílico em relação à amostra de aço inoxidável (84°) sem revestimento.

Tabela 6: Resultados de ângulo de contato da superfície das amostras.

| Amostra | Ângulo de contato (°) | Volume da gota (µL) | Imagem da gota |
|---------|-----------------------|---------------------|---|
| BRANCA | 84 ± 0,36 | 19,4 |  |
| FH | 69 ± 0,31 | 18,8 |  |
| FH_2 | 65 ± 0,30 | 18,1 |  |

Salvador *et al.* (2017) avaliaram a molhabilidade de filmes híbridos à base de MAP/TEOS aplicados sobre ligas de titânio, e destacaram um aumento no ângulo de contato das superfícies contendo revestimento híbrido quando comparadas com o substrato sem revestimento, obtendo ângulo de 84°.

Para Casagrande *et al.* (2018), após a deposição de revestimentos híbridos à base de TEOS/MTES, o valor do ângulo de contato das superfícies diminuiu. Os autores afirmaram que a diminuição do ângulo de contato em relação às superfícies não revestidas pode estar relacionada à diminuição da rugosidade superficial do substrato com a aplicação de filmes híbridos.

Além disso, os autores Shibata *et al.*, (2015) e Goriainov *et al.* (2014) destacaram em seus estudos que é desejável, para melhores respostas no contato com células, tecidos e fluidos corpóreos, que se tenha superfícies com características mais hidrofílicas. Observaram uma absorção mais eficaz de proteínas *in vitro*, permitindo uma adesão e crescimento das células.

Dessa forma, os resultados de molhabilidade obtidos com a aplicação de filmes híbridos foram favoráveis para a aplicação em biomateriais, pois as superfícies revestidas apresentaram características hidrofílicas com ângulos de contato inferiores a 90°.

5.1.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os resultados obtidos a partir da análise de AFM, com a finalidade de estudar a topografia das amostras, são ilustrados na Figura 15 (a) para o aço inoxidável sem revestimento, Figura 15 (b) e 15 (c) para as amostras contendo uma e duas aplicações de revestimento, respectivamente. Além das imagens, os resultados da rugosidade superficial são apresentados na Tabela 7.

Para amostra branca, Figura 15 (a), observa-se uma superfície irregular e rugosa quando comparado com as demais amostras. É possível visualizar que as amostras contendo revestimento híbrido apresentaram um recobrimento uniforme da superfície, o que reduziu a rugosidade superficial quando comparada ao aço inoxidável sem revestimento.

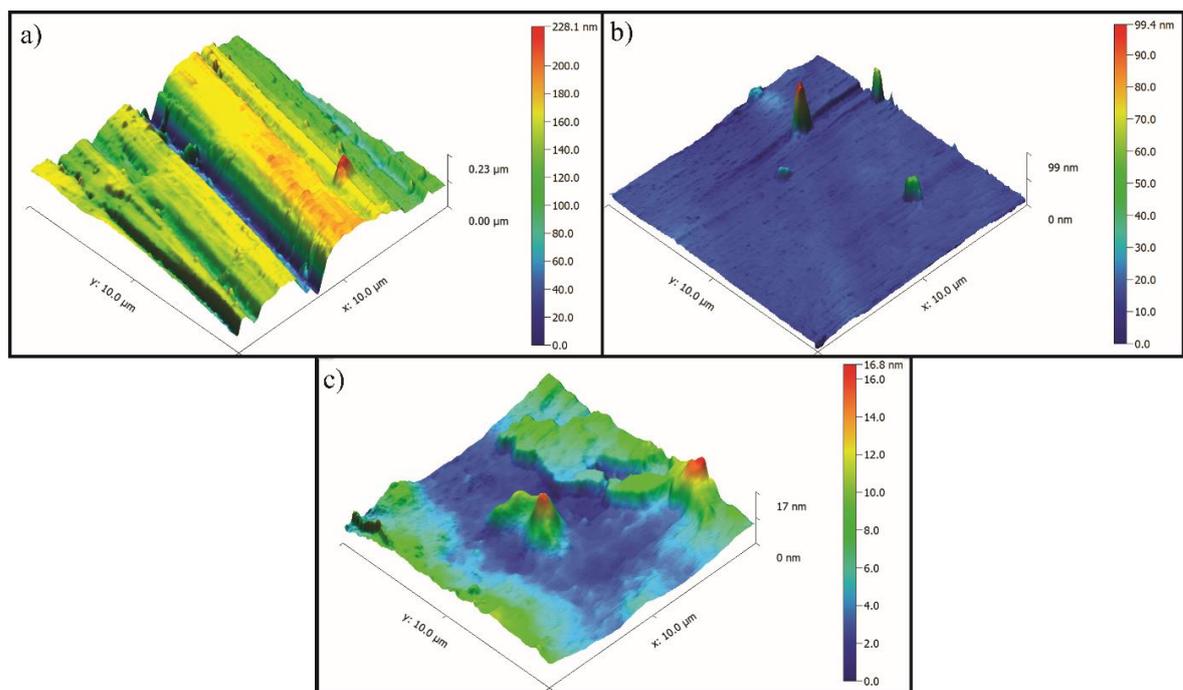


Figura 15: Imagens 3D da superfície das amostras obtidas por AFM: (a) Branca; (b) FH e (c) FH_2.

Tabela 7: Valores médios da rugosidade das superfícies obtidos pela análise de AFM.

| Amostras | Rugosidade das Superfícies Ra (nm) |
|----------|------------------------------------|
| BRANCA | $6,0 \pm 3,0$ |
| FH | $0,22 \pm 0,08$ |
| FH_2 | $0,24 \pm 0,24$ |

Observa-se que as amostras FH e FH_2 apresentaram rugosidade média (Ra), 0,22 e 0,24 nm, respectivamente, valores bem menores que o observado para a amostra 316L, que foi de 6,0 nm, de acordo com a Tabela 7. Os dados obtidos indicam que os revestimentos promoveram um efeito de nivelamento da superfície do substrato.

Os valores da rugosidade das superfícies estudadas corroboram com as imagens de MEV-FEG (Figura 8) e AFM (Figura 13), onde é possível visualizar, para as amostras com revestimento híbrido, uma superfície menos rugosa em relação ao substrato sem revestimento, bem como uma cobertura homogênea para a amostra (FH), observado na Figura 15 (b), e uma superfície com morfologia heterogênea com a presença de defeitos pontuais para a amostra (FH_2), visualizado na topografia da Figura 15 (c).

Beltrami *et al.* (2017a) observaram em seu estudo que o revestimento TEOS-MAP promoveu um nivelamento, diminuindo a rugosidade do substrato e confirmando o preenchimento dos vales existentes na superfície do substrato utilizado pelo revestimento. Estes resultados reforçam o caráter mais hidrofílico obtido com os revestimentos.

5.1.4. Ensaios Eletroquímicos

Para avaliar a resistência a corrosão dos revestimentos a base de MAP e TEOS, foram realizados ensaios eletroquímicos. Os resultados da análise de OCP são ilustrados graficamente pela Figura 16.

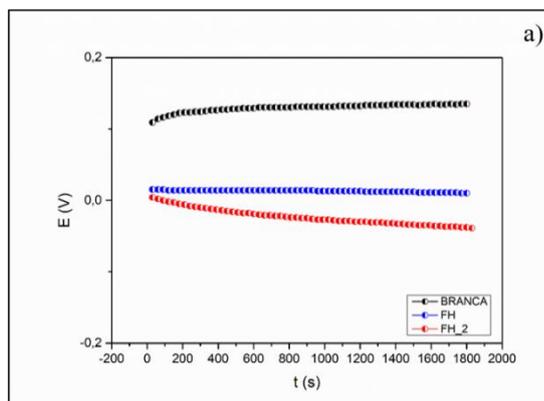


Figura 16: Monitoramento de (a) OCP das amostras BRANCA, FH e FH_2 em solução de SBF.

Analisando-se as curvas de OCP, Figura 16, obtidas para os dois sistemas estudados FH e FH_2, verifica-se que ambos apresentaram valores de potencial inferior ao encontrado para o aço inoxidável AISI 316L (BRANCA), que foi acima de 0,1 V, demonstrando um leve deslocamento em direção aos potenciais menos ativos. Esse comportamento era esperado, pois a resistência à corrosão de um aço inoxidável é proporcionada pela formação de um filme de óxido passivo aderente, promovendo ao material certa estabilidade frente à ação corrosiva, segundo Assis *et al.* (2005). De um modo geral, quando um metal, principalmente os que se passivam, é imerso em soluções corrosivas, o potencial de corrosão inicialmente se mantém em valores elevados, devido à fina película de óxido. Esse potencial pode cair para valores mais baixos após um período de tempo se o meio for agressivo, fato que é atribuído à dissolução da película de óxido pelo processo de dissolução redutiva (WOLYNEC, 2013).

De acordo com Giordano *et al.* (2010), a resistência à corrosão atribuída aos aços inoxidáveis ocorre devido à formação espontânea de uma película superficial protetora de óxido de cromo que atua como uma barreira, inibindo o processo de corrosão e mantendo a liberação de íons em níveis baixos. Esse comportamento foi observado para a amostra BRANCA.

Observa-se na Figura 16 que todos os sistemas estudados apresentaram potenciais com comportamento praticamente constante ao longo do tempo, comprovado pela existência quase nula de oscilações, alcançando a estabilidade rapidamente. A exceção a uma queda decrescente no potencial, logo após 200 segundos de imersão, para a superfície do sistema FH_2, que embora pequena (aproximadamente 0,05 V), sugere a permeabilidade do eletrólito SBF através do revestimento híbrido, deixando assim o metal susceptível à corrosão.

Comparando-se os substratos revestidos, o sistema FH apresentou o resultado mais estável na condição de OCP, indicando um maior efeito barreira entre o substrato e o eletrólito, possivelmente devido à presença de uma camada formada mais compacta sem fissuras

conforme visualizado nas imagens de MEV-FEG, Figura 8 (b). Dessa forma, ao longo do período de imersão, os íons da solução SBF não conseguiram permear no revestimento devido à sua alta densidade de reticulação (PÉREZ *et al.*, 1999; ATAPOUR *et al.*, 2020; ELIAZ, 2019).

Na análise de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) as amostras permaneceram em imersão na solução de SBF por 120 horas. A Figura 17 representa o diagrama de Bode para as medidas realizadas em 24 e 120 horas de imersão das amostras estudadas.

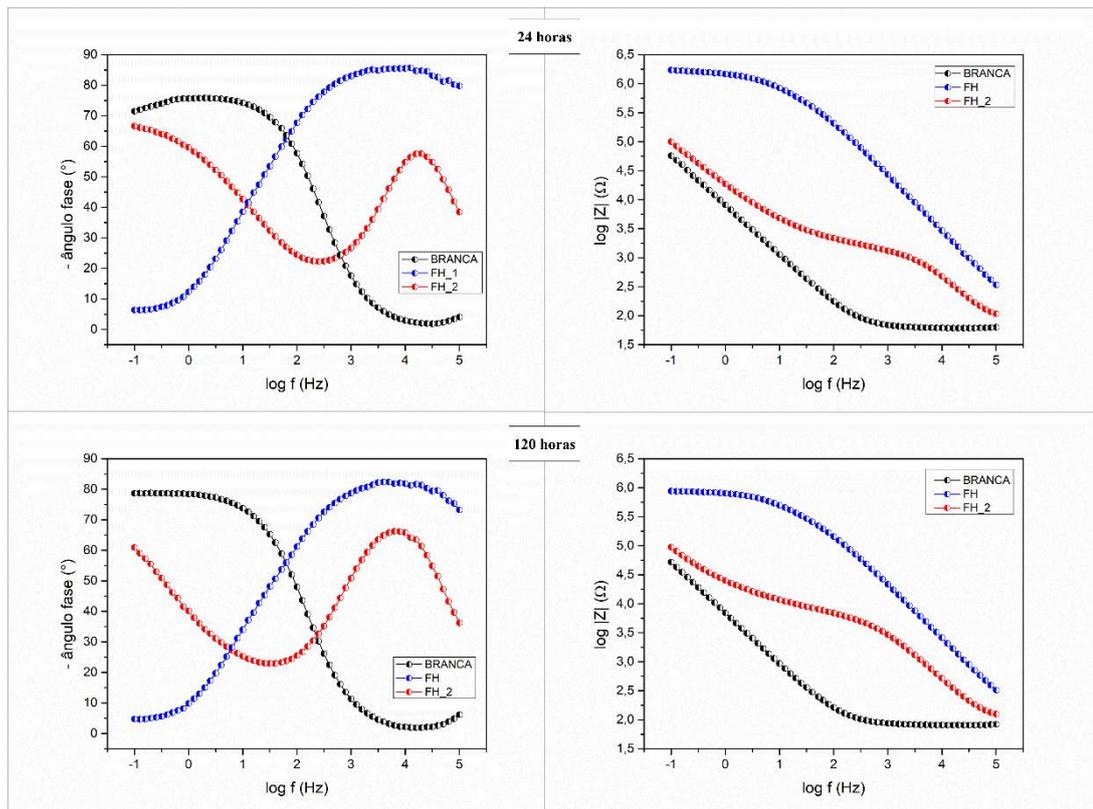


Figura 17: Diagrama de Bode para 24 e 120 horas de imersão em SBF das amostras estudadas.

É possível verificar que os valores do módulo de impedância, quando comparados ao substrato (BRANCA) para os dois tempos de imersão avaliados, são maiores para os sistemas FH e FH_2, especialmente o sistema FH, com apenas uma camada de revestimento híbrido (FH), evidenciando a natureza protetiva do revestimento proposto.

Para a amostra BRANCA, nos tempos avaliados, observa-se apenas um fenômeno de baixa para média frequência, que, hipoteticamente, reflete a mudança de condutividade elétrica do óxido passivo formado sobre a superfície do aço inoxidável durante a exposição ao eletrólito, possivelmente relacionado ao efeito de transferência de carga. Essa resposta do óxido a frequências mais baixas demonstra sua instabilidade termodinâmica, o que justifica um módulo

de impedância menor do substrato quando comparado aos sistemas revestidos (FH e FH₂), denotando a proteção temporária promovida pelo óxido (RIBEIRO *et al.*, 2015).

Na demonstração gráfica do ângulo fase para o aço inoxidável, nos tempos avaliados, o ângulo atingiu um valor em torno de 80°. Comportamento equivalente foi observado para a variação do módulo da impedância com a frequência que se manteve basicamente linear (na escala logarítmica), semelhante ao comportamento de um capacitor ideal, até atingir um valor constante a partir de frequências mais altas, comportamento então puramente resistivo que pode ser atribuído à resistência ôhmica da solução de SBF.

Levando em consideração a resistência de cada amostra, o sistema que apresentou melhores características anticorrosivas foi o FH, resultado que corrobora com imagens de MEV-FEG, Figura 8 (b), que mostraram o revestimento do sistema homogêneo e sem fissuras aparentes. Sendo assim, pode-se salientar que a formulação híbrida de MAP/TEOS do processo de elaboração do sol-gel, bem como os parâmetros de aplicação por *dip-coating* e os pré-tratamentos mecânico/químico empregados sobre o aço inoxidável desencadearam a formação de um revestimento uniforme, conforme observado nas imagens de AFM, Figuras 15 (b). A aderência do revestimento aliado à uniformidade da superfície possivelmente aprimorou o desempenho do filme barreira contra a corrosão.

Nas primeiras 24 horas de imersão, observa-se para a amostra FH um fenômeno em alta frequência associado ao efeito barreira do revestimento justificado por apresentar uma espessura de camada superior em relação ao sistema FH₂, conforme observado na micrografia de seção transversal da Figura 12 (b). Por não apresentar nenhum fenômeno em baixas frequências, evidencia ainda mais seu bom desempenho contra a corrosão.

Entretanto, para o sistema FH₂, observa-se uma tendência a um fenômeno em baixa frequência, sugerindo possivelmente a presença pontual de fissuras ou produto de corrosão, o que indica um sistema com menor resistência e um comportamento eletroquímico inferior se comparado ao sistema FH, como observado nas medidas de OCP (Figura 16). A morfologia heterogênea do revestimento observada na micrografia da Figura 8 (c), reforça o comportamento apresentado por esse sistema, comprometendo o mecanismo de proteção por barreira desse revestimento.

Após 120 horas de imersão, o fenômeno de alta frequência permanece presente nos sistemas revestidos (FH e FH₂), todavia, ligeiramente deslocado, de um pouco acima dos 10.000 Hz para um pouco abaixo dos 10.000 Hz, o que pode ser consequência da difusão do eletrólito através da rede orgânica superficial dos revestimentos, que se refere à parte do radical

orgânico não hidrolisado do precursor alcóxido TEOS, a qual fica sobre a superfície, uma vez que não se adere ao metal e nem a outros grupos silanóis, segundo Kunst *et al.*, (2013).

Apesar de ocorrer essa pequena variação após 120 horas de imersão, os ângulos de fase não apresentaram muita diferença quando comparados aos sistemas nas primeiras 24 horas de imersão, indicando que parte da rede siloxano aderida ao substrato ainda está intacta, o que aprova a proteção barreira do filme quando comparada aos óxidos passivos do substrato 316L. Para o sistema FH, observou-se um ângulo próximo a 85° , entretanto, para o sistema FH_2, que com 24 horas de imersão apresentou um ângulo de 60° , após 120 horas apresentou um ângulo superior, em torno dos 70° .

5.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) após análise de EIE

As imagens obtidas por MEV-FEG para as amostras após 120 horas de imersão no ensaio de EIE são ilustradas na Figura 18. As imagens foram obtidas na área em contato com o eletrólito, em que se observa o aparecimento de uma camada de precipitados, possivelmente devido a sais do eletrólito, como óxidos dispersos na superfície das amostras revestidas com filme híbrido para os dois sistemas, ou seja, uma (FH) e duas (FH_2) aplicações de camada.

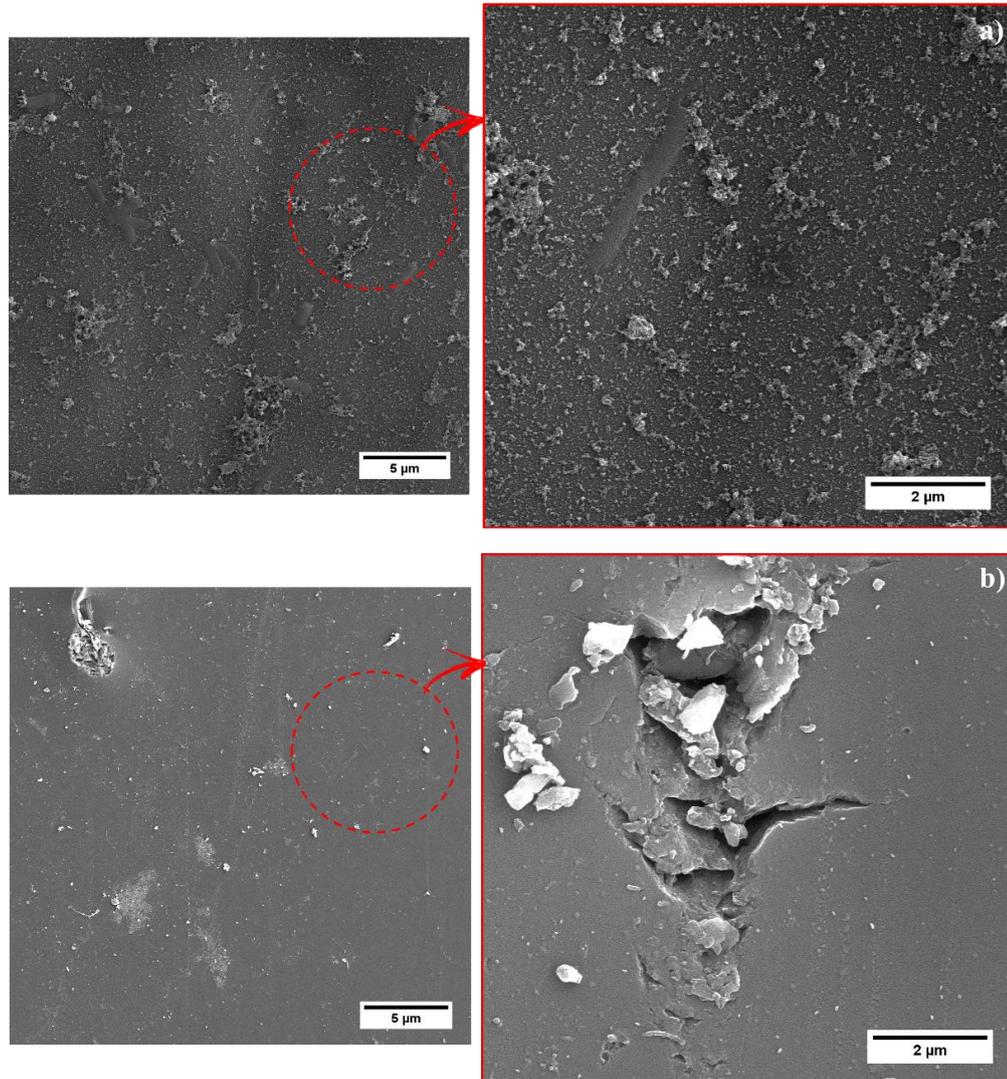


Figura 18: Imagens de MEV-FEG nas magnificações 1000× e 10000× para FH (a) e FH_2 (b) após 120 horas de imersão em SBF.

Para o sistema FH_2, Figura 18 (b), é possível observar a presença de imperfeições de forma mais generalizada em relação ao sistema FH, demonstrando uma maior susceptibilidade ao ataque corrosivo, com algumas fissuras pontuais que podem se tornar pontos preferenciais para o início da corrosão localizada. O que pode ter contribuído para este fato é a superfície mais descontínua e irregular, quando comparada à superfície da amostra FH, observada na imagem topográfica do AFM, Figura 15 (c). Isso favorece o surgimento de trincas no filme híbrido, como a observada em detalhe na Figura 18 (b). O que reforça a ideia de que uma das possíveis causas do desempenho eletroquímico inferior da amostra FH_2, observado nas curvas de EIE (Figura 17), seja devido à presença de pequenas falhas no revestimento.

O sistema FH, Figura 18 (a), apresenta uma quantidade menor de produtos de corrosão, o que corrobora com os melhores resultados obtidos nas curvas de EIE, diagramas de Bode (Figura 17), com módulos de impedância maiores, quando comparado ao sistema FH_2.

Resultados como o recobrimento homogêneo visualizado nas micrografias obtidas por MEV-FEG, Figura 8 (a), boa adesão ao substrato Figura 10 (a), uniformidade e maior espessura de camada, Figura 12 (a), e a superfície regular, observada na imagem topográfica do AFM, Figura 15 (b), contribuíram para os bons resultados protetivos deste sistema.

O sistema FH não apresentou fissuras e deslocamento do revestimento após as 120 horas de imersão em SBF, Figura 18 (a), justificando um resultado melhor em relação ao sistema FH_2, e mostrando-se uma promissora alternativa para a proteção de biomateriais compostos pelo aço inoxidável austenítico AISI 316L.

5.2. DEPOSIÇÃO DE FILMES FINOS DE TITÂNIO POR MAGNETRON SPUTTERING

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir da caracterização do filme híbrido a base dos precursores MAP e TEOS com deposição de um filme fino de Ti, caracterização das amostras FH_Ti10 e FH_Ti20.

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

A Figura 19 ilustra as micrografias de topo da superfície das amostras FH_Ti10 (a) e FH_Ti20 (b) após uma incisão no filme, a fim de avaliar as camadas de revestimento e substrato. Observa-se em ambos os sistemas uma boa interação entre as camadas do filme híbrido e do filme fino de titânio, bem como com o substrato.

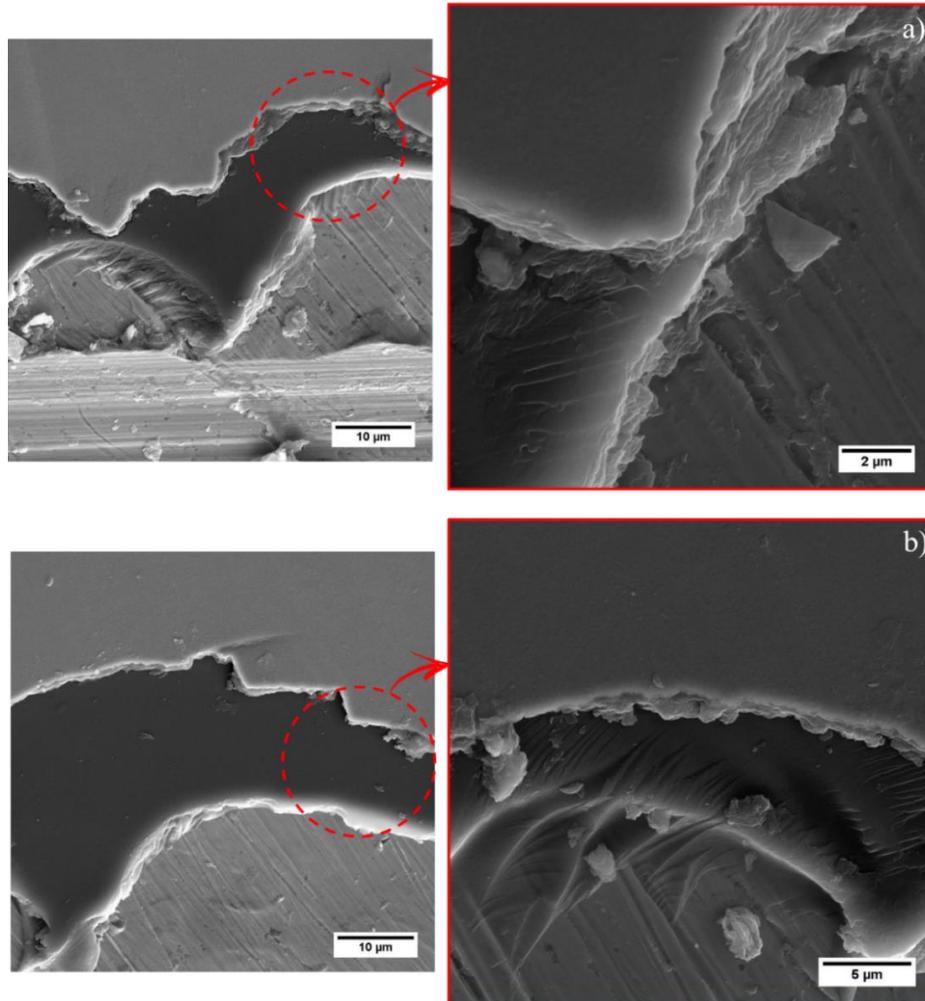


Figura 19: MEV das camadas de filme nas amostras FH_Ti10 (a) e FH_Ti20 (b).

Para confirmar a composição das camadas distintas de filme, visualizados na micrografia, foi realizado um mapeamento de cor por EDS para as amostras FH_Ti10 (Figura 20) e FH_Ti20 (Figura 21). Observa-se nas micrografias obtidas a presença do ferro, destacado na coloração amarelo, em toda a superfície das amostras correspondente ao substrato, a coloração azul relaciona-se ao elemento silício e está presente somente na camada de filme híbrido, bem como titânio representado pela cor roxa, que está presente somente na camada que corresponde ao filme fino de titânio. O mesmo comportamento é visualizado em ambas as amostras, o que era esperado de acordo com o MEV das camadas ilustrado na Figura 19.

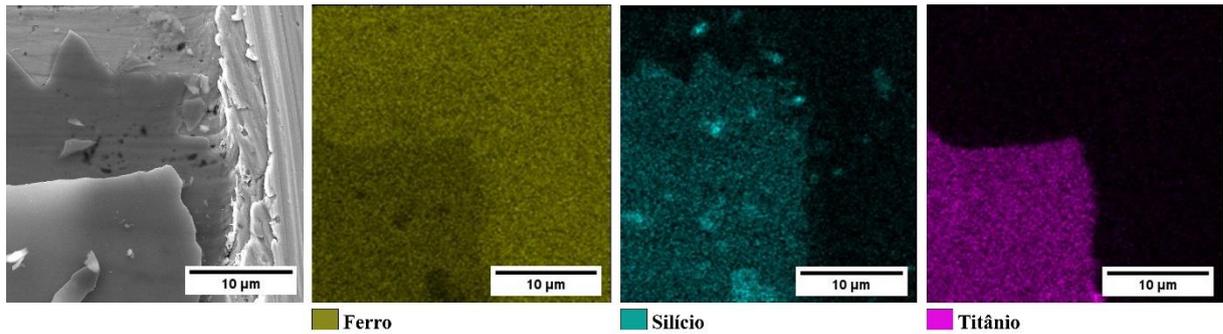


Figura 20: EDS - mapeamento por cor dos elementos químicos ferro, silício e titânio para amostra FH_Ti10.

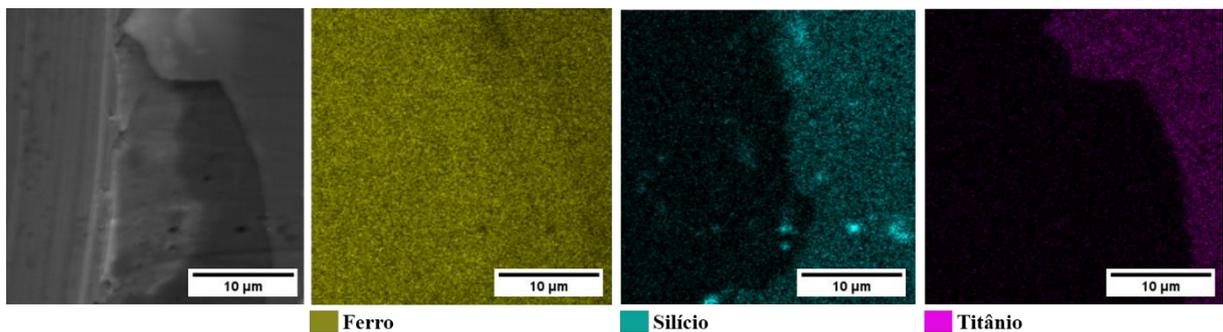


Figura 21: EDS - mapeamento por cor dos elementos químicos ferro, silício e titânio para amostra FH_Ti20.

Neste contexto, também foi avaliada a superfície da amostra FH_Ti20 por EDS de três pontos específicos, conforme apresentado na Figura 22. Com a finalidade de destacar e confirmar, a presença dos elementos componentes dos filmes estudados.

É possível visualizar nos espectros obtidos a presença dos 3 principais elementos químicos de cada ponto avaliado. No ponto onde o substrato está aparente, o elemento em maior concentração é o ferro, característico da liga AISI 316L. No filme híbrido a base de MAP/TEOS, a primeira camada próxima ao substrato, o componente químico de maior concentração presente é o silício, proveniente das ligações Si–O dos silanos MAP e TEOS. No filme fino de titânio, camada externa de revestimento, prevalece a presença de titânio. Este resultado era esperado por serem os componentes de maior concentração em cada ponto avaliado.

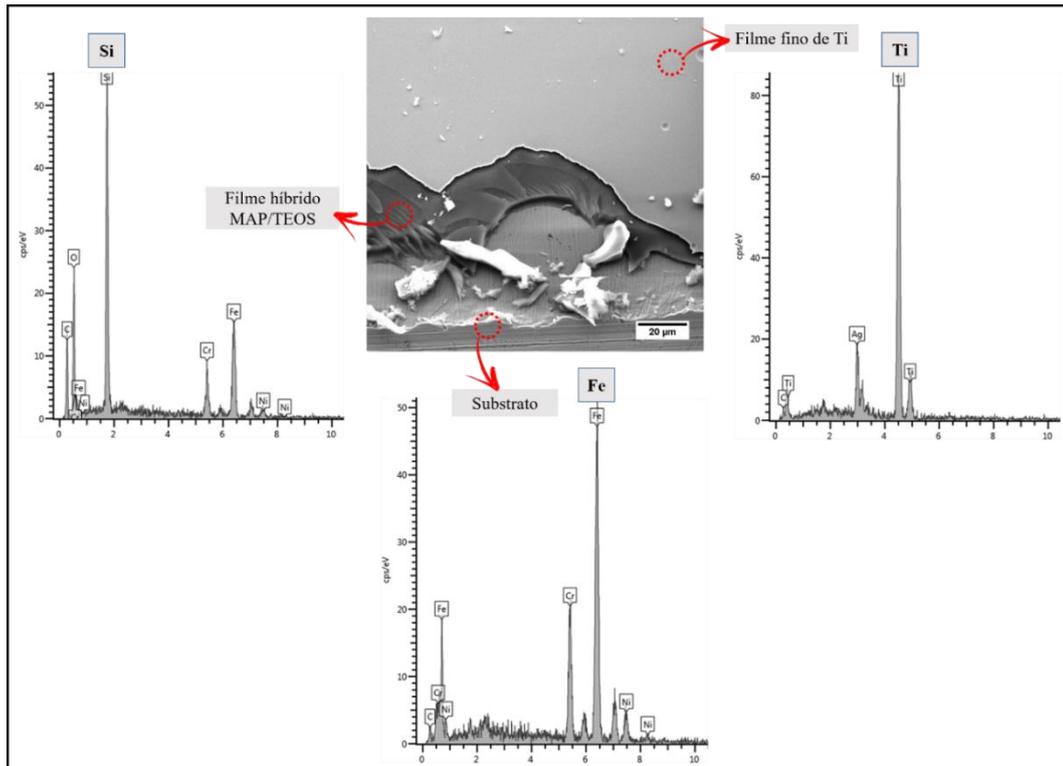


Figura 22: Mapeamento de elemento químico em três pontos na amostra FH_Ti20.

5.2.2. Topografia de superfície

Os resultados da análise de perfilometria são descritos na Tabela 9, onde R_a é a rugosidade média, valor da rugosidade aritmética principal da superfície estudada, e R_z , segundo a norma ISO4287, é a distância média entre os 5 picos mais altos e os 5 vales mais profundos da superfície do material.

Observa-se que os sistemas recobertos apenas com FH apresentaram uma rugosidade média menor, bem como uma menor distância entre picos e vales em relação às amostras contendo filme fino de Ti, o que pode estar relacionado à homogeneidade do revestimento à base de silano, conforme imagens obtidas por MEV-FEG, Figura 8 (a). Já as amostras contendo o filme fino de Ti apresentaram um pequeno incremento nos valores de rugosidade em relação aos sistemas BRANCA e FH, o que hipoteticamente pode ser explicado devido ao processo de formação do filme, que ocorre de modo gradual durante o processo de deposição por magnetron sputtering, sendo composto de vários micro acúmulos pontuais de titânio, o que resulta numa superfície com mais imperfeições superficiais, conforme observado na imagem de topografia de superfície obtidas por AFM para as amostras FH_Ti10 e FH_Ti20 (Figura 23).

Tabela 8: Resultados de Rugosidade Ra e Rz obtidos pelo ensaio de perfilometria dos sistemas avaliados

| Amostra | Ra (nm) | Rz (nm) |
|---------|----------------|-----------------|
| BRANCA | $26,3 \pm 3,2$ | $177,3 \pm 3,4$ |
| FH | $16,7 \pm 1,1$ | $171,9 \pm 2,2$ |
| FH_Ti10 | $31,7 \pm 3,1$ | $225,1 \pm 3,2$ |
| FH_Ti20 | $39,6 \pm 3,6$ | $242,9 \pm 2,5$ |

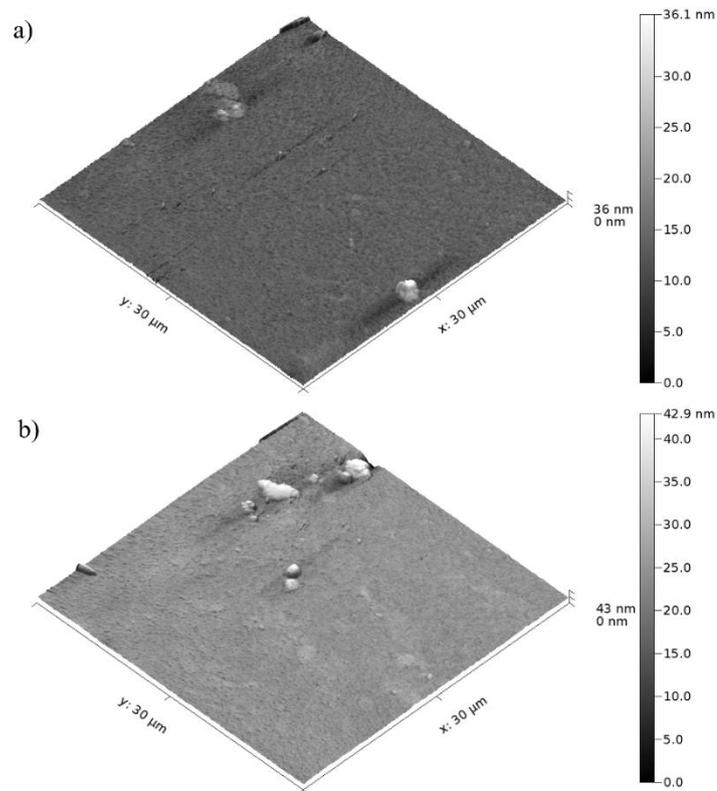


Figura 23: Topografia de superfície por AFM das amostras (a) FH_Ti10 e (b) FH_Ti20.

Nesse sentido, os resultados corroboram com dados de estudos similares encontrados na literatura, onde a rugosidade superficial aumenta com a deposição de filmes finos de Ti por *magnetron sputtering*.

Pantaroto *et al.* (2021) depositaram por magnetron sputtering diferentes fases cristalinas de TiO₂ em substratos de Ti puro, com a finalidade de aprimorar superfície do material, as propriedades eletroquímicas e a adesão celular. Os autores destacaram que a deposição dos filmes à base de TiO₂ modificou a topografia da superfície do substrato, aumentando a rugosidade superficial. A mistura das fases cristalinas (anastase e rutilo) apresentou os maiores

valores de Ra ($25,64 \pm 1,36$ nm) seguidos das amostras rutilo ($11,52 \pm 1,55$ nm), anastase ($8,72 \pm 3,68$ nm) e Ti sem tratamento ($3,30 \pm 0,33$ nm), respectivamente.

Além disso, a importância do efeito proporcionado pela rugosidade de uma superfície é significativa para as aplicações biomédicas que exijam osteointegração, uma vez que a área superficial auxilia no processo de proliferação de osteoblastos (KUMAR *et al.*, 2019). Para Metwally e Stachewicz (2019), a rugosidade e a química da superfície de um biomaterial influenciam diretamente na fixação celular, além de um revestimento ou tratamento de superfície compatível com o tipo de célula proporcionar melhor ancoragem.

Estudos de Linez-Bataillon *et al.* (2002) já destacavam que há uma correlação significativa entre a topografia de uma superfície, como rugosidade superficial e molhabilidade, com o crescimento celular, ocorrendo a proliferação e o espalhamento de osteoblastos de forma mais expressiva em superfícies de titânio com valores de Ra menores que 200 nm. Também, para Martin *et al.* (1995), o número de células aderidas em superfícies de titânio após 24 horas de contato foi maior em superfícies menos rugosas.

Kumar *et al.* (2019) destacam em sua pesquisa que a rugosidade da superfície de um implante influencia na adesão bacteriana devido ao aumento da área superficial, das ranhuras e vales, o que propicia a formação biofilmes indesejáveis. Os autores avaliaram a adesão bacteriana em aço inoxidável AISI 316L e Ti6Al4V em diferentes acabamentos superficiais, e afirmam a hipótese de proporcionalidade na redução da formação de filmes de bactérias com a diminuição da rugosidade superficial. Além disso, apontam que valores de Ra em superfícies de aço inoxidável AISI316L maiores que 200 nm, podem influenciar na adesão bacteriana. Embora neste estudo não seja avaliada a formação de biofilmes bacterianos, observa-se a importância da rugosidade e da topografia da superfície nos vários aspectos que interferem o uso de materiais metálicos como biomateriais.

5.2.3. Ângulo de Contato

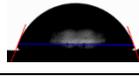
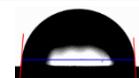
A molhabilidade de uma superfície é determinada pelo equilíbrio entre forças adesivas e coesivas. As forças adesivas entre o líquido e o sólido espalham a gota pela superfície e as forças coesivas no líquido minimizam o contato com a superfície. Desta forma, a molhabilidade

é calculada obtendo-se o ângulo de contato entre a gota e a superfície do sólido (FELLER *et al.*, 2015).

No contexto de biomateriais, a molhabilidade da superfície geralmente é avaliada determinando ângulos de contato da água ou algum líquido que simule fluidos corpóreos com a superfície do material. A Tabela 10 apresenta os resultados de ângulo de contato das superfícies estudadas, obtidos pelo método da gota sésil, utilizando SBF como líquido de teste, bem como o volume médio das gotas avaliadas e suas respectivas imagens.

Observou-se que as amostras contendo a deposição do filme fino de Ti apresentaram ângulos de contato próximos aos valores obtidos para o aço inoxidável AISI 316L sem revestimento (BRANCA), sendo aproximadamente 83° para FH_Ti10 e 85° para FH_Ti20. Independentemente do tempo de deposição do filme de Ti, as molhabilidades das superfícies recobertas com o filme fino não apresentaram variações expressivas quando comparadas entre si e com a amostra de controle (BRANCA). Entretanto, quando comparadas ao sistema FH, que apresentou um ângulo de contato próximo a 69°, nota-se uma diferença com uma tendência de hidrofília da superfície recoberta apenas pelo filme híbrido (FH).

Tabela 9: Ângulo de contato das amostras recobertas por filme fino de Ti.

| Amostra | Ângulo de contato (°) | Volume da gota (µL) | Imagem da gota |
|---------|-----------------------|---------------------|---|
| BRANCA | 84 ± 0,36 | 19,4 |  |
| FH | 69 ± 0,31 | 18,8 |  |
| FH_Ti10 | 83 ± 0,40 | 19,4 |  |
| FH_Ti20 | 85 ± 0,30 | 19,5 |  |

Superfícies com caráter hidrofílico são as que apresentam ângulo de contato inferiores a 90°, e as de caráter hidrofóbico são as que apresentam ângulo de contato superior a 90°. De acordo com Feller *et al.* (2015), superfícies hidrofílicas, quando em contato com tecidos, promovem osteointegração e cura acelerada. Além disso, superfícies hidrofóbicas tendem a ser favoráveis à adesão bacteriana, principalmente em superfícies com rugosidades elevadas.

É possível observar que o ângulo de contato das amostras estudadas tende a aumentar de forma diretamente proporcional ao aumento da rugosidade superficial (Tabela 7), e a

diminuir com a redução da rugosidade. A Figura 24 ilustra graficamente a correlação entre os valores de ângulo de contato e rugosidade Ra das amostras estudadas.

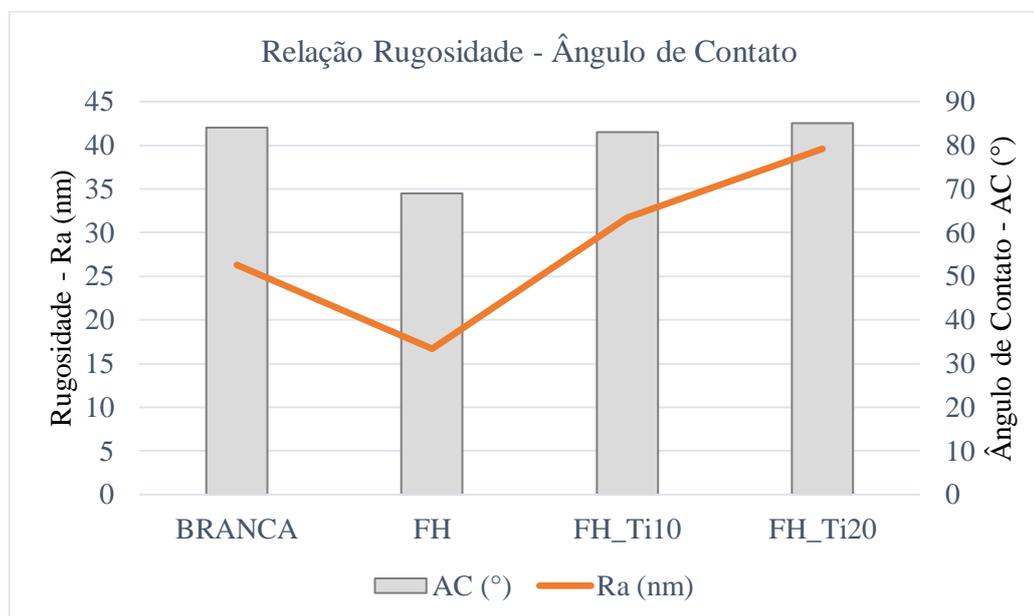


Figura 24: Relação entre Rugosidade (Ra) e Ângulo de Contato (AC).

Observa-se uma relação direta entre os parâmetros avaliados. A amostra FH apresentou a menor rugosidade média da superfície em relação as demais amostras, e o mesmo ocorreu com o ângulo de contato. Resultados que corroboram com as imagens de MEV-FEG, Figura 8 (b), e AFM, Figura 15 (b), onde é observada uma superfície nivelada e homogênea da amostra FH.

Estudos correlacionam a hidrofobicidade de uma superfície com a rugosidade e tensão superficial do material. Manoj *et al.* (2020) avaliaram diferentes potenciais de anodização para modificar a superfície de substratos de titânio e observaram que, para titânio sem tratamento, os valores médios do ângulo de contato foram de 67° com rugosidade média (Ra) $0,26 \pm 0,01 \mu\text{m}$ após o polimento da amostra. Posteriormente ao tratamento da superfície do Ti, os autores obtiveram ângulos de contatos maiores. Da mesma forma, houve o aumento da rugosidade superficial. O valor de Ra média obtido foi $6,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$, e o ângulo de contato dessa superfície foi $174,4 \pm 1,2^\circ$, o que demonstra uma característica de comportamento super-hidrofóbico. Esse fato ocorreu, segundo os autores, devido à formação de microclusters com espaços contendo ar na superfície do material, resultando em uma superfície mais rugosa e hidrofóbica quando comparada à amostra sem tratamento.

A molhabilidade de uma superfície está relacionada a diversas propriedades do material. Menzies e Jones (2010) analisaram o impacto do ângulo de contato na biocompatibilidade de

materiais para implante, e destacaram que uma topografia com características hidrofílicas que apresenta ângulos de contato inferiores a 80° é favorável à atividade osteoblástica, diminuindo a adesão fibroblástica.

5.2.4. Ensaios Eletroquímicos

Com o objetivo de avaliar o efeito protetivo dos revestimentos estudados, foram realizados testes eletroquímicos. Os resultados da análise de OCP e polarização potenciodinâmica são ilustrados pelos gráficos da Figura 25 (a) e Figura 22 (b), respectivamente.

Constata-se que o OCP se manteve estável ao longo do tempo para todas as amostras avaliadas. Para as amostras contendo o revestimento de titânio (FH_Ti10 e FH_Ti20), o potencial permaneceu muito próximo ao potencial da amostra sem revestimento (BRANCA). Além disso, as amostras não apresentaram variações significativas entre si.

No ensaio de OCP, observou-se valores de potencial menos ativos para amostra FH, demonstrando um OCP superior às demais amostras, esse resultado indica um efeito protetor do filme híbrido ao longo do tempo do ensaio.

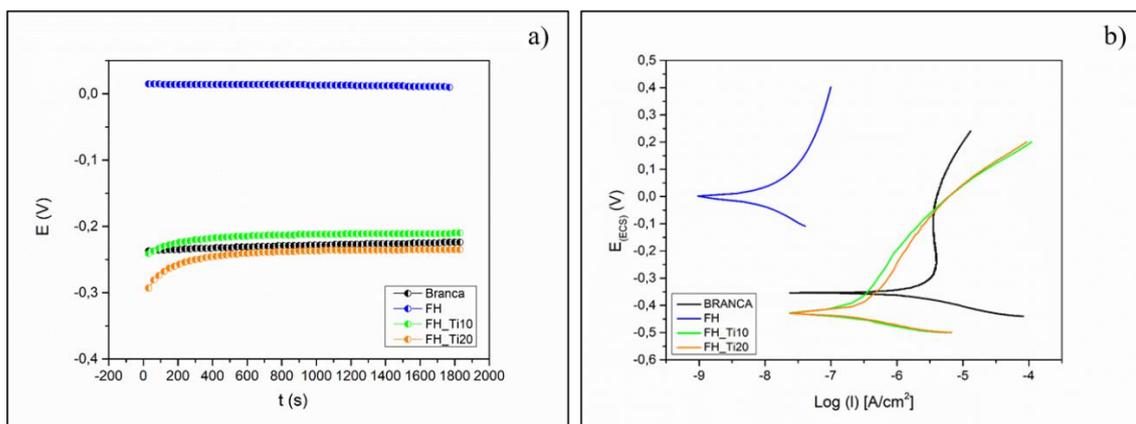


Figura 25: Monitoramento de (a) OCP e (b) curvas de polarização das amostras estudadas em solução de SBF.

Esse mesmo padrão de desempenho é observado no ensaio de polarização. Observa-se um comportamento passivo das amostras testadas no eletrólito de SBF. A amostra BRANCA e as amostras com deposição de Ti (FH_Ti10 e FH_Ti20) apresentaram densidades de corrente na mesma ordem de grandeza, com valores próximos a 10^{-7} A cm^{-2} . Além disso, as amostras

contendo revestimento à base de titânio (FH_Ti10 e FH_Ti20) apresentaram potenciais de corrosão menos nobres quando comparadas às demais amostras, principalmente em relação à amostra FH, entretanto, não apresentaram diferenças expressivas entre si.

Eliaz (2019) destacou em sua revisão que a densidade de corrente e o potencial de corrosão obtidos por curvas de polarização potenciodinâmica são diretamente proporcionais à taxa de corrosão, ou seja, quanto maior o E_{corr} e menor I_{corr} , melhor é o desempenho contra a corrosão do material, o que é visualizado na amostra FH. Conforme discutido em capítulos anteriores, a amostra contendo apenas revestimento à base de silano apresentou densidade de corrente na ordem de 10^{-9} A cm^{-2} e potencial de corrosão bem mais nobre, possivelmente pelo efeito barreira que o revestimento promove.

Venugopalan e Gaydon (2001) estudaram o comportamento de corrosão do aço inoxidável AISI 316L e liga de Ti em solução salina a 37 °C por meio de experimentos de polarização potenciodinâmica cíclica, e constataram que, em comparação com as ligas de titânio, o potencial de corrosão do aço é normalmente mais ativo e suas taxas de corrosão são maiores.

No caso das amostras avaliadas neste estudo, observou-se que aquelas que possuem revestimento de titânio (FH_Ti10 e FH_Ti20) apresentaram um desempenho sutilmente inferior ao substrato de aço inoxidável AISI 316L (BRANCA), com potenciais de corrosão de -428 mV para FH_Ti10 e -429 mV para FH_Ti20), contra o potencial mais nobre da amostra BRANCA ($E_{\text{corr}} = -354$ mV). Isso indica que a superfície do aço inoxidável sem revestimento, em comparação às revestidas com os filmes de titânio, possivelmente tenha seu filme de passivação mais bem formado. É importante salientar que, nessas amostras, a superfície em contato com o eletrólito é a base de Ti, apresentando, portanto, potenciais mais próximos ao do aço inoxidável. Além disso, a ligeira diminuição da densidade de corrente de corrosão para as amostras com revestimento à base de Ti tem a mesma razão que a amostra BRANCA.

Esses resultados estão de acordo com outros estudos envolvendo ensaios de polarização de amostras de titânio puro. Casagrande *et al.* (2018) avaliaram a aplicação de filmes híbridos a base de MAP e outros precursores sobre substrato de titânio e obtiveram resultados muito similares às amostras FH_Ti10 e FH_Ti20. Cheng e Roscoe (2005) estudaram o comportamento eletroquímico do Ti puro em solução salina, e destacaram o mesmo perfil de comportamento que FH_Ti10 e FH_Ti20 nas curvas de polarização para Ti sem revestimento. Já para Akinwamide *et al.* (2019), a deposição de proporções variáveis de TiN em substrato de aço inoxidável AISI 304L melhorou as propriedades de resistência à corrosão do aço, elevando o potencial de corrosão nas curvas de polarização para valores próximos a -115 mV.

Os resultados da análise de EIE são representados graficamente pelos diagramas de Bode na Figura 26 para as amostras estudadas, nos períodos de 24 e 120 horas de imersão em SBF.

Observa-se que não ocorreram variações expressivas quando comparados os tempos de imersão das amostras. Entretanto, ao ser avaliado o comportamento individual das amostras, nota-se que a amostra FH, conforme era esperado, devido aos resultados de OCP e polarização, apresentou um módulo de impedância maior, demonstrando um desempenho superior às demais amostras no quesito proteção barreira.

Além disso, o desempenho de FH já foi apresentado e o mesmo desempenho da amostra é observado quando comparada às amostras contendo filme fino de Ti. Observou-se um fenômeno em alta frequência associado ao efeito barreira do revestimento, e não foi evidenciado nenhum fenômeno em baixa frequência, o que corrobora e é justificado pelas demais propriedades do filme.

Para as amostras BRANCA, FH_Ti10 e FH_Ti20, o comportamento foi praticamente o mesmo, sendo observada apenas uma pequena variação no ângulo fase com um fenômeno em baixa para média frequência após 120 horas. Conforme mencionado em capítulos anteriores, esse fenômeno pode estar associado à mudança de condutividade elétrica do óxido passivo formado sobre a superfície do metal.

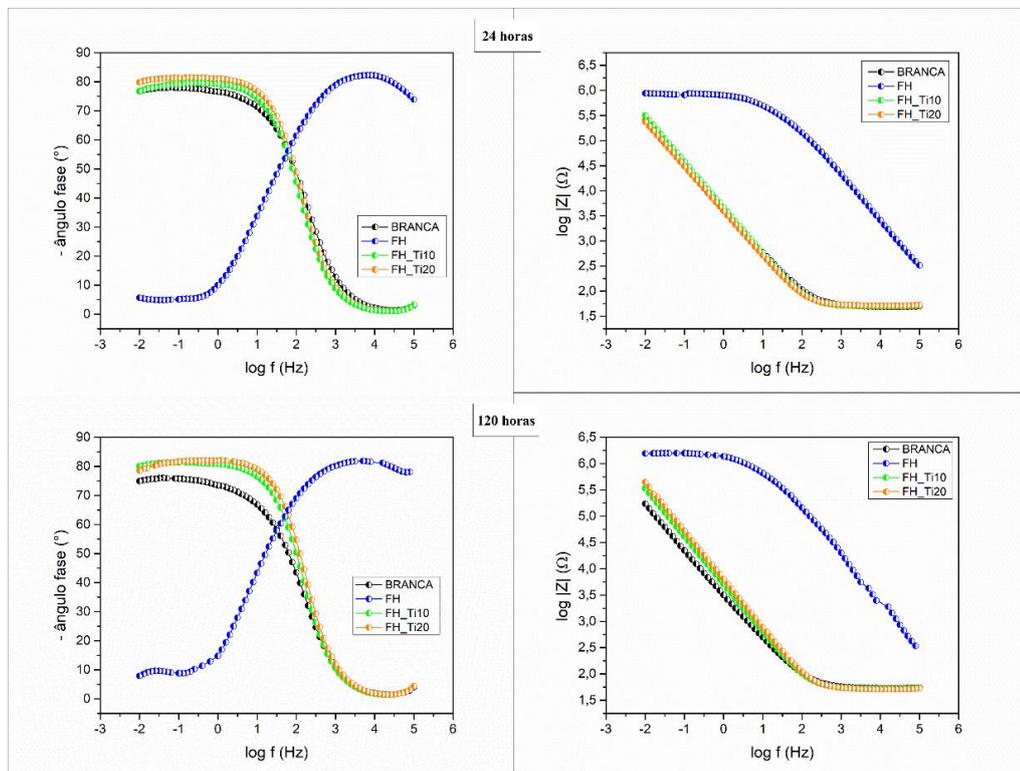


Figura 26: Diagrama de Bode para as amostras BRANCA, FH, FH_Ti10 e FH_Ti20.

Partindo da premissa que o Ti é um metal passivável, tal como o aço inoxidável AISI 316L, as amostras FH_Ti10 e FH_Ti20 apresentaram desempenho semelhante ao substrato sem revestimento. Esses resultados demonstraram que a deposição de Ti por magnetron sputtering não influenciou na resistência à corrosão do aço inoxidável 316L. Ambas as amostras apresentaram ângulo de fase próximos a 80° em média e baixa frequência, demonstrando características de um comportamento predominantemente capacitivo.

Esses resultados corroboram com os resultados de polarização, bem como com a literatura. Dhandapani *et al.* (2016) avaliaram o desempenho perante a resistência à corrosão e a biocompatibilidade de amostras de aço inox AISI 316L revestidas com Ti e carbono amorfo por *magnetron sputtering*. Eles destacaram que, independentemente da concentração do revestimento, as amostras estudadas mostraram que, eletroquimicamente, possuem a mesma resistência que o substrato sem revestimento, além do comportamento capacitivo com ângulos de fase em média e baixa frequência próximos a 70°.

Ziadi *et al.* (2019), desenvolveram um revestimento híbrido silano-titânio, sintetizado via sol-gel, para melhorar a proteção de aço inoxidável AISI 304L contra corrosão por ação microbiológica. O biofilme formado na superfície revestida foi morfologicamente diferente daquele formado na superfície do substrato sem revestimento. Os autores observaram uma redução seletiva na adesão de biofilme nas amostras revestidas, entretanto, a resistência à corrosão para períodos longos de imersão em SBF foi pouco eficiente quanto ao efeito barreira, justificado pela presença de um fenômeno em baixa frequência. Entretanto, para períodos de até 120 horas de imersão, os autores observaram também um fenômeno em alta frequência, demonstrando um comportamento capacitivo das amostras revestidas por silano-TiO₂-sol-gel.

5.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) após EIE

A Figura 27 apresenta as imagens de topo das amostras FH_Ti10 (a) e FH_Ti20 (b) após 120 horas de imersão em SBF.

Na amostra FH_Ti10, Figura 27 (a), é possível visualizar algumas pequenas fissuras no filme, o que pode resultar em corrosão precoce do biomaterial. No entanto, a amostra FH_Ti20, Figura 27 (b), não apresentou trincas superficiais, apenas acúmulos pontuais, hipoteticamente provenientes da precipitação dos sais do eletrólito SBF. Esses acúmulos são fatores que podem

contribuir para a deterioração do filme e acelerar o processo corrosivo, devido à concentração dos sais (CASAGRANDE *et al.*, 2018).

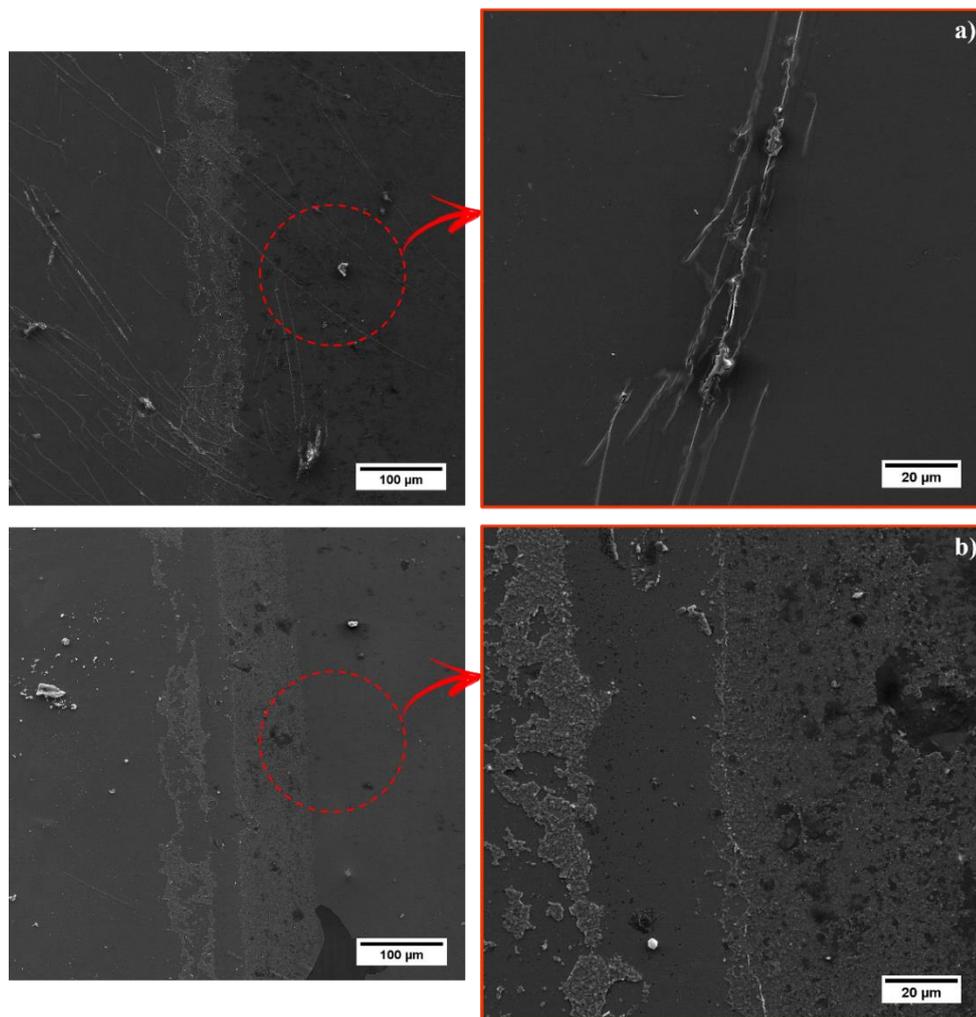


Figura 27: MEV após ensaio de EIE para as amostras FH_Ti10 (a) e FH_Ti20 (b).

A presença desses acúmulos pontuais pode ser atribuída à deposição dos sais do eletrólito, justificado pelos elementos detectados por EDS (Figura 28). É possível identificar pelo espectro pontual dos elementos químicos, nas amostras FH_Ti10 (a) e FH_Ti20 (b), a presença dos componentes do eletrólito SBF, tais como fósforo e cálcio, além dos elementos principais da liga 316L e dos filmes MAP, TEOS e Ti, confirmando a hipótese da precipitação dos sais presentes no fluido corpóreo simulado, fato que possivelmente indica a formação de apatita, o que induz efeitos osteo integrativos. Alguns pesquisadores, Jalota *et al.*, (2006) encontraram CaP na superfície de amostras de liga Ti_6Al_4V após 30 dias de imersão em SBF.

Além disso, foram observadas as superfícies das amostras BRANCA e FH, conforme já discutido na Figura 8, onde a amostra FH apresentou um filme homogêneo, sem fissuras e imperfeições. Estes resultados corroboram com os demais ensaios, que demonstraram a

superfície menos rugosa, com caráter hidrofílico e boa resistência à corrosão dentre as amostras estudadas.

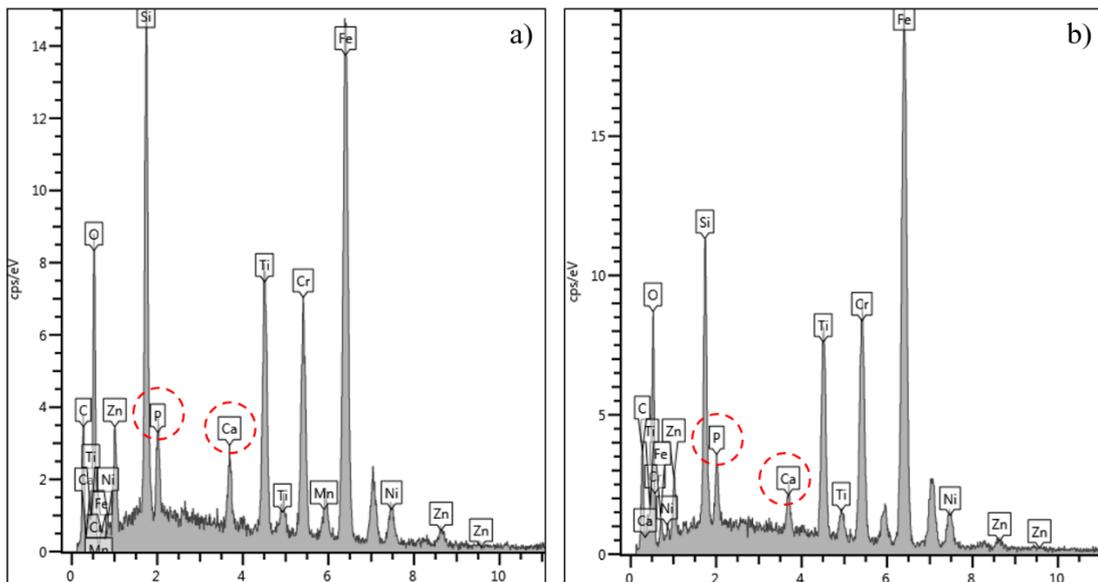


Figura 28: EDS pontual nas amostras (a) FH_Ti10 e (b) FH_Ti20 após 120 horas de imersão em SBF.

5.2.6. Ensaios in vitro

5.2.6.1. Viabilidade Celular - MTT

As interações entre células e materiais são complexas, conforme mencionado em capítulos anteriores. Alguns fatores tais como carga superficial, rugosidade, topografia e molhabilidade da superfície são cruciais para a adesão e crescimento celular de acordo com estudos de Casagrande *et al.* (2018); Dhandapani *et al.* (2016); Ziadi *et al.* (2019); Feller *et al.* (2015).

A viabilidade celular das amostras estudadas, ilustrada pela Figura 29, foi obtida pelo método MTT, 14 dias após o processo de semeadura das células-tronco mesenquimais sobre os diferentes grupos.

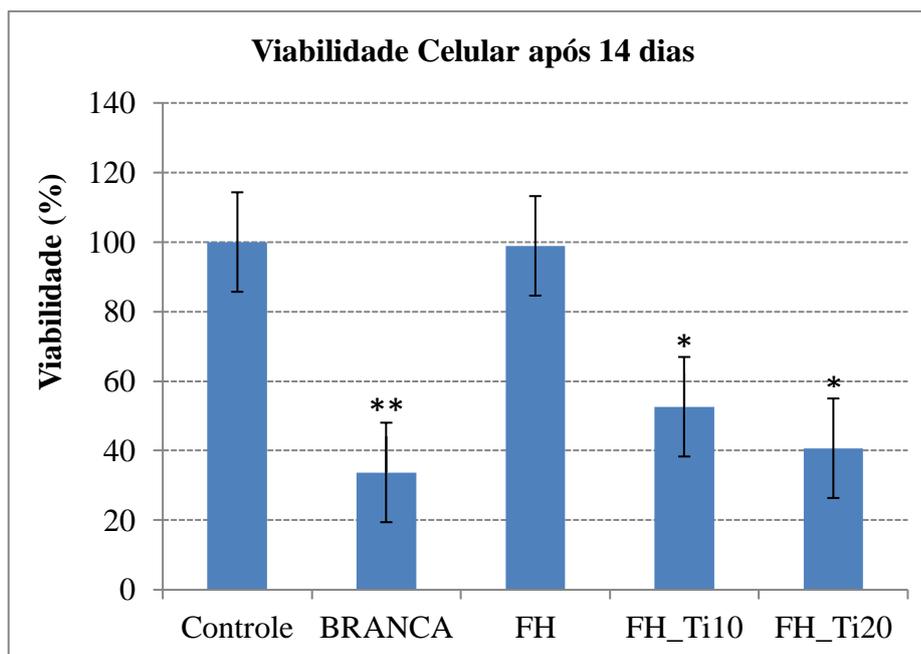


Figura 29: Viabilidade Celular das amostras avaliadas após 14 dias de incubação onde $p < 0,001^{**}$ e $p < 0,05^{*}$.

É possível observar na Figura 29, que as amostras do grupo FH apresentaram um comportamento muito similar ao Controle, desempenho ideal para um biomaterial. No cultivo das células nas amostras do grupo BRANCA, observou-se diferença significativa apresentando uma menor quantidade de células viáveis com $p < 0,001^{**}$ quando comparadas ao controle. As células semeadas nas amostras contendo deposição de titânio FH_Ti10 e FH_Ti20 também se mostraram menos viáveis quando comparadas ao controle, com $p < 0,05^{*}$.

Os valores das absorvâncias médias e desvio padrão no teste MTT foram de $0,34 \pm 0,09$ (Controle), $0,11 \pm 0,05$ (BRANCA) e $0,33 \pm 0,10$ (FH), $0,18 \pm 0,03$ (FH_Ti10), $0,13 \pm 0,09$ (FH_Ti20) após 14 dias.

Quando comparados entre si, o grupo FH apresenta uma diferença significativa na viabilidade celular, com um desempenho superior em relação aos demais grupos. Esse fato, está relacionado às propriedades da superfície das amostras FH, tais como molhabilidade, rugosidade e topografia. Dentre as amostras estudadas, FH apresentou a menor rugosidade média Ra ($16,7 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$) conforme Tabela 7 e a superfície mais hidrofílica ($AC 69^\circ \pm 0,31^\circ$) conforme Tabela 8. Baseado na literatura, essas características são favoráveis à adesão, proliferação e diferenciação celular (FELLER *et al.*, 2015; MANOJ *et al.*, 2020; METWALLY e STACHEWICZ, 2019; SHARMA *et al.*, 2016; SHIBATA *et al.*, 2015).

Considerando os diversos fatores relevantes para adesão, crescimento e proliferação celular, Eisenbarth *et al.* (2006) relataram maior viabilidade de células osteoblásticas em superfícies lisas, com Ra entre 7–15 nm, do que em superfícies de rugosidades maiores, com

Ra = 40 nm. Esse dado da literatura corrobora com o resultado obtido neste estudo, onde a amostra FH, cuja superfície apresentou Ra igual a 16,7 nm (Tabela 7), demonstrou um ótimo desempenho diante da viabilidade celular.

No que diz respeito ao efeito da molhabilidade da superfície do biomaterial na adesão celular, Chai *et al.* (2008) sugeriram que a molhabilidade influencia a superfície apenas nas primeiras horas em contato com o meio de incubação, uma vez que o meio altera a hidrofobicidade da superfície após um determinado período de contato. Dessa forma, os autores afirmam que a ligação celular durante um longo período de cultura no meio celular não pode ser baseada na molhabilidade inicial dos revestimentos.

Entretanto, estudos afirmam que as superfícies hidrofílicas são preferenciais às hidrofóbicas devido à boa interação com fluidos biológicos, tecidos e células. Além disso, relatam que superfícies com ângulo de contato inferiores a 70° são capazes de absorver proteínas de forma mais eficiente, o que favorece a adesão e organização celular (DHANDAPANI *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2019; SIMSEK *et al.*, 2019). Para Wang *et al.* (2013), superfícies de aço inoxidável AISI 316L recobertas por filme híbrido a base de TEOS e MTES, moderadamente hidrofílicas com ângulo de contato de 45,3°, apresentaram comportamento superior no quesito adesão e proliferação celular em relação a superfícies com ângulo de contato de 85,1°.

Além disso, estudos relacionam a carga superficial do biomaterial como sendo outro fator importante na viabilização celular. Zhang *et al.* (2019) destacaram que a combinação da carga superficial positiva com incrementos de grupos polares presentes na superfície do material proporcionaram melhor interação das células com o biomaterial. Os autores observaram alterações nas células que cresceram em superfícies de Ti puro, principalmente no formato fragmentado e encurtado das fibras, e atribuíram tal comportamento a superfícies carregadas negativamente.

Embora não tenha sido avaliada especificamente a carga presente nas superfícies das amostras estudadas, pode-se, por meio dos resultados eletroquímicos, por exemplo, supor que o comportamento capacitivo das amostras BRANCA, FH_Ti10 e FH_Ti20, além do efeito de dupla camada observado, pode ter influenciado de forma negativa na aderência celular.

5.2.6.2. Citotoxicidade - LDH

A citotoxicidade dos revestimentos estudados foi avaliada por meio da atividade da enzima lactato desidrogenase, LDH, cujos resultados obtidos estão ilustrados na Figura 30. Observa-se que não houve variações expressivas entre os grupos, embora, após 14 dias de incubação, as amostras BRANCA e FH_Ti20 apresentaram uma dosagem minimamente maior da enzima lactato desidrogenase quando comparadas ao controle, padrão-ouro para cultivo celular.

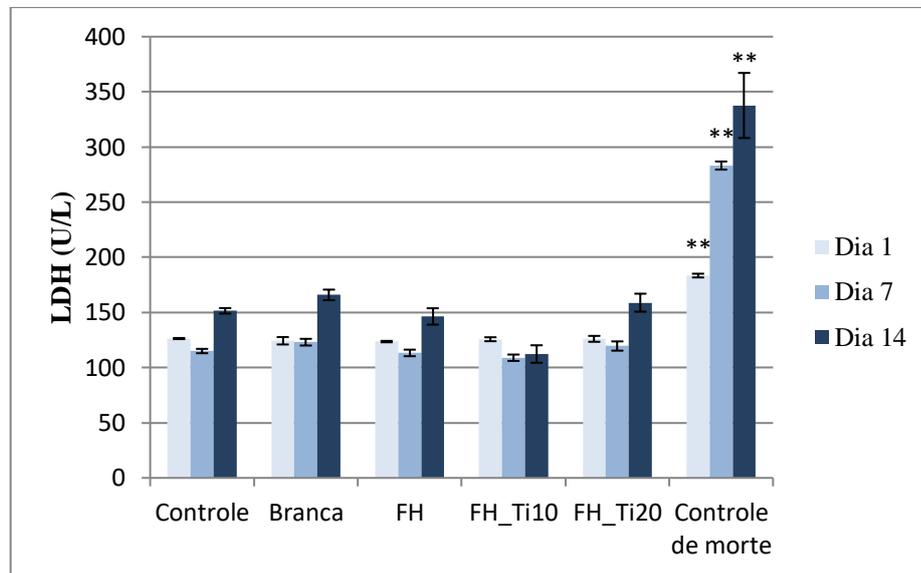


Figura 30: Citotoxicidade de amostras e controles medida pela liberação de LDH após 1, 7 e 14 dias. As células foram semeadas na placa de poços (controle), amostras (brancas, FH, FH_Ti10 e FH_Ti20) e os poços tratados com Triton (controle de morte). *** p = 0,000.

A enzima lactato desidrogenase é uma enzima intracelular e sua presença aumentada no ambiente extracelular é indicativo de problemas de integridade da membrana citoplasmática e, conseqüentemente, danos às células (MAURMANN *et al.*, 2017). A concentração dessa enzima no meio de cultura é proporcional à quantidade de células mortas, portanto, as respostas das amostras estudadas apresentaram um comportamento desejável quanto à citotoxicidade, uma vez que apresentaram dosagens de LDH bastante próximas ao controle, mostrando ausência de efeitos tóxicos, fato muito positivo, uma vez que o comportamento das células no controle é considerado o melhor desempenho perante a citotoxicidade do meio. Além disso, conforme era esperado, todas amostras apresentaram resultados melhores em relação ao controle de morte (poço contendo Triton X - 1%), com concentrações de enzima inferiores, o que afirma a baixa citotoxicidade de todos os grupos.

5.2.6.3. Micrografia de Fluorescência após crescimento celular

Para avaliação qualitativa da presença de células aderidas nas amostras estudadas, após 14 dias de cultivo celular nos diferentes grupos, utilizou-se o método de marcação fluorescente por DAPI. Por esse método, os núcleos das células são marcados com uma coloração azul fluorescente. A Figura 31 ilustra as imagens obtidas por microscopia de fluorescência.

Observa-se na amostra FH, Figura 31 (b), uma maior quantidade de células presentes no material quando comparadas aos demais grupos. As amostras BRANCA, FH_Ti10 e FH_Ti20, Figuras 31 (a), (c) e (d), respectivamente, apresentaram um desempenho semelhante entre si.

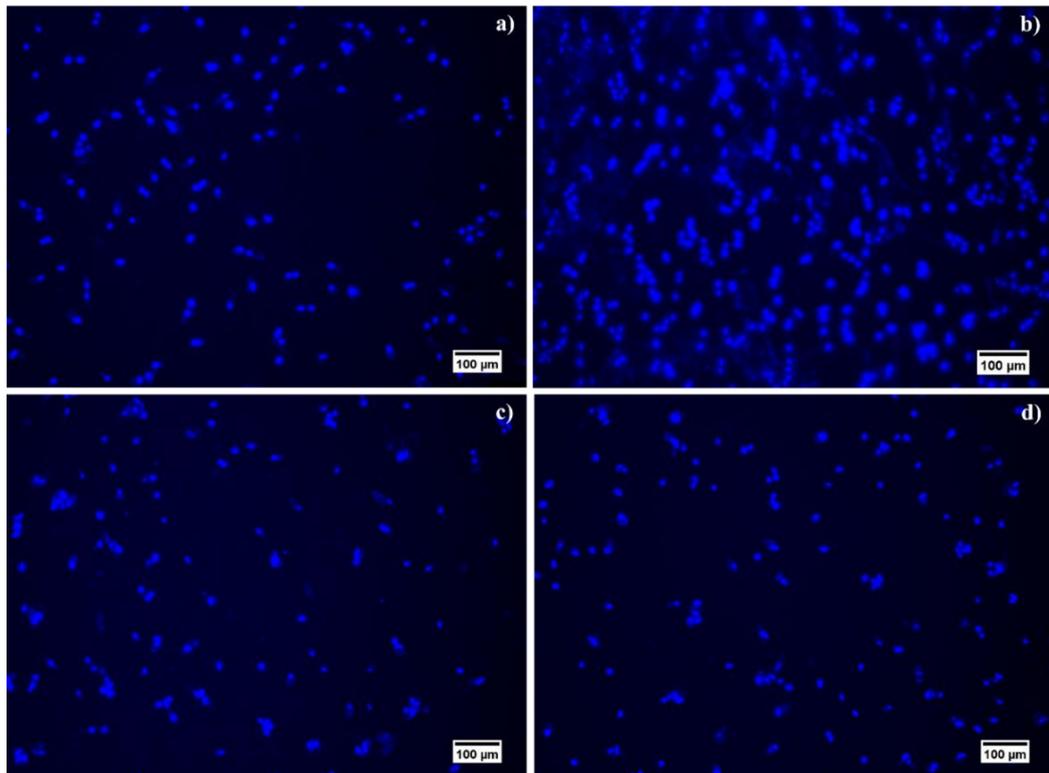


Figura 31: Microscopia de fluorescência após crescimento celular e coloração por DAPI das amostras BRANCA (a), FH (b), FH_Ti10 (c), FH_Ti20 (d).

Na amostra FH, que tem uma proliferação maior de células em comparação às demais amostras estudadas, ocorre a presença de vários núcleos de células em pequenos aglomerados, o que demonstra boa adaptação ao meio. O comportamento superior da amostra FH era esperado de acordo com o resultado do ensaio de viabilidade celular (Figura 30), que demonstrou um desempenho equivalente ao controle. Além disso, esse comportamento

corrobora com estudos que definem superfícies com as características da amostra FH como sendo as preferidas pelas células para a adesão e crescimento, conforme mencionado em resultados anteriores (FELLER *et al.*, 2015; GEBEAU *et al.*, 2013; MANOJ *et al.*, 2020; METWALLY e STACHEWICZ, 2019; MUGHAL *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2016; SHIBATA *et al.*, 2015).

5.2.6.4. Avaliação da viabilidade celular por coloração com calceína e iodeto de propídio

A avaliação qualitativa da viabilidade celular foi avaliada por meio da coloração com calceína e iodeto de propídio (IP). As células viáveis são marcadas pela fluorescência verde, e as células mortas, pela fluorescência vermelha. A Figura 32 apresenta os resultados do ensaio realizado nas amostras BRANCA (a), FH (b), FH_Ti10 (c) e FH_Ti20 (d).

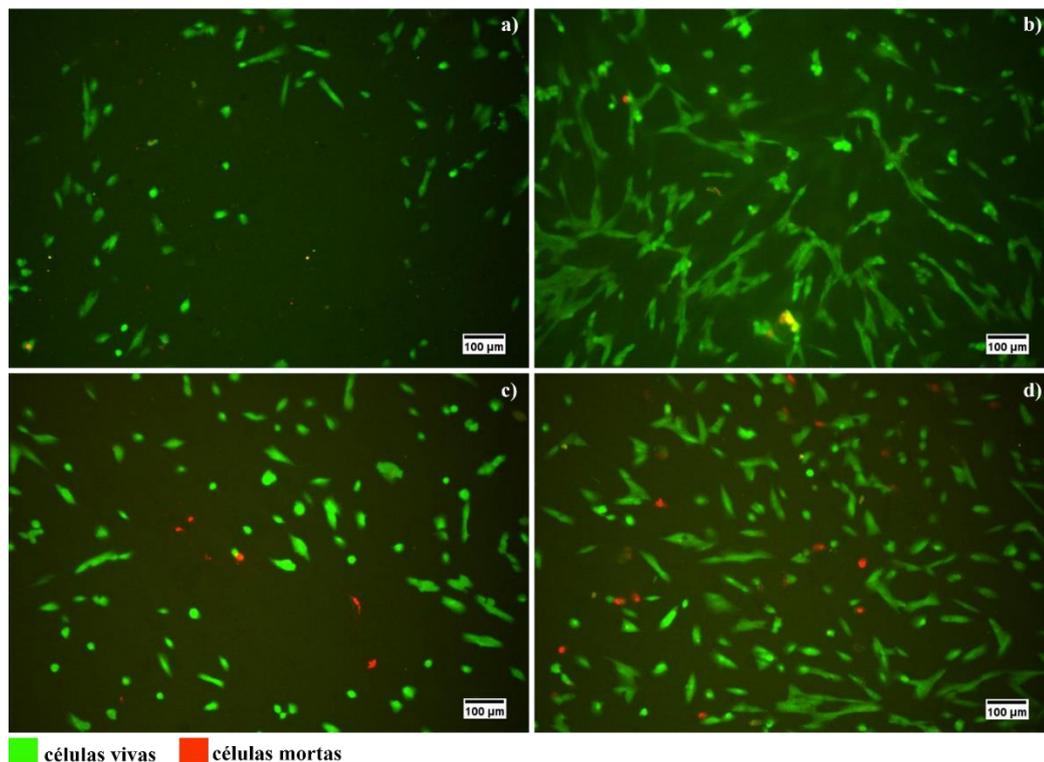


Figura 32: Microscopia de Fluorescência após coloração com calceína e iodeto de propídio das amostras BRANCA (a), FH (b), FH_Ti10 (c) e FH_Ti20 (d).

Observa-se que há uma presença maior de células viáveis na amostra FH (b), onde é possível visualizar pequenos agrupamentos de células. Além disso, observa-se algumas células

mortas para as amostras FH_Ti10 (c) e FH_Ti20 (d). Este resultado condiz com a dosagem de LDH, onde FH_Ti20 demonstrou um incremento na quantidade de LDH dosado, embora pequeno, em relação às demais amostras.

5.2.6.5. Micrografia eletrônica de varredura (MEV-FEG) após crescimento celular

As micrografias das superfícies das amostras estudadas, obtidas por MEV-FEG, após 14 dias de incubação em meio adequado para crescimento celular, mostram as imagens de topo das células aderidas ao material. Observa-se a presença de células em todas as amostras estudadas.

A Figura 33, ilustra as micrografias da amostra BRANCA após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c). Nota-se um formato planar, morfologia típica de células-tronco mesenquimais, demonstrando que houve aderência celular, apesar de serem observados grandes espaços intercelulares. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados na coloração por DAPI, bem como o ensaio de viabilidade, no qual a amostra BRANCA apresentou menores quantidades de células viáveis quando comparadas às demais amostras estudadas.

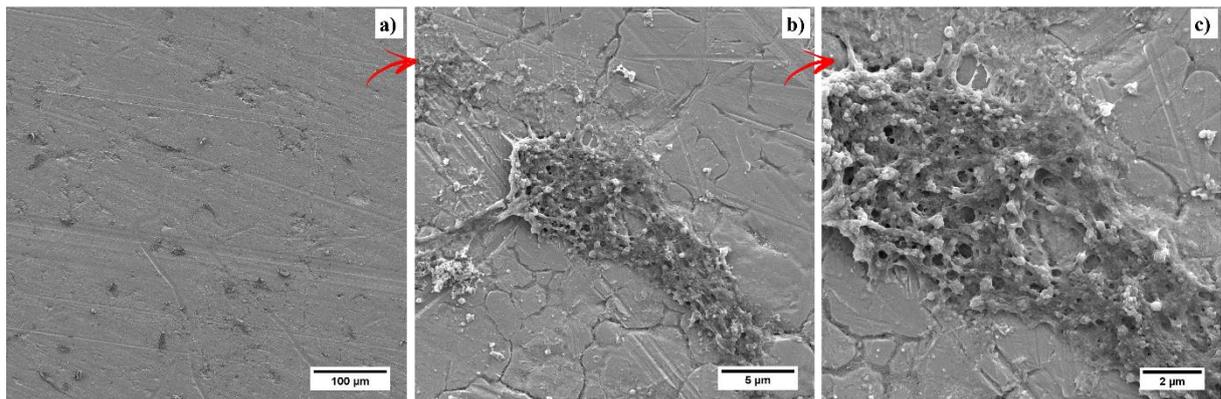


Figura 33: MEV da amostra BRANCA após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c).

As Figuras 34, 35 e 36 mostram as micrografias das amostras FH, FH_Ti10 e FH_Ti20 após crescimento celular em 3 magnificações diferentes. É possível identificar o mesmo padrão de crescimento celular para todas as amostras revestidas, onde a base da célula apresentou uma

morfologia alongada e plana com alguns aglomerados, possivelmente formados por núcleos celulares, de forma mais arredondada.

As amostras revestidas apresentaram boa adesão celular, não havendo diferenças neste quesito em relação à amostra BRANCA. Todas as amostras testadas apresentaram células com forma poligonal/fusiforme e com presença de extensões citoplasmáticas.

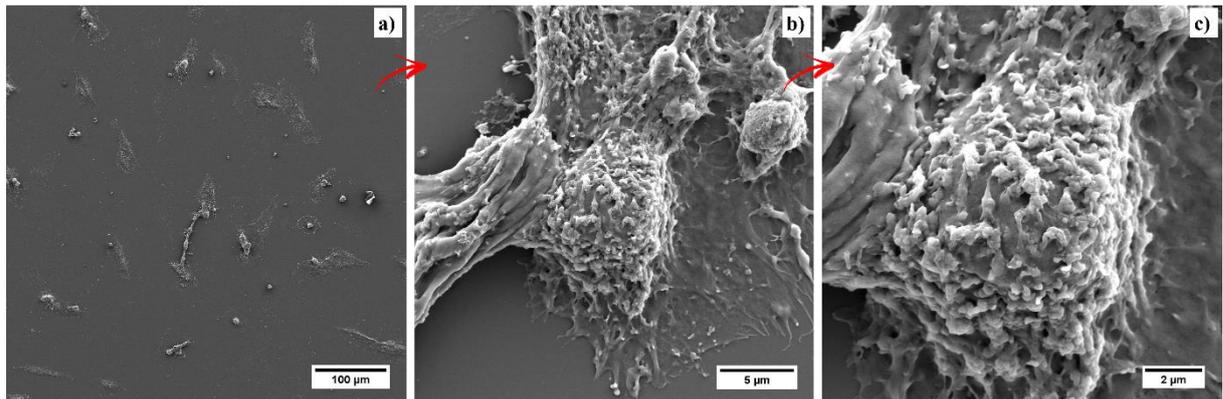


Figura 34: MEV da amostra FH após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c).

Qualitativamente, não foram evidenciadas diferenças expressivas no aspecto morfológico nas imagens das amostras testadas obtidas por MEV-FEG. Visualmente, todas as amostras contendo revestimento apresentaram uma quantidade considerável de células aderidas à superfície do material.

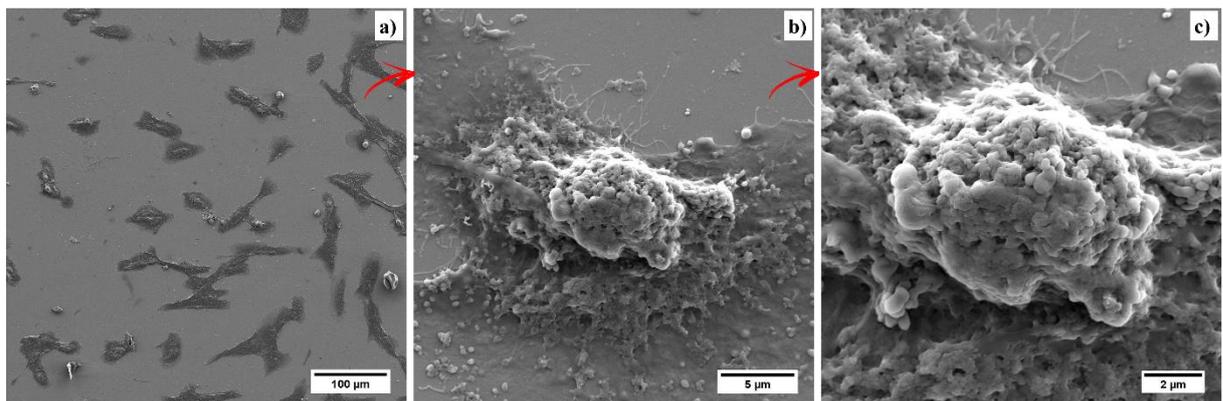


Figura 35: MEV da amostra FH_Ti10 após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c).

Observou-se um padrão de desenvolvimento celular que é equivalente ao tipo de célula testada, com adesão uniforme. Além disso, uma pequena variação no espalhamento da rede citoplasmática da amostra FH_Ti20 é mostrado na Figura 33. Esse fato pode explicar as células mortas visualizadas nas imagens obtidas por fluorescência (Figura 29), uma vez que a adesão

ao material e a forma como as células se estendem pela superfície determina sua proliferação e crescimento.

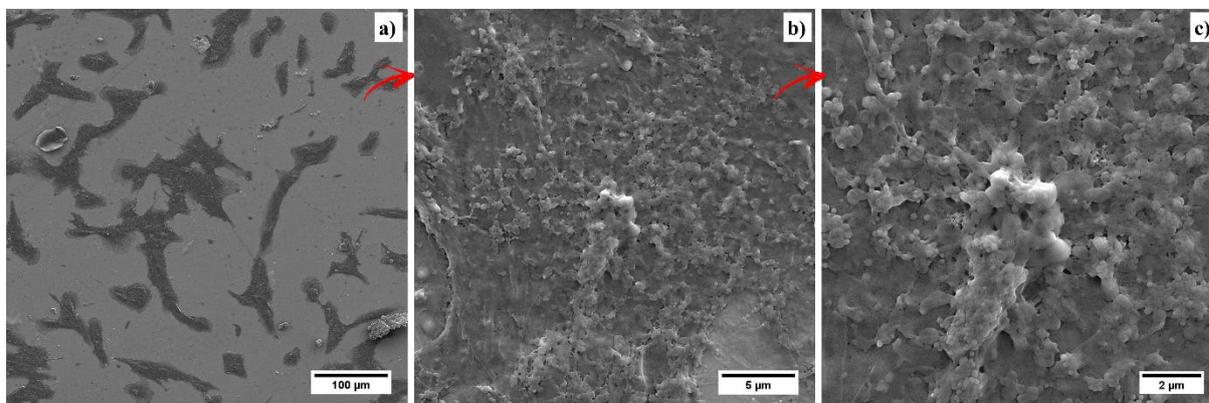


Figura 36: MEV da amostra FH_Ti20 após crescimento celular nas magnificações 500× (a), 10000× (b) e 20000× (c).

Ong *et al.* (1996) formularam hipóteses a respeito da morfologia de osteoblastos, correlacionando-a com as variações topográficas das superfícies de discos de titânio. Verificaram que em superfícies lisas as células assumiram formas arredondadas. Já para superfícies rugosas, os osteoblastos apresentaram um formato alongado seguindo as trilhas formadas pelo lixamento do metal. Os autores destacam ainda que, diretamente proporcional ao incremento da rugosidade superficial do biomaterial, ocorrem deposições de cálcio, fósforo e proteínas, o que pode favorecer ou prejudicar o desenvolvimento das células.

Embora nesta pesquisa as células utilizadas para os testes *in vitro* tenham sido células-tronco, o comportamento das células perante o crescimento e proliferação seguiu a hipótese firmada por Ong *et al.* (1996), onde é possível observar uma tendência a formas arredondadas nas amostras FH e FH_Ti10, e ambas apresentaram superfícies menos rugosas comparadas às demais amostras estudadas. Além disso, nas amostras BRANCA e FH_Ti20, para as quais as superfícies mostraram rugosidades maiores em relação às demais, as células assumiram uma tendência a formatos alongados.

Casagrande *et al.* (2018) verificaram a morfologia de células-tronco mesenquimais após quatro dias de incubação, e também obtiveram resultados similares, onde nas amostras mais rugosas as células distribuíram-se ao longo da sua superfície de forma mais alongada, com formato planar.

Em seu estudo, Martin *et al.* (1995) descreveram que a quantidade de células aderidas a superfícies de titânio, após 48 horas de incubação, foi expressivamente superior para superfícies menos rugosas, similares ao poço de controle. Essa hipótese é condizente com os resultados

obtidos nesta pesquisa, onde a amostra FH, que apresentou uma topografia homogênea, bem como o menor incremento na rugosidade superficial, demonstrou também maior quantidade de células viáveis.

6. CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo principal obter e caracterizar diferentes filmes híbridos à base dos precursores alcóxidos 3-(trimetóxisililpropil)metacrilato (MAP) e tetraetóxisilano (TEOS) aplicados por dip-coating com deposição de filmes finos de titânio por magnetron sputtering em substrato de aço inoxidável AISI 316L para potencial aplicação como biomaterial.

Diante disso, é possível concluir que o revestimento híbrido à base de silanos, nas concentrações avaliadas de MAP e TEOS, uma aplicação por dip-coating e com solução estabilizada em pH 4, apresentou a formação de um revestimento aderente com cobertura homogênea e com caráter protetivo ao substrato de aço inoxidável AISI316L. Dentre as variações estudadas, a amostra FH apresentou a melhor performance diante dos requisitos para aplicação como biomaterial. Já os revestimentos de Ti depositados sobre o filme de MAP e TEOS não apresentaram incrementos expressivos nas propriedades do material, demonstrando não serem viáveis para aplicações biomédicas nas condições testadas neste trabalho.

Com relação à diferença entre uma e duas aplicações de filme MAP e TEOS, as características protetoras do revestimento tiveram melhor desempenho para uma aplicação, a amostra FH. De acordo com os resultados eletroquímicos, confirma-se a eficiência da proteção barreira anticorrosiva deste revestimento quando em contato com os fluidos corpóreos, denotando excelente resistência à corrosão, e conseqüentemente a minimização da liberação de íons no corpo humano, o que possivelmente tenha desempenhado um importante papel na citotoxicidade do revestimento.

Observou-se que a camada homogênea e aderente de uma aplicação do revestimento tornou a superfície do substrato menos rugosa em relação às demais amostras testadas. Além disso, observou-se a diminuição do ângulo de contato, demonstrando uma superfície de caráter hidrofílico. Avaliando-se a correlação existente entre a molhabilidade e a rugosidade das superfícies, pode-se concluir que há uma relação direta entre as propriedades citadas. A amostra FH apresentou a menor rugosidade média da superfície em relação às demais amostras, o mesmo ocorrendo com o ângulo de contato. Essa superfície nivelada e homogênea da amostra FH foi confirmada pelas imagens de topo obtidas por MEV-FEG. Não foi observada proporcionalidade entre os parâmetros, e tampouco entre as variações. Entretanto, o aumento da rugosidade para as demais amostras também resultou em ângulos de contato maiores.

Referente à deposição do filme de Ti por magnetron sputtering em dois tempos distintos, os resultados não apresentaram variações expressivas. O comportamento físico-químico, morfológico e eletroquímico das amostras contendo deposição dos filmes de Ti não foi influenciado pela variável tempo de deposição. Não foram visualizadas grandes diferenças entre as amostras FH_Ti10 e FH_Ti20 e, em relação às demais amostras estudadas, o comportamento destas foi muito semelhante ao substrato sem revestimento. Portanto, a deposição do filme fino de Ti por magnetron sputtering em dois tempos de processo não influenciou nas propriedades do material avaliado.

Com relação à biocompatibilidade dos revestimentos obtidos e caracterizados neste estudo, foi possível verificar que a amostra FH, ou seja, o revestimento à base de MAP e TEOS com uma aplicação por dip-coating, apresenta o melhor desempenho perante a citotoxicidade, bem como em relação à viabilidade celular. Quando comparados entre si, o grupo FH apresenta uma diferença significativa na viabilidade celular, observando-se um desempenho superior em relação aos demais grupos. O revestimento híbrido demonstra um excelente resultado no ensaio MTT, semelhante ao controle, denotando que as células viáveis tiveram boa adaptabilidade ao meio. Dessa forma, concluiu-se que as propriedades de molhabilidade, rugosidade e caráter protetivo da superfície da amostra FH favoreceram para o bom desempenho biológico.

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se afirmar que o revestimento MAP e TEOS, nos parâmetros da amostra FH, ofereceram um ambiente biocompatível para células-tronco mesenquimais, além de possuir boas propriedades físico-químicas, morfológicas e de resistência à corrosão. Desse modo, torna esse tipo de revestimento, aplicado em aço inoxidável AISI316L, uma excelente opção para aplicações como biomaterial.

7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMAS PESQUISAS

- a) Avaliar a resistência ao desgaste do revestimento MAP e TEOS;
- b) verificar a resistência à corrosão e liberação de íons a longo prazo;
- c) testar a deposição por *magnetron sputtering* de outros compostos, tais como hidroxiapatita
- d) avaliar a interação das superfícies testadas com imersão em SBF a longo prazo;
- e) testar filmes com propriedades bactericida sobre o filme híbrido MAP e TEOS.

REFERÊNCIAS

ABRAMSON S., ALEXANDER H., BEST S., BOKROS J.C., BRUNSKI J.B., COLAS A., COOPER S.L., CURTIS J., HAUBOLD A., HENSCH L.L., HERGENROTHER R.W., HOFFMAN A.S., HUBBEL J.E., JANSEN J.A., KING M.W., KOHN J., LAMBA N.M.K., LANGER R., MIGLIARESCHI C., MORE R.B., PEPPAS N.A., RATNER B.D., VISSER S.A., VON RECUM A., WEINBERG S., YANNAS I.V., *Classes of materials used in medicine: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier Academic Press, **Biomaterials Science**. London, 2004: 67–137.

AKHTAR S., MATIN A., MADHAN A.K., IBRAHIM D. A., LAOUI T. Enhancement of anticorrosion property of 304 stainless steel using silane coatings. **Applied Surface Science**. 2018; 440: 1286-1297.

AKINWAMIDE S. O., AKINRIBIDE O. J., MAFAFO M., PHUMLANI M., OBADELE B. A, ABE B. T., OLUBAMBI P. A., Effect of TiN addition on corrosion behavior of spark plasma sintered 304L austenitic stainless steel in chloride media, **Materials Today: Proceedings**, 2020; 28: 384-387.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**. v. 25. nº5. p.835-841. 2002.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM F138-13A**: Standard Specification for Wrought 18Chromium-14Nickel-2,5Molybdenum Stainless Steel Bar and Wire. West Conshohocken: ASTM, 2013. 5 p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM A240/A240M-15B**: Standard Specification for Chromium and chromium -Nickel Steel Plate, Sheet, and strip for Pressure Vessels and General Applications. 15b ed. West Conshohocken: (UNS S31603) ASTM, 2015. 14 p.

ARAÚJO, T. L.; COUTO, A. A. Estudo do aço inoxidável aplicado como implante ortopédico. **Revista Mackenzie**. 20p. 2004.

ASSIS S. L., ROGERO S. O., ANTUNES R. A., PADILHA A. F., COSTA I. A. Comparative Study of the In Vitro Corrosion Behavior and Cytotoxicity of a Superferritic Stainless Steel, a Ti-13Nb-13Zr Alloy, and an Austenitic Stainless Steel in Hank's Solution. Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2005; 73B:109–116.

ATAPOUR M., WANG X., FÄRNLUND K., WALLINDER I. O., HEDBERG Y., Corrosion and metal release investigations of selective laser melted 316L stainless steel in a synthetic physiological fluid containing proteins and in diluted hydrochloric acid, *Electrochimica Acta*. 2020; 354: 136748.

BAIT L., AZZOUZ L., MADAOUY N., SAOULA N., Influence of substrate bias voltage on the properties of TiO₂ deposited by radio-frequency magnetron sputtering on 304L for biomaterials applications, *Applied Surface Science*. 2020; 395: 72-77.

BALDIN E.K.K. et al.: Effect of sterilization processes on the properties of a silane hybrid coating applied to Ti6Al4V alloy; *J. Mater. Res.*, 2017.

BATISTA NETO L. V., CASTRO W. B. Otimização do processo de deposição de coberturas de Ti em aço inoxidável biomédico. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 2015;10(1): 12–15.

BEKMURZAYEVA A., DUNCANSON W. J., AZEVEDO H. S., KANAYEVA D., Surface modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material, *Materials Science and Engineering: C*, 2018; 93: 1073-1089.

BELTRAMI L. V. R., BELTRAMI M., ROESCH-ELY M., KUNST S. R., MISSELL F. P., BIRRIEL E. J., MALFATTI C. de F. Magnetoelastic sensors with hybrid films for bacteria detection in milk. *Journal of Food Engineering*. 2017; 212:18-28.

BELTRAMI L. V. R., KUNST R. S., BIRRIEL E. J., MALFATTI C. F. Magnetoelastic biosensors: Corrosion protection of an FeNiMoB alloy from alkoxide precursors. *Thin Solid Films*. 2017a; 83:624.

BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1926-1933, set. 2009.

BEUERLEIN M.J., MCKEE M.D., Calcium sulfates: what is the evidence: **J. Orthop. Trauma**. 2010; 24 (Suppl. 1): 46–51.

BOLBASOV E.N., ANTONOVA L.V., STANKEVICH K.S., ASHRAFOV A., MATVEEV V.G., VELIKANOV E.A., KHODYREVSKAYA YU.I., KUDRYAVTSEVA YU.A., ANISSIMOV Y.G., TVERDOKHLEBOV S.I., BARBARASH L.S. The use of magnetron sputtering for the deposition of thin titanium coatings on the surface of bioresorbable electrospun fibrous scaffolds for vascular tissue engineering: A pilot study. **Applied Surface Science**. 2017; 398: 63–72.

BRAEM, A.; NEIRINCK, B.; SCHROOTEN, J.; VAN DER BIEST, O.; VLEUGELS, J. Biofunctionalization of porous titanium coatings through sol–gel impregnation with a bioactive glass–ceramic. **Materials Science and Engineering C**, 2012; 32: 2292–2298.

BRINKER, C. J.; SCHERER G. W. **Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. 908p. London: Academic Press, 1990.

BROOKS E. K., BROOKS R. P., EHRENSBERGER M.T., Effects of simulated inflammation on the corrosion of 316L stainless steel, **Materials Science and Engineering: C**, 2017; 71: 200-205.

BUNSHAH, R. F., Handbook of deposition technologies for films and coatings, New Jersey 1994.

CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 9ªed. 868p. Rio de Janeiro: Ltc, 2016.

CASAGRANDE R. B., KUNST S. R., BELTRAMI L. V. R., AGuzzoli C., BRANDALISE R. N., MALFATTI C. de F. Pretreatment effect of the pure titanium surface on hybrid coating adhesion based on tetraethoxysilane and methyltriethoxysilane. **Journal of Coatings Technology and Research**. 2018; 1-18.

CHENG X. E ROSCOE S. G., Corrosion behavior of titanium in the presence of calcium phosphate and serum proteins. **Biomaterials**, 2005; 26: 7350–7356.

CHEN, Q., THOUAS, G.A., Metallic Implant Biomaterials. **Mater. Sci. Eng.** 2015; 87:1–57.

CHAI F., MATHIS N., BLANCHEMAIN N., MEUNIER C., H.F. Hildebrand, Osteoblastinteraction with DLC-coated Si substrates, *Acta Biomater.* 4 (2008)1369–1381.

CHIAVERINI, V. Aços e ferros fundidos: características gerais, tratamentos térmicos, principais tipos. 7ªed. 599p. São Paulo: ABM, 2012.

CHOUDHURY, P.; AGRAWAL, D.C. Sol–gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates. **Surf. Coat. Technol.**, 2011; 206: 360–365.

CRESPO M.A.D., TORRES-HUERTA A.M., RODRÍGUEZ E., GONZALEZ H., BRACHETTI-SIBAJA S.B., DORANTES-ROSALES H.J., LOPEZ-OYAMA A.B. Effect of deposition parameters on structural, mechanical and electrochemical properties in Ti/TiN thin films on AISI 316L substrates produced by r. f. magnetron sputtering. **Journal of Alloys and Compounds**. 2018; 746:688-698.

DHANDAPANI V. S., SUBBIAH R., THANGAVEL E., ARUMUGAM M., PARK K., GASEM Z. M, VEERARAGAVAN V., KIM D.-EUN, Tribological properties, corrosion resistance and biocompatibility of magnetron sputtered titanium-amorphous carbon coatings, **Applied Surface Science**, 2016; 371: 262-274.

DAVIS J.R. (Ed.). **Handbook of Materials for Medical Devices**. Materials Park: ASM International, 2003. 315 p.

DEFLORIAN, F.; ROSSI, S.; FEDRIZZI, L. Silane pre-treatments on copper and aluminium. **Electrochimica Acta**. v. 51. n°27. p. 6097-6103. 2006.

DÍAZ M.J. J., MARTÍNEZ-IBÁÑEZ M., LARA-SÁEZ I., DA SILVA S., IZQUIERDO R., GURRUCHAGA M., GOÑI I., SUAY J. Development of hybrid sol–gel coatings for the

improvement of metallic biomaterials performance. **Progress in Organic Coatings**. 2016; 96: 42–51.

DIENER, A.; NEBE, B.; LÜTHEN, F.; BECKER, P.; BECK, U.; NEUMANN, H. G.; RYCHLY, J. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. **Biomaterials**, 2005; 26: 383-392.

ELIAZ N., Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. **Materials.**, v.12, p.407: 2019.

EISENBARTH E., VELTEN D., MULLER M., THULL R., BREME J., Nanostructured niobiumoxide coatings influence osteoblast adhesion, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 79(1) (2006) 166–175.

ESTRELA C, ALENCAR AHG, KITTEN GT, VENCIO EF, GAVA E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. **Braz Dent J**. 2011; 22(2): 91-98.

FELLER L., JADWAT Y., KHAMMISSA R. A. G., MEYEROV R., SCHECHTER I., LEMMER J. Cellular Responses Evoked by Different Surface Characteristics of Intraosseous Titanium Implants. **BioMed Research International**. p.8 2015.

GEBEAU, R. C; BROWN, R. S. Biomedical implant alloy. **Advanced Materials & Processes**. v. 159. n°9. p. 46-48. 2013.

GEETHA, M.; SINGH A.K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. **Progress in Materials Science**, 2009; 54: 397–425.

GENTIL, V. **Corrosão**. 6ªed. 392p. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

GIORDANO, E. J.; ALONSO-FALLEIROS, N.; FERREIRA, I.; BALANCIN, O. Electrochemical behavior of two austenitic stainless steel biomaterials. **Revista Escola de Minas**. v. 63. n°1. p. 159-166. 2010.

GORIAINOV, V.; COOK, R.; LATHAM, J. M.; DUNLOP, D. G.; OREFFO, R.O.C., Bone and metal: An orthopaedic perspective on osseointegration of metals. **Acta Biomaterialia**. 2014; 10: 4043-4057.

GONZALEZ E.D., CONRADO R.M. A., NASCENTE P.A.P. Influence of Nb content on the structure, morphology, nanostructure, and properties of titanium-niobium magnetron sputter deposited coatings for biomedical applications. **Surface & Coatings Technology**. 2017; 326:424–428.

HELMUS, M. N. e TWEDEN, K., **Materials Selection**, In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A, 1995; 1: 27-59.

HENCH L.L., Polak J.M., Third-generation biomedical materials, **Science**. 2002; 295: 1014–1017.

HIRATSUKA R.S., SANTILLI C.V., PULSINELLI S.H. O Processo Sol-gel: Uma visão Físico-Química. **Química Nova**. 1994; 18(2): 1-10.

HOLZAPFEL B. M., REICHERT J. C., SCHANTZ J-T., GBURECK U., RACKWITZ L, NÖTH U., JAKOB F., RUDERT M., GROLL J., HUTMACHER D. W. How smart do biomaterials need to be: A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2013; 65: 581-603.

HOSSEINALIPOURA S.M., ERSHAD-LANGROUDIB A., NEMATI HAYATIA A., NABIZADE-HAGHIGHIA A.M. Characterization of sol–gel coated 316L stainless steel for biomedical applications. **Progress in Organic Coatings**. 2010; 67: 371–374.

JALOTA S., BHADURI S. B, TAS A. C. *In vitro* testing of calcium phosphate (HA, TCP, and biphasic HA-TCP) whiskers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2006.

KAUR S., SHARMA S., BALA N., A comparative study of corrosion resistance of biocompatible coating on titanium alloy and stainless steel, **Materials Chemistry and Physics**, 2019; 238: 121923.

KATTI, D.S., LAKASHMI, S. LANGER, R. LAURENCIN, C.T. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2002; 54:933-961.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity: **Biomaterials**. v. 27. p. 2907-2915. 2006.

KUMAR S. A, HIREMATHA S.S., RAMACHANDRAN B., MUTHUVIJAYAN V. Effect of Surface Finish on Wettability and Bacterial Adhesion of Micromachined Biomaterials: **Biotribology**. v. 18. 2019.

KUNST, S. R. **Obtenção e caracterização de revestimentos híbridos a base de precursores alcóxidos sobre o aço galvanizado**. Dissertação de Mestrado em Engenharia – Departamento de Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 130p. Porto Alegre: 2011.

KUNST, S. R.; LUDWIG, A. G.; MATOS, J. F.; MALFATTI, C. F. Influencia del tiempo de hidrólisis em la obtención de película híbrida com adición de iones cerio para la protección de aceros galvanizados. **Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia**. 2013; n°69:124-135.

KUNST, S. R. Filmes híbridos modificados com agentes flexibilizantes para uso como revestimento barreira e como pré-tratamento de folha de flandres para aplicação de tinta UV. Tese de Doutorado em Engenharia – Departamento de Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 173p. Porto Alegre: 2015.

KREGIEL, D. Advances in biofilm control for food and beverage industry using organo-silane technology: A review. **Food Control**, v. 40, p. 32-40, jun. 2014.

LINEZ-BATAILLON P., MONCHAU F. BIEGERELLE M. HILDEBRAND H.F. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. **Biomolecular Engineering**. 2002; 19: 133-141.

LIEBERMAN I.H., TOGAWA D., KAYANJA M.M., Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials, **Spine J**. 2005; 5: 305–316.

LONGHI M., KUNST S. R., BELTRAMI L. V. R., KERSTNER E. K., SILVA FILHO C. I., SARMENTO V. H. V., MALFATTI C. Effect of Tetraethoxy-silane (TEOS) Amounts on the Corrosion Prevention Properties of Siloxane-PMMA Hybrid Coatings on Galvanized Steel Substrates. **Materials Research**. 2015; 18(6):1140-1155.

LU Z., GAO J., HE Q., WU J., LIANG D., YANG H., CHEN R. Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing. **Carbohydr. Polym.** 2017, 156: 460–469.

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

MARQUES, A.P., REIS, R.L., HUNT, J.A. The biocompatibility of novel starch based polymers and composites: in vitro studies. **Biomaterials**. 2002; 23(6): 1471-1478.

MARTIN J.Y., SHWARTZ Z., HUMMERT T.W., SCHRAUB D.M., SIMPSON J., LANKFORD J. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like (MG63). **J Biomed Mater Res** 1995; 29(3): 389-401.

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**, 2014; 39: 65-71.

MAURMANN N., PEREIRA D. P., BURGUEZ D., PEREIRA F. D. A., INFORÇATTI NETO P., REZENDE R. A., GAMBARD., DA SILVA J. V. L. and PRANKE P., **Biomed. Phys. Eng. Express**, 2017; 3: 045005.

MATTOX D.M. Chapter 4 – Physical Sputtering and Sputter Deposition. **The Foundations of Vacuum Coating Technology (Second Edition)**. 2018: 87-149.

MATTOX, D. M. **Handbook of Physycal Vapor Deposition (PVD) Processing**. Film formation, adhesion, surface preparation and contamination control. Noyes Publications, New York, 1998.

MENZIES KARA L., AND JONES L., The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials. *In: Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry* · April 2010

METWALLY S., STACHEWICZ U., Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications, **Materials Science and Engineering: C**, 2019; 104:109883.

MIRTCHI, A., LEMAITRE, J., TERAQ, N., Calcium Phosphate Cements: Study of the β -Tricalcium Phosphate- Monocalcium Phosphate System. **Biomaterials**. 1989; 10: 475-480.

MORAIS L. S., GUIMARÃES G. S., ELIAS C. N. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **R. Dental Press Ortodon. Ortop. Facial**. 2007, Maringá,12(6): 48-53.

MUGHAL M.P., FAROOQ M.U., MUMTAZ J., MIA M, SHAREEF M., JAVED M., JAMIL M., PRUNCU C. I., Surface modification for osseointegration of Ti6Al4V ELI using powder mixed sinking EDM, **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. 2021,113: 104145.

MULEY S. V., VIDVANS A. N., CHAUDHARI G. P., UDAINIYA S. An assessment of ultra fine grained 316L stainless steel for implant applications. **Acta Biomaterialia**. 2016: 30;408–419.

NAGARAJAN S and RAJENDRAN N. Surface characterisation and electrochemical behaviour of porous titanium dioxide coated 316L stainless steel for orthopaedic applications. **Applied Surface Science**. 2009; 255:3927–3932.

NEMATI A., SAGHAFIA M., KHAMSEH S., ALIBAKHSHIC E., ZARRINTAJ P., SAE M.R. Magnetron-sputtered Ti_xNy thin films applied on titanium-based alloys for biomedical

applications: Composition-microstructure-property relationships. **Surface & Coatings Technology**. 2018; 349: 251–259.

OLIVEIRA L. S. DE A. F., OLIVEIRA C. S., MACHADO A. P. L., ROSA F. P. Biomaterials for bone regeneration – Methods of analyses and future perspectives. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. 2010; 9: 37-44.

ONG J.L., PRINCE C.W., RAIKAR G.N., LUCAS L.C., Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. **Implant Dent**. 1996; 5(6): 83-88.

OOIJ, W. J. V.; ZHU, D.; STACY, M.; SETH, A.; MUGADA, T.; GANDHI, J.; PUOMI, P. Corrosion protection properties of organofunctional silanes – an overview. **Tsinghua Science & Technology**. 2005, 10 (6): 639-664.

ORÉFICE, R. L; PEREIRA, M. M; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. 1ªed. 552p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

OWENS, G. J.; SINGH, R. K.; FOROUTAN, F.; ALQAYSI, M.; HAN, C.; MAHAPATRA, C.; KIM, H.; KNOWLES, J. C. Sol-gel based materials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**. 2016, 77: 1-79.

PADILHA, A.F.; GUEDES, L.C. **Aços Inoxidáveis Austeníticos – Microestrutura e Propriedades**. Ed. Hemus Ltda., São Paulo. p.150, 1994.

PANTAROTO H.N., CORDEIRO J.M., PEREIRA L.T, et al., Sputtered crystalline TiO₂ film drives improved surface properties of titanium-based biomedical implants, **Materials Science & Engineering C**. 2021.

PARK, J. B. **Biomaterials science and engineering**. 458p. New York: Plenum Press, 1984.

PARK, J. B. and BRONZINO, J. D. **Biomaterials: principles and applications**. 2ªed. 250p. Flórida: CRC Press, 2002.

PASCHOAL, A. L. **Avaliação da resistência à corrosão em meio fisiológico de metais revestidos com nitreto de titânio**. Dissertação de Mestrado em Engenharia – Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo. 129p. São Carlos: 1998.

PÉREZ, C.; COLLAZO, A.; IZQUIERDO, M.; MERINO, P.; NÓVOA, X. R. Characterisation of the barrier properties of different paint systems: part II. Non-ideal diffusion and water uptake kinetics. **Progress in Organic Coatings**. 1999; 37: 169-177.

PIRES, A.L.R., BIERHAKZ, A.C.K.E., MORAES, Â.M. Biomateriais: Tipos aplicações e mercado. *Química Nova*. 2015; 38(7): 957-971.

PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. **Dent. Clin. N. Am.**, 2007; 51:729-746.

PREMKUMAR K.P., DURAI PANDY N., KIRAN M.S., RAJENDRAN N. Antibacterial effects, biocompatibility and electrochemical behavior of zinc incorporated niobium oxide coating on 316L SS for biomedical applications. **Applied Surface Science**. 2018; 427:1166–1181.

PUBMED, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10 mar. 2020.

RAHMAN Z.U., DEEN K.M., CANO L., HAIDER W. The effects of parametric changes in electropolishing process on surface properties of 316L stainless steel. **Applied Surface Science**. 2017; 410:432–444.

RAMOT Y., HAIM-ZADA M., DOMB A.J., NYSKA A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2016; 107(15):153-162.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 3^aed. 1573p. San Diego: Academic Press, 2013.

REZAEI B, HAVAKESHIAN E, ENSAFI A. A. Stainless steel modified with an amino silane layer and gold nanoparticles as a novel disposable substrate for impedimetric immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**. 2013; 48:61–66.

RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Uso da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**. 2015; 8 (4):529-546.

ROMAN, D. **Deposição de filmes finos de Nitreto de Zircônio para aplicação em biomateriais**. Dissertação de Mestrado em Materiais – Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de Caxias do Sul. 83p. Caxias do Sul: 2010.

ROMANO, A. P.; FEDEL, M.; DEFLORIAN, F.; OLIVIER, M. G. Silane sol–gel film as pretreatment for improvement of barrier properties and filiform corrosion resistance of 6016 aluminium alloy covered by cathoretic coating. **Progress in Organic Coatings**, v. 72, p. 695-702, 2011.

SANTOS, V. dos, BRADALISE, R.N., SAVARIS, M. *Engenheering os Biomaterials: Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering*. **Springer**. Porto Alegre, 2017.

SAKAI, R. T.; CRUZ, F. M. D. L.; MELO, H. G.; BENEDETTI, A. V.; SANTILLI, C. V.; SUEGAMA, P. H. Electrochemical study of TEOS, TEOS/MPTS, MPTS/MMA and TEOS/MPTS/MMA films on tin coated steel in 3,5% NaCl solution. **Progress in Organic Coatings**. 2012; 74: 288-301.

SALVADOR D.G., MARCOLIN P., BELTRAMI L.V.R., BRANDALISE R.N., KUNST S.R. Influence of the pretreatment and curing of alkoxy silanes on the protection of the titanium–aluminum–vanadium alloy. **Journal of Applied Polymer Science**. 2017; 45470:1-14.

SARMENTO, V. H. V.; SCHIAVETTO, M. G.; HAMMER, P.; BENEDETTI, A. V.; FUGIVARA, C. S.; SUEGAMA, P. H.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. Corrosion protection of stainless steel by polysiloxane hybrid coatings prepared using the sol–gel process. **Surface and Coatings Technology**. 2010; 204: 2689-2701.

SHARIFNABI A., FATHI M.H., YEKTA B.E., HOSSAINALIPOUR M. The structural and bio-corrosion barrier performance of Mg-substituted fluorapatite coating on 316L stainless steel human body implant. **Applied Surface Science**. 2014; 288:331– 340.

SHARMA, S. et al. Silk fibroin nanoparticles support in vitro sustained antibiotic release and osteogenesis on titanium surface. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 5, p. 1193–1204, 2016.

SHIBATA, Y.; TANIMOTO, Y. A review of improved fixation methods for dental implants. Part I: Surface optimization for rapid osseointegration, **Journal of Prosthodontic Research**, 2015; 59: 20-33.

SIGMA ALDRICH CATÁLOGO, 2017. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog>>. Acesso em: 20 out. 2017.

SILVA, E. F.; OLIVEIRA, L. F. C. Caracterização química e metalográfica dos aços inoxidáveis de implantes removidos de pacientes. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 19. nº5. p. 280-285. 2011.

SILVA G. F. DA, KRASZCZUK A., TSCHIPTSCHIN A. P. Síntese e caracterização de filmes de TiN depositados em aço ferramenta AISI H13. **Rev. Bras. Apl. Vac.**, Campinas, 2017; 35(3): 123-127.

SIMSEK I., OZYUREK D., Investigation of the wear and corrosion behaviors of Ti5Al2.5Fe and Ti6Al4V alloys produced by mechanical alloying method in simulated body fluid environment, **Materials Science and Engineering: C**, 2019; 94: 357-363.

SIMON A.H. Chapter 7 – Sputter Processing. **Handbook of Thin Film Deposition** (Fourth Edition). 2018, 195-230.

SIQUEIRA, R.L., MAURMANN, N., BURGUÊZ, D., PEREIRA, D.P., RASTELLI, A.N.S., PEITL, O., PRANKE, P., ZANOTTO, E.D., Bioactive gel-glasses with distinctly different compositions: Bioactivity, viability of stem cells and antibiofilm effect against *Streptococcus mutans*. **Mater. Sci. Eng. C**. 2017; 76: 233–241.

SUBRAMANIAN B., ANANTHAKUMAR R., KOBAYASHI A., JAYACHANDRAN M., Surface modification of 316L stainless steel with magnetron sputtered TiN/VN nanoscale multilayers for bio implant applications, **J Mater Sci: Mater Med.** 2013; 23: 329–338

SUZUKI O., Octacalcium phosphate: osteoconductivity and crystal chemistry, **Acta Biomater.** 2010; 6:3379–3387.

SWAN S. Magnetron Sputtering. **Physics Inc.** 1982,168. Technology ,1988

SYLVESTER P.W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. In: Satyanarayanajois S. (eds) Drug Design and Discovery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). **Humana Press.** vol 716; (2011).

TALHA M., BEHER C.K., SINH O.P. A review on nickel-free nitrogen containing austenitic stainless steels for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C.** 2013; 33: 3563–3575.

VENUGOPALAN, R.; GAYDON, J. *A Review of Corrosion Behaviour of Surgical Implant Alloys*; Technical Review Note 99-01; Perkin Elmer Instruments: Princenton, NJ, USA, 2001; pp. 99-107.

WANG, X., LI, G., LI, A., ZHANG, Z. Influence of thermal curing on the fabrication and properties of thin organosilane films coated on low carbon steel substrate. Journal os **Materials Processing Technology.** 2007; 186:259-264.

WANG, M., WANG, Y., CHEN, Y., GU, H., Improving Endothelialization on 316L Stainless Steel Through Wettability Controllable Coating by Sol–Gel Technology. **Appl. Surf. Sci.** 2013; 268: 73–78.

WASA, K. K., M. ADACHI, H., **Thin Film Materials Technology: Sputtering of Compound Materials**, Norwich: Willian Andrew. 531. 2004

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials, progress in biomedical engineering. v. 4. 72p. New York: **Elsevier**, 1987.

WILLIAMS D.F., On the nature of biomaterials, **Biomaterials**. 2009; 30: 5897–5909.

WOLYNEC, S. **Técnicas eletroquímicas em corrosão**. EdUSP: Editora da Universidade de São Paulo. 1ªed. 1ª reimp. 166p. São Paulo: 2013.

XU Y., CHEN C., HELLWARTH P.B., BAO X., Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing, **Bioactive Materials**, 2019; 4: 366-379.

YI P., ZHU L., DONG C., XIAO K., Corrosion and interfacial contact resistance of 316L stainless steel coated with magnetron sputtered ZrN and TiN in the simulated cathodic environment of a proton-exchange membrane fuel cell, **Surface and Coatings Technology**, 2019; 363: 198-202.

ZIADI I., ALVES M.M., TARYBA M., EL-BASSI L., HASSAIRI H., BOUSSELMI L., MONTEMOR M.F., AKROUT H., Microbiologically influenced corrosion mechanism of 304L stainless steel in treated urban wastewater and protective effect of silane-TiO₂ coating. **Bioelectrochemistry**. 2019; 19: 1567-5394.

ZHANG, W., SHENG, J., XU, Y. *et al.* Role of brassinosteroids in rice spikelet differentiation and degeneration under soil-drying during panicle development. **BMC Plant Biol**. 2019; 19: 409.

ZHENG K., BOCCACCINI A.R., Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**.2017, 249: 363-373.

ZHU, D.; OOIJ, W. J. V. Corrosion protection of AA 2024-T3 by bis-[3-triethoxysilyl)propyl]tetrasulfide in sodium chloride solution. Part 2: mechanism for corrosion protection. **Corrosion Science**. 2003; 45(10): 2177-2197.